TÁBATA TAKAHASHI FRANÇA

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE NETs EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA DE CD40 LIGANTE

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

São Paulo
2017

TÁBATA TAKAHASHI FRANÇA

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE NETs EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA DE CD40 LIGANTE

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Condino Neto

Versão Original.

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo (a) autor(a)

Takahashi França, Tábata
Avaliação da formação de NETs em pacientes com deficiência de CD40L / Tábata Takahashi França; orientador Antonio Condino Neto. -- São Paulo, 2017.
80 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Neutrófilos. 2. NETs. 3. X-HIGM. 4. Deficiência de CD40L. 5. IFN-γ. I. Condino Neto, Antonio, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Tábata Takahashi França

Título da Dissertação: Avaliação da formação de NETs em pacientes com deficiência de CD40L.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovada ( ) Reprovada

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 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 04 de março de 2015.

PARECER 1220/CEPSH

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: *"Avaliação da formação de neutrophil extracellular traps em pacientes com deficiência de cd40 ligante e influência do tratamento in vitro com interferon-gamma"* do pesquisador **Antonio Condino Neto** e aluna **Tábata Takahashi França.**

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: **icb.usp.br.**

Aos pesquisadores cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **04.03.2016**.

Atenciosamente,

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

A minha família,

pois a ela devo tudo que sou,

pois sem ela eu nada seria...

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço aos meus pais, Ildeu e Masae, por todo amor, ensinamentos, apoio, incentivo e broncas, e também as minhas irmãs, Natalia e Talita, por toda amizade e por estarem sempre presentes.

Ao meu orientador professor Antonio Condino Neto, pela oportunidade, pelos conselhos, pelo incentivo e acima de tudo por acreditar no meu potencial.

Agradeço, também:

Ao apoio de toda minha família, tios e tias, primos e primas, que por serem tantos se torna impossível citar um a um, porém cada qual a sua maneira contribuíram de maneira única para esta caminhada.

A Christina Arslanian e Silvana Lucchinni, por todo apoio e carinho, e por tornarem o dia a dia do laboratório mais fácil e acolhedor.

Aos amigos do laboratório de Imunologia Humana (LIH), Renata, Lucila, Paola, Marina, José Antonio, Edgar, Christiane e Nuria, e a tantos outros que não estão mais por perto, mas que contribuíram imensamente para este trabalho como Otávio, Paulo Vítor e Leandro, por toda parceria, discussões científicas, risadas, aprendizados, angústias compartilhadas e vitórias comemoradas.

Aos amigos da vida, em especial Marcela e Márita, por toda amizade e por nunca me deixarem esquecer que há vida além do laboratório.

As médicas, Dra. Beatriz Costa Carvalho, Dra. Cristina Weber Worm, Dra. Janáira, bem como às suas respectivas equipes, pela imensa colaboração, coleta e envio de amostras de sangue dos pacientes, sem as quais este trabalho não teria sido possível.

Aos pacientes e aos seus pais, por colaborarem e entenderem a importância da pesquisa, e para os quais este trabalho é realizado.

Aos integrantes da banca de qualificação Professor Alexandre Steiner, Dra Ester Sabino e Dra Évelin Komegae, pelas ricas críticas e sugestões durante o Exame de Qualificação.

Aos amigos do Departamento de Imunologia, em especial Eni, Aurea e Grace, por todo suporte e apoio sempre presentes.

Aos Professores do Departamento de Imunologia por todo conhecimento compartilhado e ensinamentos oferecidos.

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

Agradecimento especial

Agradeço especialmente à FAPESP pela bolsa-Mestrado e Auxílio concedido, sem o qual não seria possível a realização deste estudo.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais
evidente fica nossa ignorância”.
(John F. Kennedy)

RESUMO

FRANÇA, T. T. **Avaliação da formação de NETs em pacientes com deficiência de CD40L**. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Os neutrófilos são o tipo celular mais abundante na circulação humana e compõem a primeira linha de defesa contra patógenos nos sítios de infecção. Estudos recentes demonstram que as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) formam uma estrutura extracelular capaz de anular fatores de virulência e destruir microrganismos. Pacientes portadores da síndrome de Hiper-IgM ligada ao X (X-HIGM), imunodeficiência rara causada por mutações no gene codificante da molécula CD40 ligante (CD40L), apresentam grande susceptibilidade a infecções, com alta incidência de infecções oportunistas causadas por fungos. Tendo em vista que a resposta de neutrófilos apresenta grande importância para o controle de infecções fúngicas e estudos que apontam influência da interação CD40-CD40L na granulopoiese, propusemos investigar se a suscetibilidade aumentada a infecções em pacientes deficientes de CD40L poderiam estar relacionadas à falha na formação de NETs. A geração de NETs frente ao estímulo com PMA mostrou-se diminuída nos pacientes deficientes de CD40L em comparação com indivíduos saudáveis. A geração de EROs (espécies reativas do oxigênio) frente a estimulação com PMA e *C. albicans* mostrou-se similar entre os dois grupos avaliados, no entanto os pacientes deficientes de CD40L não foram capazes de aumentar a produção de EROs após tratamento com IFN-γ como observado nos indivíduos saudáveis. Avaliação do estágio de maturação dos neutrófilos indica a presença de neutrófilos periféricos imaturos nos pacientes deficientes de CD40L. Os resultados obtidos indicam que pacientes deficientes de CD40L apresentam falha na geração de NETs pela estimulação com PMA, alteração possivelmente relacionada a maturação incompleta dos neutrófilos. O estudo contribui para o avanço no conhecimento sobre a imunopatologia da deficiência do CD40L e para elucidação dos mecanismos envolvidos na suscetibilidade aumentada a infecções em pacientes deficientes de CD40L, além de abrir novas perspectivas para a elucidação da interação CD40-CD40L e sua função na resposta imune.

Palavras-chave: Neutrófilos. NETs. X-HIGM. Deficiência de CD40L. IFN- γ.

ABSTRACT

FRANÇA, T. T. **Evaluation of NET formation in CD40L-deficient patients**. 2017. 80 p. Masters thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Neutrophils are the most abundant cell type in human circulation and are the first line of defense against pathogens at sites of infection. Recent studies have shown that neutrophil extracellular traps (NETs) form an extracellular structure able to neutralize virulence factors and destroy microorganisms. Patients with X-linked Hyper-IgM syndrome (X-HIGM), a rare immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the molecule CD40 ligand (CD40L), are highly susceptible to infections with elevated incidence of opportunistic infections caused by fungi. Since neutrophil responses are important to control fungal infection and studies indicate the influence of the CD40-CD40L interaction on granulopoiesis, we proposed to investigate whether the increased susceptibility to infections in CD40L-deficient patients could be related to failure in NET formation. NET formation against PMA stimulus was decreased in CD40L-deficient patients compared to healthy subjects. ROS generation against PMA and *C. albicans* was similar between the investigated groups, although CD40L-deficient patients were not able to increase the production of ROS after treatment with IFN-γ as observed on healthy individuals. Evaluation of neutrophils' maturation stage indicates the presence of immature peripheral neutrophils in CD40L-deficient patients. The results indicate that CD40L-deficient patients present a failure in NET generation in a stimulus-dependent manner, likely related to incomplete neutrophil maturation. This study contributes to expand the knowledge on the immunopathology of CD40L deficiency and contributes to elucidate the mechanisms involved in increased susceptibility to infections in CD40L-deficient patients. In addition, our findings bring new perspectives for the understanding of CD40-CD40L interaction and its function in the immune response.

Keywords: Neutrophils. NETs. X-HIGM. CD40L deficiency. IFN- γ.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de resposta dos neutrófilos.

Figura 2 - Função das NETs na resposta imune.

Figura 3 - Esquema da estrutura do CD40LG.

Figura 4 - A interação CD40-CD40L na resposta imune.

Figura 5 – Avaliação da geração de NETs em pacientes deficientes de CD40L.

Figura 6 - Visualização da formação de NETs pelos pacientes deficientes de CD40L.

Figura 7 - Avaliação da produção de EROs em pacientes deficientes de CD40L.

Figura 8 - Avaliação do perfil de maturação dos neutrófilos de pacientes deficientes de CD40L.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores microbicidas, proteicos e químicos que estimulam a formação de NETs.
Tabela 2 - Manifestações clínicas na deficiência de CD40L.
Tabela 3 - Pacientes envolvidos no estudo: mutações, histórico de infecções fúngicas e ensaios realizados.
Tabela 4 - Estímulos utilizados para a ativação/desafio dos neutrófilos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca^+	íons de cálcio
CD40L	CD40 ligante
CD40LG	gene CD40L
CD40Ls	CD40 ligante solúvel
DCs	células dendríticas
DGC	doença granulomatosa crônica
EROs	espécies reativas do oxigênio
FSC	parâmetro de tamanho celular
G-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos
HIGM	Síndrome de hiper IgM
HSCT	transplante de células tronco hematopoiéticas
IDPs	imunodeficiências primárias
IFN-γ	interferon-gama
Ig	imunoglobulina
MFI	intensidade mediana de fluorescência
MOI	multiplicidade de infecção
MPO	enzima mieloperoxidase
NE	elastase de neutrófilo
NETs	armadilhas extracelulares de neutrófilos
NK	célula natural *killer*
PAD-4	pepitidil-arginina deaminase tipo 4
PBS	tampão fosfato salino
PKC	proteína quinase C
PMA	*phorbol 12-myristate 13-acetate*
PMN	leucócitos polimorfonucleares
RCF	força centrífuga relativa
RFU	unidade relativa de fluorescência
RPMI	meio Roswell Park Memorial Institute
SFB	soro fetal bovino
SSC	parâmetro de complexidade celular

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	fator de necrose tumoral
URL	unidade relativa de luz
X-HIGM	Síndrome de Hiper IgM ligada ao X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

1.1 Os neutrófilos na resposta imune 18

1.2 Armadilhas extracelulares de neutrófilos - NETs 20

1.3 Deficiência de CD40L: A Síndrome de Hiper IgM ligada ao X 23

1.4 A interação CD40-CD40L na resposta imune 25

1.5 Interferon-gama 27

2 OBJETIVO 29

2.1 Objetivo geral 29

2.2 Objetivos específicos 29

3 MATERIAIS E MÉTODOS 30

3.1 Casuística 30

3.2 Obtenção PMN de sangue periférico 31

3.3 Estimulação celular 31

***3.3.1 Cultivo de Candida albicans* 32**

3.4 Avaliação da geração de NETs 32

***3.4.1 Quantificação de NETs* 32**

***3.4.2 Visualização da formação de NETs* 33**

3.5 Avaliação da produção de EROs 34

3.6 Avaliação do perfil de maturação 34

3.7 Análise estatística 35

4 RESULTADOS 36

4.1 Avaliação da geração de NETs 36

4.2 Avaliação da produção de EROs 38

4.3 Avaliação do perfil de maturação dos neutrófilos 39

5 DISCUSSÃO 41

6 CONCLUSÕES 45

REFERÊNCIAS **46**

ANEXOS **55**

A- Avaliação da pureza da separação celular **55**

B- Avaliação da viabilidade celular **56**

C- Avaliação morfológica das *C. albicans* utilizadas nos protocolos experimentais **57**

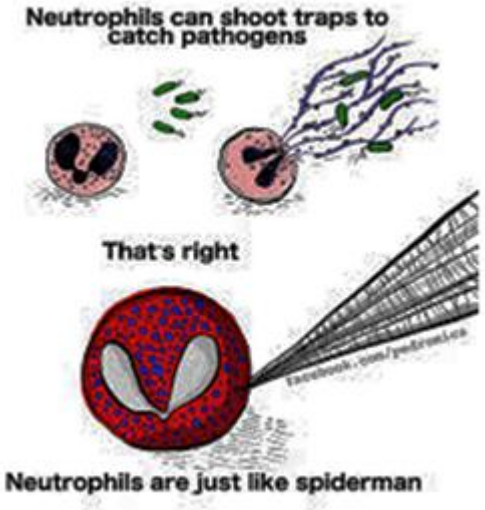
D- Marcação de neutrófilos para visualização da formação de NETs **58**

E- Avaliação da expressão de CD40 nos neutrófilos de pacientes deficientes de CD40L **59**

G- TCLE menores de 18 anos **64**

H- TCLE maiores de 18 anos **66**

I- Artigo publicado **68**


Neutrophils can shoot traps to catch pathogens
That's right
Neutrophils are just like spiderman

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os neutrófilos na resposta imune

Os neutrófilos, também conhecidos como leucócitos polimorfonucleares (PMN), constituem a população mais abundante de leucócitos circulantes em humanos e possuem papel essencial na defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores. Eles medeiam as fases iniciais das reações inflamatórias e fornecem importante contribuição para o recrutamento, ativação e diferenciação de outros leucócitos (1, 2, 3).

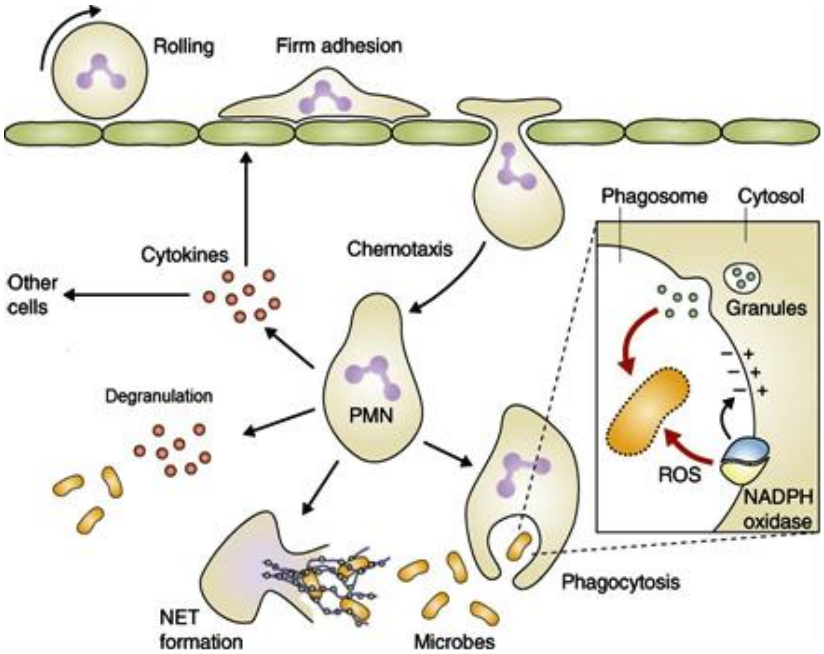
Os neutrófilos se desenvolvem na medula óssea a partir de células tronco hematopoiéticas em um processo denominado granulopoiese, processo no qual progenitores mielóides se diferenciam sequencialmente em células mielocíticas, mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e por fim em neutrófilos maturos (4). Ao atingir seu estágio final de maturação, os neutrófilos são liberados para a circulação sanguínea e encontram-se aptos a realizarem suas funções efetoras fundamentais para manutenção da homeostasia e controle de infecções.

A principal citocina envolvida na regulação do ciclo de vida dos neutrófilos é o fator estimulador de colônias de granulócitos, o G-CSF (do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*). Esta importante citocina é produzida por monócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e células do estroma da medula óssea após estímulo e atua na proliferação celular, sobrevivência e diferenciação dos neutrófilos (5,6). A nível celular, o G-CSF estimula a proliferação de células progenitoras mielóides, induz a diferenciação de progenitores mielóides para linhagem neutrofílica e participa de todo processo de maturação dos neutrófilos, tendo grande influência na fase de diferenciação de metamielócitos em neutrófilos maturos (7).

A resposta inflamatória dependente de neutrófilos é um processo composto de diversas etapas sequenciais que envolvem o rolamento e firme adesão dos neutrófilos circulantes ao endotélio vascular ativado, o extravasamento e migração de neutrófilos em direção ao foco inflamatório e por fim a ação efetora de eliminação de microrganismos invasores (8, 9) (Figura 1). O recrutamento de neutrófilos para o sítio infeccioso é a primeira etapa da resposta inflamatória e este processo é iniciado por alterações vasculares e endoteliais em reposta à mediadores inflamatórios, como as citocinas TNF e IL-6, que induzem a expressão endotelial das selectinas P e E. A interação de baixa afinidade destas selectinas com seus

ligantes presente nos neutrófilos, como a PSGL1, levam ao rolamento dos neutrófilos na superfície endotelial. Os mediadores inflamatórios também induzem a expressão endotelial dos ligantes de integrina, como VCAM-1 e ICAM-1, que se ligam às integrinas VLA-4, LFA-1 e MAC-1 presente nos neutrófilos e levam a uma firme adesão dos neutrófilos ao endotélio. A subsequente transmigração e diapedese envolve a interação de diversas moléculas como LFA-1, MAC-1, VLA-4 e CD99 aos seus ligantes presentes no endotélio e na matriz extracelular (11, 12).

Figura 1 - Mecanismos de resposta dos neutrófilos.



Após a migração para o sítio inflamatório, os neutrófilos fagocitam e digerem microrganismos invasores (dependente da ação de agentes microbicidas presente nos grânulos e ação da enzima NADPH-oxidase), secretam citocinas, liberam produtos de seus grânulos no meio extracelular (degranulação) e formam NETs (10, adaptado).

Os principais mecanismos pelos quais os neutrófilos eliminam os patógenos no sítio infeccioso são pela ação das proteínas antibacterianas presente nos grânulos e pela geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) (12- 15). A geração de EROs no fagossomo é considerado mecanismo crítico para destruição de microrganismos e ocorre em processo conhecido como explosão respiratória, o qual gera fatores como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, poderosos agentes oxidantes capazes de danificar a estrutura celular de diversos microrganismos (13, 16- 19). A enzima responsável pelo metabolismo do oxigênio é a NADPH-oxidase, complexo multiproteico composto por componentes

citoplasmáticos (proteínas p47-*phox*, p67-*phox* e p40-*phox*) que após estímulo se translocam em direção ao componente de membrana do complexo, conhecido como citocromo-b_{558} (formado por p22-*phox* e gp91-*phox)*, culminando na ativação do complexo enzimático e subsequente geração de EROs (19- 21). Estes reativos gerados nos fagossomos atuam juntamente coma as enzimas lisossomais na destruição dos microrganismos fagocitados (13).

Outro mecanismo utilizado por neutrófilos para eliminação de patógenos consiste na liberação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*), estruturas liberadas por neutrófilos ativados que possuem funções microbicidas e agem sobre patógenos presentes no meio extracelular (22).

1.2 Armadilhas extracelulares de neutrófilos - NETs

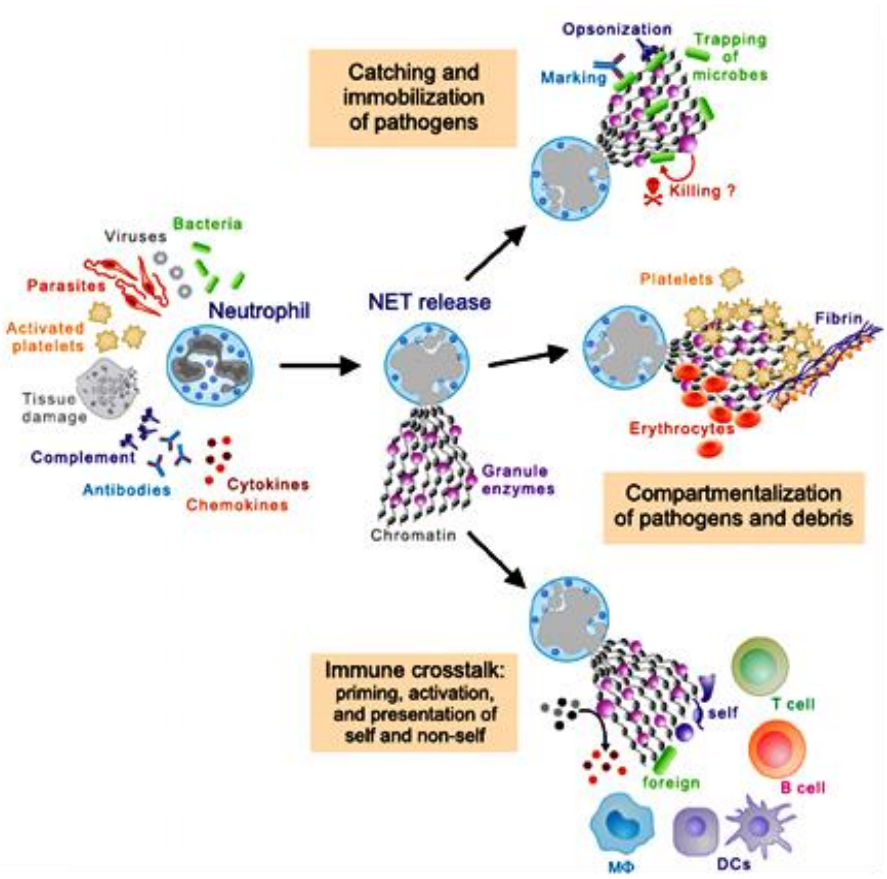
As NETs, descritas pela primeira vez por Brinkman e colaboradores em 2004, são estruturas extracelulares compostas de cromatina descondensada e fatores antimicrobianos derivados dos grânulos que são liberadas pelos neutrófilos após estímulo por diferentes compostos químicos, fatores proteicos e patógenos como bactérias, fungos, vírus encapsulados e protozoários (23, 24) (Tabela 1).

Tabela 1 - Fatores microbicidas, proteicos e químicos que estimulam a formação de NETs (23, adaptado).

Fatores microbicidas	**Fatores químicos**
Aspergillus fumigatus	δ-toxina de *Staphylococcus epidermidis*
Candida albicans	Anticorpo
Cryptococcus neoformans	Ion de cálcio
Eimeria bovis	Glucose oxidase
Enterococcus Faecallis	GM-CSF + C5a
Escherichia coli	GM-CSF + LPS
Haemophilus influenzae	Peróxido de hidrogênio
Helicobacyer pylori	Interferon-a + C5a
Klebsiella pneumoniae	Interleucina 8
Lactococcus lactis	Lipopolisacarídeo (LPS)
Leishmania amazonensis donovani/major/chagasi	Óxido nítrico
Listeria monocytogenes	Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)
Mannheimia haemolytica	PMA + Ionomicina
Mycobacterium Tuberculosis	Fator ativador de plaquetas
Serratia marcescens	Receptor Toll-like 4 (TLR-4)
Shigella flexneri	TNF-a

Diversos estudos indicam que as NETs estão presentes em grande quantidade nos sítios inflamatórios e além de atuarem ativamente na eliminação dos microrganismos servem também como uma barreira física que impede sua disseminação e fornece sinais para outras células imunes como linfócitos, DCs e macrófagos (25- 30) (Figura 2). No entanto, esta resposta dos neutrófilos tem papel fundamental não somente na resolução de infecções, mas também no agravamento de quadros inflamatórios, infecções e doenças autoimunes (31- 33).

Figura 2 - Função das NETs na resposta imune.



As NETs podem ser desencadeadas por diversos estímulos, como em resposta a infecção, dano tecidual e inflamação. Após liberadas, as NETs capturam os patógenos e ajudam na sua eliminação, provavelmente através da ação de enzimas presentes em sua estrutura. Além disso, as NETS promovem a formação de trombos que evitam a disseminação de microrganismos de detritos celulares. Acredita-se que estas estruturas extracelulares também desempenhem papel crucial na regulação das respostas imunes pela sua interação com outros tipos celulares (47).

As NETs são compostas em sua maioria por DNA nuclear e sua liberação resulta em morte celular conhecida como NETose, embora tenha sido descrito mecanismo de formação de NETs independente de morte celular através da liberação de DNA nuclear para o meio extracelular por meio de vesículas secretoras (34). Além disso, evidências que apontam que o

DNA extracelular pode ter origem mitocondrial indicam vias alternativas de formação de NETs independente de morte celular (35).

A formação de NETs foi descrita inicialmente como um processo dependente da geração de EROs pelo complexo enzimático da NADPH-oxidase (36, 37) e que o requerimento de EROs é estímulo-dependente (38- 40). Outros fatores como a ativação da via de sinalização Raf-MEK-ERK, o requerimento de arginina-peptidil-deaminase tipo 4 (PAD-4, do inglês *Peptidyl-arginine-deiminase type 4*) e das enzimas elastase de neutrófilos (NE, do inglês *neutrophil elastase*) e mieloperoxidase (MPO) mostraram-se necessárias para a formação das NETs (41- 44). Embora o mecanismo pelo qual as NETs são formadas ainda não seja completamente conhecido, acredita-se que as EROs estejam envolvidas na liberação das enzimas NE e MPO dos grânulos citoplasmáticos, que então se translocam para o núcleo e digerem as histonas nucleossomais promovendo a descondensação da cromatina, processo dependente de PAD-4. Em seguida, a membrana nuclear é rompida e a cromatina liberada no citoplasma, misturando-se com os componentes citoplasmáticos. Por fim, o rompimento da membrana citoplasmática culmina na liberação das NETs para o meio extracelular (14, 24, 45- 47).

Neutrófilos deficientes em algum dos componentes demonstrados como essenciais para a formação de NETs, como EROs e MPO, são incapazes de formar estas estruturas (14, 37, 44, 48). Neutrófilos de pacientes com a doença granulomatosa crônica (DGC), imunodeficiência primária (IDP) causada por mutações nos genes que codificam as subunidades da NADPH-oxidase, não produzem EROs e são incapazes de gerar NETs, o que se acredita ter relação com a suscetibilidade a infecções oportunistas apresentada por estes pacientes (37). O envolvimento deste mecanismo de resposta na imunopatologia e na susceptibilidade a infecções oportunistas apresentada por pacientes com IDPs ainda não é conhecida, embora falhas na geração de NETs têm sido descritas como fator contribuinte para o aumento da suscetibilidade a infecções em diversas condições clínicas (37, 46, 49).

A resposta apropriada de neutrófilos é essencial para o controle de infecções causadas por diversas classes de patógenos, sendo de grande importância para a resposta contra infecções fungicas (50- 52). Pacientes com doenças que apresentam a característica hematológica de neutropenia recorrente exibem suscetibilidade aumentada a infecções (53- 55), ilustrando a importância dos neutrófilos na contenção de infecções. A redução do número de neutrófilos é uma manifestação hematológica presente em diversas condições clínicas de origem geneticamente heterogêneas, com etiologia muitas vezes não conhecidas (56). A neutropenia pode ocorrer em decorrência de diversos fatores, como defeitos na granulopoiese,

destruição periférica ou distribuição anormal nos tecidos (57). Uma doença que apresenta como característica hematológica a neutropenia crônica é a Síndrome de Hiper IgM ligada ao X (X-HIGM, do inglês *X-linked Hiper* IgM) (58).

1.3 Deficiência de CD40L: A Síndrome de Hiper IgM ligada ao X

As Síndromes de Hiper-IgM (HIGM) são um grupo heterogêneo de desordens genéticas que levam a defeitos na troca de classe das imunoglobulinas (Ig), resultando em níveis séricos elevados ou normais de IgM associado à deficiência ou ausência dos anticorpos IgG, IgA e IgE (59, 60). As HIGMs podem ser causadas por mutações autossômicas recessivas, nas quais o defeito genético está localizado em genes que codificam a molécula de CD40 e em moléculas envolvidas na geração e reparo de quebras de DNA geradas durante a troca de classe das Ig, como a enzima desaminase induzida por ativação (AID, do inglês *activation-induced cytidine deaminase*) e a enzima uracil-N-glicosidase (UNG), ou podem ser causadas por mutações no gene do CD40 ligante (CD40L) localizado no cromossomo X, levando à X-HIGM ou deficiência de CD40L (61), subtipo mais grave e de maior incidência dentre as HIGM (70% dos casos, frequência estimada em 1/1.000.000 de nascimentos) (60, 62).

A deficiência do CD40L foi descrita pela primeira vez em 1961 por Rosen e Burtin. Os pacientes descritos apresentavam linfonodos estruturalmente pouco organizados e ausência de centro germinativo, além de níveis séricos de IgG baixos associados a elevação nos níveis de IgM (63- 65). Contudo, embora a síndrome tenha sido inicialmente caracterizada pelos níveis séricos elevados de IgM, dados atuais revelam que em 40% dos casos os níveis séricos encontram-se normais, enquanto que 6% dos pacientes apresentam níveis séricos de IgM baixos (66).

Pacientes deficientes de CD40L normalmente apresentam infecções recorrentes já no primeiro ano de vida, além de neutropenia crônica, distúrbios gastrointestinais e alterações hematológicas (Tabela 2), condições letais na ausência de intervenção médica apropriada (61, 62, 67). Além de infecções bacterianas intra e extracelulares, pacientes deficientes de CD40L apresentam alta susceptibilidade a infecções fúngicas, particularmente por *Pneumocytis jiroveci*, *Candida albicans*, *Cryptococcus* e *Histoplasma* (68, 69). Estudo recente revelou que pacientes brasileiros com deficiência de CD40L apresentam incidência aumentada de infecções fúngicas em comparação com pacientes da Europa e da América do Norte (82% e

34-57%, respectivamente), além de apresentarem infecções por microrganismos até então não descritos em nestes pacientes, como pelo fungo oportunista *Paracoccidioides brasiliensis* (70).

Tabela 2 - Manifestações clínicas na deficiência de CD40L (61).

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

* Registro EUA/Europeu, 135 pacientes no total.

Devido às alterações na produção de anticorpos, pacientes deficientes de CD40L são comumente submetidos à terapia de reposição de Ig por meio de administração intravenosa ou subcutânea, a qual reduz significativamente a frequência e gravidade das infecções (68, 69), apesar de não ser eficaz na prevenção de distúrbios hematológicos e desenvolvimento de tumores (61). Associada à reposição de Ig, terapias antifúngicas e antibacterianas podem ser administradas para prevenir ou tratar infecções em curso, enquanto que a administração de G-CSF recombinante mostrou-se eficaz na reversão dos quadros de neutropenia apresentados pelos pacientes (68, 69, 71, 72), embora alguns pacientes persistam com os quadros de neutropenia mesmo em tratamento com G-CSF, característica intrigante e de etiologia ainda desconhecida. Atualmente a única intervenção curativa definitiva disponível para pacientes deficientes de CD40L é o transplante de células tronco hematopoiéticas (HSCT, do inglês *hematopoietic stem cell transplantation*) (67, 69, 73, 74), procedimento ainda pouco frequente na América Latina, como mostram dados que apontam que menos de 10% dos transplantes necessários no tratamento de IDPs na América Latina são realizados (75).

Apesar dos protocolos de tratamento mostarem eficácia na redução da incidência de infecções em pacientes com defiência de CD40L (58, 76), infecções oportunistas causadas por

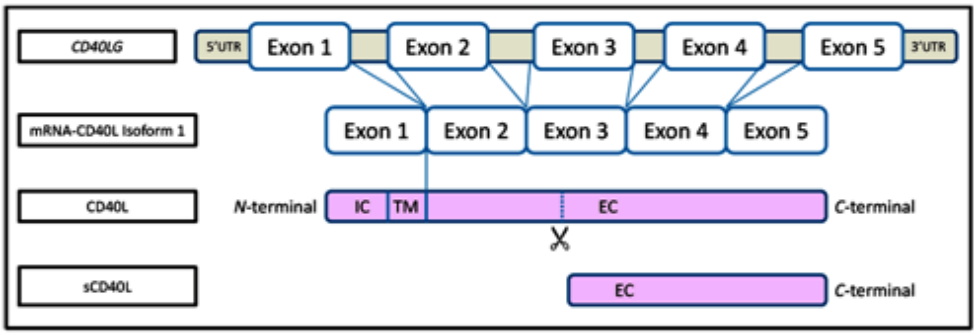
fungos persistem como causa significativa de morbidade e mortalidade nestes pacientes (69) e a expectativa de vida de pacientes deficientes de CD40L é menor que 20% até a idade de 25 anos (77), demonstrando assim a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratamento desta doença e que visem o restabelecimento da resposta microbicida e melhora na qualidade de vida destes pacientes.

Uma marcante característica clínica apresentada por pacientes com deficiência de CD40L é a neutropenia crônica, manifestada de forma cíclica ou intermitente (57, 58). A etiologia da neutropenia nestes pacientes não é completamente conhecida, mas acredita-se que a ausência da interação do CD40L solúvel (CD40Ls) com células estromais da medula óssea possua relação com este achado clínico.

1.4 A interação CD40-CD40L na resposta imune

O CD40L, também conhecido como CD154, é uma proteína de membrana do tipo II pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) expressa na superfície celular como trímero. O gene do CD40L (CD40LG) está localizado no cromossomo X e é composto por cinco éxons que codificam a porção intracelular, transmembrana e extracelular da molécula (78) (Figura 3). O CD40L é altamente expresso por células TCD4+ e plaquetas após ativação, o qual pode ser clivado em sua forma CD40Ls e agir de maneira sistêmica (79), além de ser expresso em menor quantidade por células TCD8+, células natural killer (NK), células B, DCs e células endoteliais (4, 79).

Figura 3 - Esquema da estrutura do CD40LG.



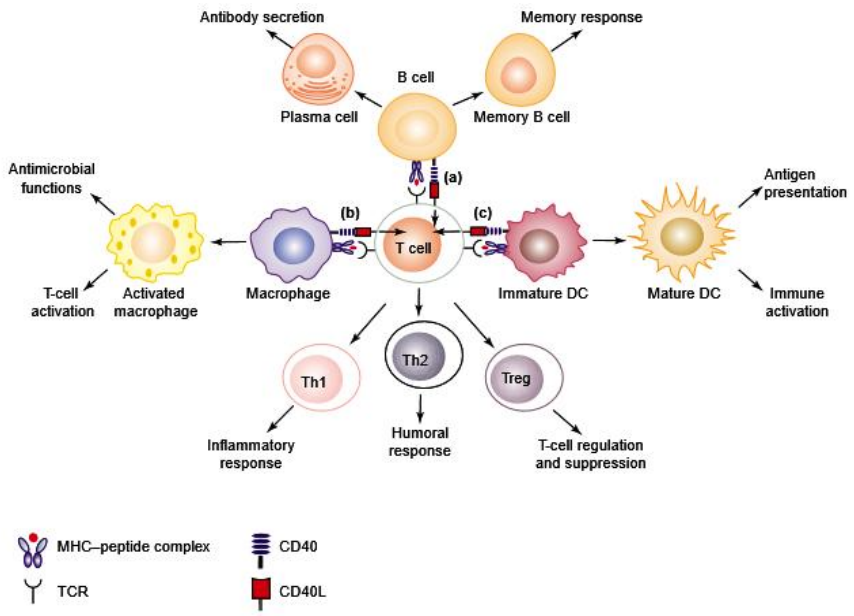
O CD40LG é formado por cinco éxons que formam o domínio intracelular (IC), transmembrana (TM) e extracelular (EC). Em células TCD4+ e plaquetas, a proteína pode ser clivada e gerar a isoforma solúvel do CD40L (79, adaptado).

O principal receptor do CD40L é o CD40, proteína transmembrana do tipo I pertencente à superfamília de receptores do TNF cujo gene encontra-se localizado no cromossomo 20 (80). O CD40 é constitutivamente expresso em células B, monócitos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, células endoteliais, células epiteliais, DCs, fibroblastos e adipócitos (4, 79). Após a interação com seu ligante, ocorre na porção citoplasmática do CD40 o recrutamento de proteínas adaptadoras do tipo TRAF, que iniciam diferentes vias de sinalização intracelulares, incluindo a ativação das vias de NF-ḳB, MAPKs, PI3K e PLCɣ. A sinalização pode também ocorrer através da ação de proteínas capazes de ligar diretamente à porção citoplasmática do CD40 ativado, como a Jak3, gerando subsequente ativação da via Jak-STAT (78, 81- 83). No entanto, outras moléculas com ligação no CD40L foram identificadas recentemente, como as moléculas αMβ2 ou Mac-1, αIIbβ3 e α5β1, reforçando a importância da sinalização pelo CD40L em diferentes contextos da resposta imune (84).

A sinalização CD40-CD40L exerce importantes efeitos em diversos tipos celulares (Figura 4**)**. Em células B, a sinalização promove a formação do centro germinativo, a troca de classe e hipermutação somática das Igs e a geração de células B de memória, razão pela qual pacientes deficientes de CD40L apresentam produção de anticorpos alterada (65). Em DCs, a sinalização pelo CD40 induz a produção de citocinas e a expressão de moléculas coestimulatórias, gerando sinais de maturação para que as DCs adquiram as características necessárias para a efetiva ativação das células T e desencadeamento da resposta imune adaptativa (86). Em fagócitos, a interação do CD40 com o CD40L induz a ativação de macrófagos e aumento da expressão de Mac-1 pelos neutrófilos. Além disso, estudos sugerem que a ligação do CD40Ls ao CD40 presente nos neutrófilos aumenta o burst oxidativo dos neutrófilos, contribuindo para a eliminação de microrganismos invasores (87- 89).

Outra importante função da sinalização CD40-CD40L ocorre na medula óssea. Células estromais da medula óssea expressam constitucionalmente o receptor CD40 em sua superfície e a ligação com o CD40Ls induz aumento a secreção de G-CSF e GM-CSF (do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), citocinas essenciais na regulação da granulopoiese (4). Além disso, o G-CSF na medula óssea suprime a expressão de CXCL-12 pelas células estromais, molécula envolvida na retenção de neutrófilos na medula óssea devido à sua interação com o receptor CXCR4 expresso nestas células, participando desta maneira da regulação do número de neutrófilos no sangue (90).

Figura 4 - A interação CD40-CD40L na resposta imune.



Células T expressando CD40L interagem com o CD40 expresso por células B e induz diferentes funções em células B, macrófagos e DCs (85).

A etiologia da neutropenia apresentada pelos pacientes com deficiência de CD40L não é completamente conhecida, mas acredita-se que a ausência da interação CD40Ls-CD40 na medula óssea durante a geração e maturação dos neutrófilos possua relação com esta característica hematológica (4), embora a influência da ausência desta interação durante a maturação dos neutrófilos sobre o perfil celular posteriormente apresentado permaneça não elucidada. Suportando esta teoria, estudos apontam que o tratamento com G-CSF recombinante resulta em contagens normais de neutrófilos em pacientes deficientes de CD40L (71, 72). O tratamento com G-CSF tem sido amplamente utilizado no tratamento de neutropenias de etiologias distintas e mostrou-se eficaz na reversão de neutropenias severas, embora não seja eficiente na correção de defeitos funcionais apresentado por estes neutrófilos (91).

1.5 Interferon-gama

Os interferons são uma grande família de citocinas estruturalmente relacionadas que medeiam a resposta imune natural e adquirida contra patógenos intra e extracelulares. Os

interferons são classificados nos tipos I, II e III e diferem entre si de acordo com a sequência do receptor, *locus* genético e células responsáveis pela sua produção (92). O interferon-gama (IFN-γ), também conhecido como interferon do tipo II, é uma proteína trimérica produzida principalmente pelas células NK, linfócitos T $CD4^+$ do subtipo Th1 e pelos linfócitos T $CD8^+$, e em menor proporção por macrófagos, DCs e células B (92, 93). A produção de IFN-γ, que se dá principalmente em resposta à citocina IL-12 secretada pelas células apresentadoras de antígenos, possui papel essencial na defesa do hospedeiro e regulação da resposta imune, apresentando atividade antiviral, antimicrobicida e antitumoral (94, 95). A via de sinalização JAK-STAT é a principal iniciada após a estimulação pelo IFN-γ, embora possa ocorrer também ativação de vias independentes de STAT-1, como a via das MAP kinase, PI3K e NF-ḳB (96).

Nos neutrófilos, as principais ações do IFN-γ são a estimulação da transdução de sinal, expressão gênica, liberação de citocinas e melhora de funções efetoras como burst oxidativo, fagocitose e citotoxicidade celular dependente de anticorpos, além de diminuir a taxa de apoptose dos neutrófilos (97). Uma vez que a principal função dos neutrófilos é a eliminação dos microrganismos invasores, diversos estudos investigaram a capacidade do IFN-γ modular esta função e mostram o IFN-γ como potente estimulador da atividade citotóxica (97), inclusive contra fungos oportunistas causadores de infecções em pacientes com deficiência de CD40L, como *A. fumigatus* (98), *C. albicans* (99, 100) e *P. brasiliensis* (101). Em concordância com estes resultados, estudo com neutrófilos de pacientes deficientes de CD40L tratados *in vitro* com IFN-γ recombinante mostrou melhora na geração de EROs e na capacidade microbicida (manuscrito em análise, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*).

Atualmente o IFN-γ é licenciado para a aplicação clínica em tuberculose, osteopetrose e defeitos do eixo IFN-γ / IL-12 (95). A principal indicação do IFN-γ é a DGC, com o objetivo de melhorar a função microbicida dos fagócitos e levando assim a melhora significativa na qualidade de vida do paciente, havendo redução de 70% na incidência de infecções graves (102, 103, 104). Tendo em vista a importância da resposta de neutrófilos contra patógenos invasores e a influência do IFN-γ na melhora da atividade microbicida e demais funções efetoras dos neutrófilos, o IFN-γ emerge como potencial ferramenta terapêutica para tratamento de doenças que apresentam como característica susceptibilidade aumentada a infecções possivelmente relacionadas a defeitos funcionais de neutrófilos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a geração de NETs em pacientes deficientes de CD40L e verificar a influência do tratamento *in vitro* com IFN-γ sobre esta resposta.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar em neutrófilos de pacientes deficientes de CD40L:

- Geração de NETs;
- Produção de EROs;
- Perfil de maturação;
- Efeito do tratamento *in vitro* com IFN-γ sobre as respostas avaliadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

O estudo utilizou amostras de sangue periférico de indivíduos sadios, sem a presença de doença infectocontagiosa ou congênita diagnosticada até o momento da coleta (grupo controle) e amostras de pacientes deficientes de CD40L previamente diagnosticados (105). As características moleculares das mutações genéticas dos pacientes selecionados para participar do estudo encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Pacientes envolvidos no estudo: mutações, histórico de infecções fúngicas e ensaios realizados.

Pct	Mutação	Tipo de mutação	Infecções fúngicas	Ensaios realizados		
				NETs	EROs	FEN
P1	c.633_634insAGCC	Inserção	N/I	x	x	x
P2	c.213_216delATAG	Deleção *frameshift*	*P. joroveci*	x		x
P3	c. 433 T>G	*Missense*	*P. joroveci*	x	x	x
P4	c. 213-1G>T	Sítio de *splice*			x	
P5	c. 213-1G>T	Sítio de *splice*	*P. joroveci*	x	x	x
P6	c. 475 G>A	*Nonsense*	Aspergilus sp. *C. albicans*		x	x
P7	c.213_216delATAG	Deleção *frameshift*	*C. albicans* *P. joroveci*	x		

Pct: paciente; N/I: Infecção do trato urinário por fungo não identificado; FEN: ensaio de fenotipagem para avaliar perfil de maturação.

As amostras de sangue destinadas ao desenvolvimento do protocolo experimental foram coletadas somente de pacientes em condições clínicas estáveis de saúde, evitando deste modo qualquer alteração no quadro clínico do paciente. A coleta de amostra de sangue dos indivíduos sadios ocorreu pareada a coleta dos pacientes, mantendo desta maneira as mesmas condições de coleta, armazenamento e transporte das amostras dos dois grupos.

Pacientes menores de idade estavam acompanhados dos pais ou responsáveis no momento da coleta, e a retirada de sangue só ocorreu após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todos os procedimentos realizados não ultrapassaram os limites descritos de risco mínimo, de acordo com a regulamentação da convenção de Genebra para pesquisa com seres humanos e do Conselho Nacional de Saúde. O projeto de pesquisa, o protocolo experimental e o termo de consentimento contemplaram os

quesitos éticos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB – USP.

3.2 Obtenção PMN de sangue periférico

Os PMNs humanos foram isolados a partir de sangue periférico coletado em tubo com heparina (BD Vacutainer, EUA) por sedimentação em Dextran (Sigma-Aldrich, EUA) seguido de centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Suiça). Resumidamente, 15-20 mL de sangue foram diluídos em 15 mL de Dextran 6% e sedimentados durante 25-30 minutos a 37 °C. A fração rica em leucócitos e pobre em eritrócitos (camada superior) foi colocada sobre 12 mL de Ficoll-Hypaque (densidade = 1,077 g/mL) e seguida de separação por centrifugação a 900 RCF (força centrífuga relativa, do inglês *relative centrifugal force*) durante 20 minutos sem freio. A camada superior foi então desprezada e a lise hipotônica das hemácias foi realizada pela adição de 3 mL de água destilada estéril gelada seguida da adição de 5 mL de PBS estéril (tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffered saline*) e centrifugação a 600 RCF durante 10 minutos. Os neutrófilos foram então ressuspendidos em meio RPMI 1640 (Life Technologies, EUA), sem vermelho de fenol, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor. A pureza da separação celular foi rotineiramente avaliada por citometria de fluxo, analisando-se os marcadores de superfície CD11b e CD16 (106) (ANEXO A).

3.3 Estimulação celular

Os estímulos utilizados nos protocolos experimentais, suas respectivas concentrações e breve descrição de suas atividades encontram-se na Tabela 4. As concentrações utilizadas nos protocolos experimentais foram definidas após ensaios de padronização com diferentes concentrações (dados não apresentados). Para verificar a toxicidade das concentrações de selecionadas, foi realizado ensaio de viabilidade celular pela utilização do reagente LIVE/DEAD® (Life Technologies) por citômetro de fluxo Atune NXT (Thermo Fisher Scientific), adaptados a partir das especificações do fabricante (ANEXO B).

Tabela 4 - Estímulos utilizados para a ativação/desafio dos neutrófilos

Composto	Concentração ou proporção	Descrição
PBS		Solução tamponada utilizada como controle negativo de estimulação
PMA	50 nM	Ativador de proteína quinase C (PKC) utilizado como estímulo para ativação
IFN-γ	100 ou 1000 UI/mL	Citocina importante para ativação de fagócitos
C. albicans	(MOI* 1:2)	Fungo causador de infecções oportunistas no grupo de pacientes em estudo

* multiplicidade de infecção (do inglês *multiplicity of infection*).

3.3.1 Cultivo de Candida albicans

As *C. albicans* foram cultivadas em tubo cônico de 50 mL com 5 mL de caldo Sabouraud a 37 °C pelo período de 14-16 horas, sob agitação. Após o período de cultura, as *C. albicans* foram centrifugadas a 900 RCF por 5 minutos, o sobrenadante descartado e resuspendidas em 1 mL de PBS para contagem do número de leveduras em câmara hemocitométrica. Uma vez que a geração de NETs frente ao patógeno mostrou-se dependente do tamanho e morfologia do patógeno, sendo a morfologia fúngica de hifa a ideal para indução de NETs (107), a capacidade das *C. albicans* em alternar sua morfologia de levedura para hifa após incubação com os neutrófilos foi avaliada. Para tanto, os neutrófilos foram pulsados com *C. albicans* na morfologia de levedura e a morfologia do fungo avaliada em diferentes tempos por microscopia de luz. A partir de 30 minutos as *C. albicans* iniciam a transição morfológica de levedura para hifa (formação de tubos germinativos), sendo que com 2 horas de cocultura com neutrófilos todas as *C. albicans* já adquirem a morfologia de hifa, condição ideal para o estudo (ANEXO C).

3.4 Avaliação da geração de NETs

3.4.1 Quantificação de NETs

A quantificação das NETs foi realizada em fluorímetro com leitor de microplacas como previamente descrito, com adaptações (108). Os neutrófilos (1 x 10^5 células) foram

tratados por 2 horas com IFN-ɣ e posteriormente estimulados com PMA ou *C. albicans* (concentrações descritas na Tabela 4), por período de 3 horas, em placa de 96 poços preta, estéril e com fundo transparente. Após tempo de estímulo, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e foi adicionado aos poços 50 µL de Sytox Orange na concentração de 5 µM (Life Technologies, EUA) durante 10 minutos, em temperatura ambiente e protegido de luz, para marcação do DNA extracelular. Após marcação, a placa foi imediatamente lida em fluorímetro Spectra Max M3 (Molecular Devices, EUA), utilizando comprimento de onda de excitação de 547 nm e detecção de 570 nm. Os resultados foram analisados em Software Prism 4.0 e expressos em Unidade Relativa de Fluorescência (RFU, do inglês *Relative Fluorescence Units*).

3.4.2 Visualização da formação de NETs

A visualização das NETs em microscópio de fluorescência foi realizada conforme previamente descrito, com adaptações (109) (ANEXO D). Resumidamente, os neutrófilos isolados (2 x 10^5 células) foram sedimentados por uma hora em lamínulas de 13 mm de diâmetro (Knittel Glass, Alemanha) em placas de 24 poços. Após sedimentação, as células foram tratadas por 2 horas com IFN-ɣ e posteriormente estimuladas com PMA ou *C. albicans* (concentrações descritas na Tabela 4) por 3 horas. Após tempo de estímulo, as células foram fixadas com paraformaldeído (4%) por 12 horas e então lavadas com PBS, permeabilizadas em solução de Triton X-100 (0,5%) e bloqueadas com Tampão de bloqueio (3% de soro humano AB, 1% de albumina sérica bovina, e 0,05% de Tween 20 em PBS) por 30 minutos a 37 °C. Após o bloqueio, as células foram incubadas com anticorpos primários anti-histona H2A/ H2B (doado por Prof. Arturo Zychlinsky, Max Planck Institute, Alemanha) e anti-elastase de neutrófilos (Calbiochem, USA) por 1 hora e marcadas com anticorpos secundários Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 546 (Invitrogen, USA), respectivamente, por 1 hora. Para marcação do DNA, foi utilizado Hoechst 33342 (Santa Cruz Biotec, USA). As lamínulas foram montadas em Mowiol sobre lâminas e analisadas em microscópio de fluorescência AXIO Vert A.1 (Carl Zeiss, Alemanha).

3.5 Avaliação da produção de EROs

A produção de EROs foi avaliada através de ensaio de quimioluminescência, como previamente descrito, com adaptações (110). Resumidamente, os neutrófilos (1 x 10^5 células) foram incubados em microplacas de 96 poços, brancas e de fundo chato, em volume final de 200µL de PBS por poço e suspensão celular tratada ou não com IFN-ɣ por 2 horas. Após tempo de tratamento, foram acrescentados aos poços PMA ou *C. albicans* (concentrações descritas na Tabela 4) e em seguida adicionado aos poços o substrato Luminol (100 µM, Sigma, EUA) para leitura imediata da placa. As reações foram monitorizadas por duas horas, a 37 °C, usando luminômetro de microplacas (EG&G Berthold LB96V, Alemanha). Os resultados foram analisados em software Prism 4.0, expressos em Unidades Relativas de Luz (URL) e posteriormente analisados de acordo com os valores de área sob a curva gerados (AUC, do inglês *Area Under Curve*).

3.6 Avaliação do perfil de maturação

O perfil de maturação celular foi avaliado pela quantificação da expressão das moléculas CD11b, CD15 e CD16, conforme previamente descrito (106). Para tanto, neutrófilos foram incubados com PBS contendo 10% de soro humano AB e 2% de SFB durante 10 minutos para evitar ligações não específicas. Após incubação, as células (5 x 10^5 células) foram incubadas com os anticorpos anti-CD15, anti-CD16 e anti-CD111b (BD Biosciences, EUA) por 30 minutos a 4 °C em ambiente escuro (em volume final de 100µL de RPMI) em tubos de poliestireno de 5 mL com fundo arredondado (tubos de citometria). Após tempo de incubação, as células foram lavadas duas vezes com 500 µL de PBS (centrifugação a 900 RCF por 5 minutos) e fixadas em PBS contendo paraformaldeído (0,5%). A análise foi realizada em citômetro de fluxo Atune NxT (Thermo Fisher Scientific, USA). A população das células analisadas foi determinada em escala linear utilizando os parâmetros de tamanho celular (FSC, do inglês *foward scater*) *versus* complexidade celular (SSC, do inglês *side scater*). Após a seleção da população celular, fez-se a aquisição de 10.000 eventos em cada amostra para avaliação dos marcadores. Para a análise utilizou-se o software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA). A partir desta análise, foram obtidos dados de mediana da intensidade de fluorescência (MFI, do inglês *Median Fluorescence Intensity*).

3.7 Análise estatística

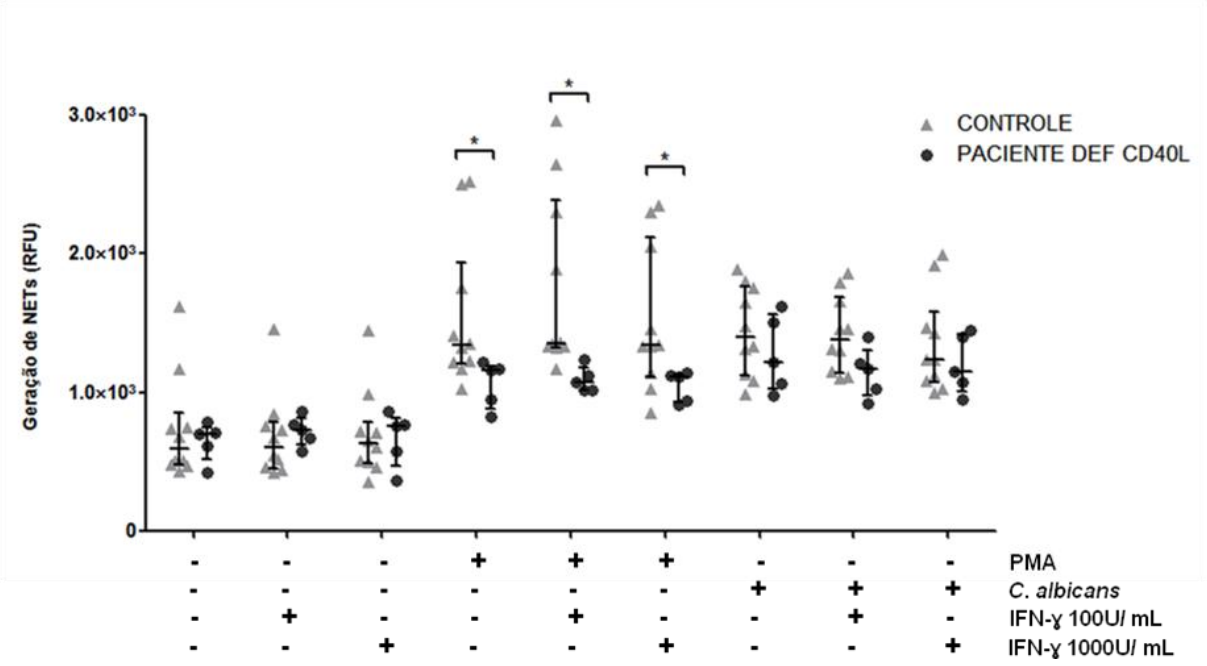
As análises estatísticas foram realizadas com o software Prism 5.00 (GraphPad Software, USA). Após aplicação de teste de normalidade (D'Agostino-Pearson) verificamos o teste estatístico mais indicado. Devido à distribuição amostral apresentada e ao número de análises realizadas, foi aplicado o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre os grupos avaliados no estudo (indivíduos saudáveis *versus* pacientes deficientes de CD40L). Para comparar o efeito do tratamento celular dentro do mesmo grupo de indivíduos empregou-se o teste pareado não paramétrico de Wilcoxon. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da geração de NETs

A quantificação da geração de NETs foi realizada após estimulação dos neutrófilos por 3 horas com PMA ou *C. albicans*. A geração de NETs pelos neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L mostrou-se significativamente reduzida em comparação com indivíduos saudáveis após estímulo com PMA (Figura 5). A geração de NETs frente ao estímulo com *C. albicans* não mostrou diferença estatisticamente significativa, quando comparados pacientes e indivíduos saudáveis. O tratamento com IFN-ɣ não influenciou o padrão de resposta apresentado por ambos os grupos avaliados.

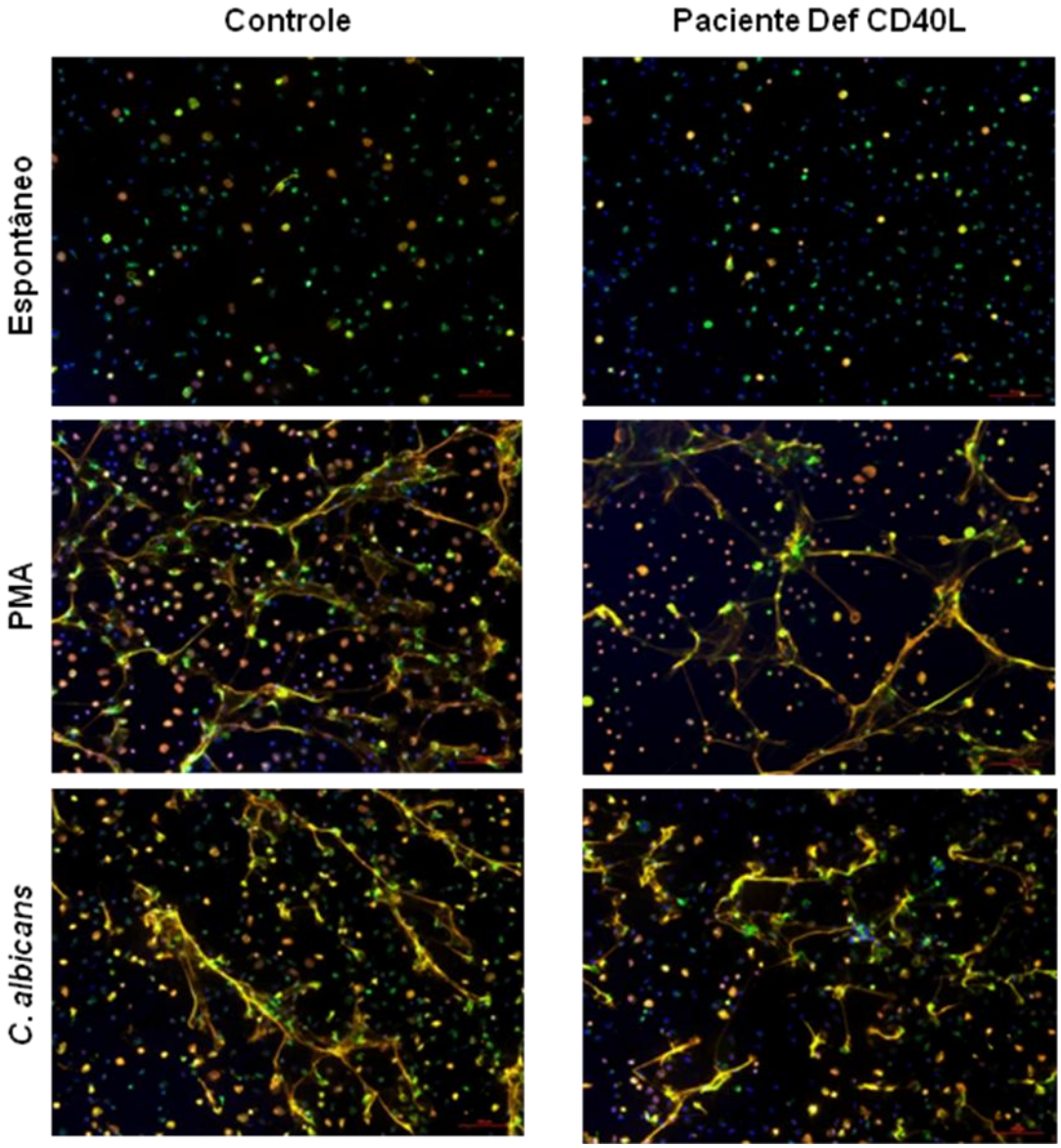
Figura 5 – Avaliação da geração de NETs em pacientes deficientes de CD40L.



Os neutrófilos (1 x 10^5 células) foram tratados com IFN-ɣ nas concentrações indicadas por 2 horas em estufa de CO_2 a 37 °C. Após tempo de tratamento, foram adicionados aos poços indicados PMA ou *C. albicans* e os neutrófilos incubados pelo período de 3 horas em estufa para geração de NETs. Quantificação da geração de NETs realizada em fluorímetro após marcação com reagente SYTOX Orange®. A geração de NETs pelos neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L mostrou-se significativamente reduzida em comparação com indivíduos saudáveis após o estimulo com PMA. *$p<0,05$ dentre os grupos comparados, teste de Mann-Whitney. n=10, indivíduos saudáveis (CONTROLE); n= 5, pacientes deficientes de CD40L (PACIENTE DEF CD40L).

Confirmando resultados obtidos na quantificação em fluorímetro, avaliação por microscopia de fluorescência mostrou redução na geração de NETs pelos neutrófilos dos pacientes quando comparados com indivíduos saudáveis estimulados com PMA (Figura 6), sendo que o tratamento com IFN-ɣ não influenciou no padrão de resposta apresentado por ambos os grupos avaliados (imagens não apresentadas).

Figura 6 - Visualização da formação de NETs pelos pacientes deficientes de CD40L.

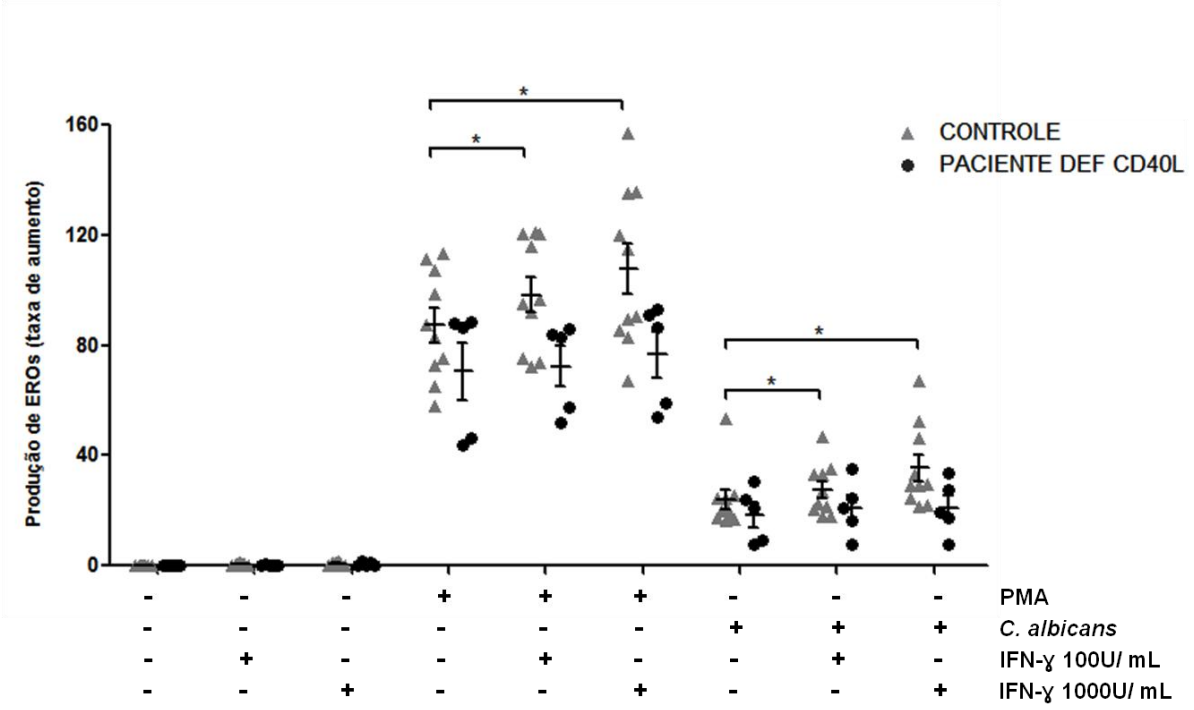


Os neutrófilos (2 x 10^5 células) de indivíduos saudáveis (Controle) e pacientes deficientes de CD40L (Paciente Def CD40L) foram tratados com IFN-ɣ por 2 horas em estufa de CO_2 a 37 °C. Após tempo de tratamento, os neutrófilos foram estimulados com PMA ou *C. albicans* pelo período de 3 horas em estufa para geração de NETs, seguido de fixação, permeabilização celular e marcação de NETs com anticorpos anti-histona H2A/H3B (laranja) e anti-elastase de neutrófilo (verde), além de marcação do DNA com Hoechst 33342 (azul). A geração de NETs pelos neutrófilos dos pacientes mostrou-se reduzida em comparação com os indivíduos saudáveis após o estimulo com PMA. Figura representativa de 3 experimentos independentes.

4.2 Avaliação da produção de EROs

As EROs foram descritas como essenciais para a geração de NETs pelo estímulo com PMA (40), A avaliação da produção de EROs foi realizada pelo estímulo dos neutrófilos com PMA ou *C. albicans*, com ou sem pré-tratamento com IFN-ɣ, e geração monitorada pelo período de 2 horas em luminômetro. A partir da cinética da produção de EROs (dado não apresentado), a produção total de EROs foi quantificada pelo cálculo de AUC. Valores expressos gerados a partir do cálculo da taxa de aumento da produção de EROs nos diferentes tratamentos em comparação com a geração espontânea de cada indivíduo avaliado (Figura 7).

Figura 7 - Avaliação da produção de EROs em pacientes deficientes de CD40L.



Os neutrófilos (1 x 10^5 células) foram incubados com IFN-ɣ nas concentrações indicadas por 2 horas em estufa de CO_2 a 37 °C. Após tempo de tratamento, foram adicionados aos poços indicados PMA ou *C. albicans* e geração de EROs monitorada por período de 2 horas em luminômetro. A produção de EROs não apresentou diferença significativamente estatística quando comparados pacientes e indivíduos saudáveis. Neutrófilos de indivíduos saudáveis apresentaram aumento significativo na geração de EROs após tratamento com IFN-ɣ, padrão não observado nos pacientes avaliados. *$p<0,05$ dentre os tratamentos comparados, teste de Wilcoxon. n=10, indivíduos saudáveis (CONTROLE); n= 5, pacientes deficientes de CD40L (PACIENTE DEF CD40L).

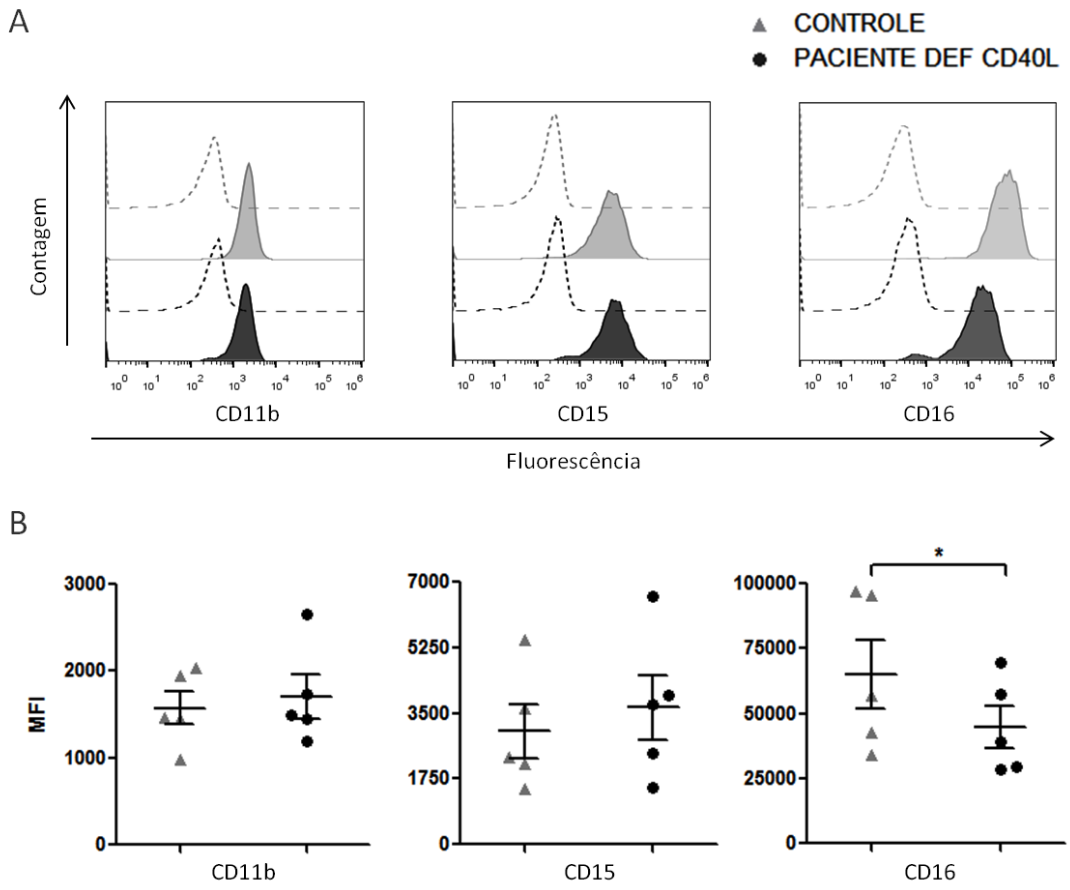
A produção de EROs frente aos estímulos com PMA e *C. albicans* não apresentou diferença significativamente estatística, quando comparados indivíduos saudáveis e pacientes deficientes de CD40L. Os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L não responderam ao tratamento com IFN-ɣ, ao contrário do observado em neutrófilos de indivíduos saudáveis

que apresentaram aumento significativo na produção de EROs quando desafiados com PMA ou *C. albicans* após tratamento de 2 horas com IFN-ɣ.

4.3 Avaliação do perfil de maturação dos neutrófilos

Uma vez que pacientes deficientes de CD40L apresentam defeito na granulopoiese e episódios de neutropenia recorrentes, o perfil de maturação dos neutrófilos periféricos foi avaliado pela quantificação da expressão das moléculas de superfície CD11b, CD15 e CD16 (Figura 8).

Figura 8 - Avaliação do perfil de maturação dos neutrófilos de pacientes deficientes de CD40L.



Os neutrófilos (5 x 10^5 células/mL) de indivíduos saudáveis (CONTROLE) e de pacientes deficientes de CD40L (PACIENTE DEF CD40L) foram marcados para as moléculas de superfície CD11b, CD15 e CD16. (A) Histograma representativo da expressão das moléculas CD16, CD15 e CD11b por indivíduos saudáveis e pacientes deficientes de CD40L. (B) Gráfico de expressão das moléculas CD16, CD15 e CD11b em indivíduos saudáveis e pacientes expressos em MFI. A expressão da molécula CD16 mostrou-se reduzida em pacientes em comparação com indivíduos saudáveis, fenótipo $CD15^+$ $CD11b^+CD16^-$ característico de neutrófilos imaturos. *$p<0,05$ dentre os grupos comparados, de teste de Mann-Whitney. n=5, para ambos grupos avaliados.

Os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L apresentaram expressão reduzida da molécula CD16, quando comparados com expressão dos neutrófilos de indivíduos saudáveis. Contudo, apresentaram expressão similar das moléculas CD15 e CD11b (perfil $CD15^{+}CD11b^{+}CD16^{-}$), padrão de expressão característico de neutrófilos imaturos (106).

5 DISCUSSÃO

Pacientes portadores da X-HIGM, imunodeficiência rara causada pela deficiência do CD40L, apresentam grande susceptibilidade a infecções por diversas classes de microrganismos, sendo que infecções oportunistas causadas por fungos representam significante causa de morbidade e mortalidade mesmo em pacientes em tratamento com os protocolos medicamentosos atualmente utilizados. Uma vez que as respostas de neutrófilos apresentam grande importância para o controle de infecções fúngicas (50- 52) e estudo que aponta a influência da interação CD40-CD40L na granulopoiese (111), o presente trabalho teve como objetivo investigar se a suscetibilidade aumentada a infecções em pacientes com deficiência de CD40L poderiam estar relacionadas a defeitos na formação de NETs, mecanismo importante na resposta contra patógenos extracelulares, além de verificar o efeito do tratamento *in vitro* com IFN-γ sobre essa resposta.

Diversos estudos indicam que as NETs estão presentes em grande quantidade nos sítios inflamatórios e são produzidas por neutrófilos ativados pelo contato com diversos patógenos, inclusive patógenos aos quais pacientes deficientes de CD40L são suscetíveis como *C. albicans* (112, 113) e *A. fumigatus* (114, 115), além de serem geradas pela ativação com diversos compostos químicos e produtos biológicos (23; Tabela 1). Assim, o presente estudo avaliou a geração de NETs a partir de neutrófilos pulsados com o fungo *C. albicans* ou ativados com o composto químico PMA, indutor clássico da geração de NETs (22). A geração de NETs após estímulo com PMA mostrou-se reduzida nos pacientes deficientes de CD40L em comparação com indivíduos saudáveis, embora a geração de NETs em resposta a *C. albicans* não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa, quando comparados pacientes e indivíduos saudáveis (Figura 5 e 6).

Além de ser importante mecanismo de resposta dos neutrófilos frente aos patógenos, diversos estudos apontam as EROs como fator essencial para geração de NETs (22, 43, 44), fato corroborado por estudos em pacientes com DGC, IDP causada por mutações em componentes da NADPH-oxidase que apresentam defeitos na geração de EROs e ausência da geração de NETs (35, 36, 37, 116, 117). Assim, para verificar se a diminuição na geração de NETs observada nos pacientes deficientes de CD40L estaria relacionada a defeitos na explosão respiratória dos neutrófilos, a produção de EROs foi quantificada por ensaio de quimioluminescência. Os resultados indicam que a diminuição na geração de NETs apresentada pelos pacientes deficientes de CD40L não decorre de defeitos na geração de EROs, uma vez que produção de EROs frente aos estímulos com PMA e *C. albicans* não

apresentou diferença significativamente estatística, quando comparados indivíduos saudáveis e pacientes deficientes de CD40L (Figura 7). Além disso, a ativação adequada da explosão respiratória por neutrófilos estimulados com PMA descarta a possibilidade de defeitos na via de sinalização da PKC, uma vez que a diminuição de resposta pela ativação da via mostrou-se específica para geração de NETs.

Estudos indicam que o IFN-ɣ atua de maneira significativa sobre os neutrófilos em sua fase de produção e estágios de diferenciação na medula (118), na expressão gênica dos neutrófilos (119, 120) ou potencializando respostas efetoras importantes na resposta contra patógenos (98, 118, 121, 122), mostrando-se eficaz para redução do número de infecções severas em pacientes sob tratamento (103, 123). O presente estudo avaliou a influência do tratamento *in vitro* com IFN-ɣ sobre a geração de NETs, mecanismo ainda não descrito na literatura. Na contramão dos estudos que mostram a influência do IFN-ɣ sobre respostas efetoras de neutrófilos, os resultados obtidos mostram que o pré-tratamento dos neutrófilos com IFN-ɣ não influenciou no padrão de geração de NETs em ambos os grupos avaliados no estudo (indivíduos saudáveis e pacientes deficientes de CD40L; Figura 5). Uma possível hipótese para o resultado obtido é que devido ao tratamento com IFN-ɣ ter sido realizado em neutrófilos que já concluíram o processo de diferenciação e maturação que sofrem na medula óssea, estes neutrófilos podem já apresentar possíveis defeitos gerados em decorrência de alterações durante o processo de desenvolvimento e maturação, defeitos estes não corrigíveis pelo tratamento com IFN-ɣ. Assim, é necessário estudos que visem avaliar a influencia do IFN-ɣ sob a diferenciação/maturação dos neutrófilos e o padrão de resposta apresentado pelos neutrófilos quando estes sob a influencia do IFN-ɣ durante sua geração.

A avaliação do efeito do IFN-ɣ sobre a geração de EROs mostrou que os neutrófilos de indivíduos saudáveis apresentaram aumento significativo na produção de EROs frente a estimulação com PMA ou *C. albicans* quando os neutrófilos foram pré-tratados com IFN-ɣ (Figura 7), resultados que vão de acordo com a literatura disponível (98, 119, 121, 122). No entanto, os pacientes deficientes de CD40L não foram capazes de responder ao tratamento com IFN-ɣ como observados nos indivíduos saudáveis, mantendo resposta similar em comparação com neutrófilos desafiados sem o pré-tratamento (Figura 7).

A sinalização pelo IFN-ɣ é gerada pela ativação de receptor de superfície celular e resulta na ativação de vias intracelulares que culminam na transcrição de genes mediadores de respostas biológicas (96). A via de sinalização intracelular do IFN-ɣ melhor caracterizada é a via JAK-STAT, que leva à fosforilação e translocação nuclear do fator transcricional STAT1 (96, 124). Estudo sobre a expressão gênica de neutrófilos em diferentes estágios de

diferenciação desenvolvidos por Martinelli e colaboradores (106) mostraram que neutrófilos maturos apresentam expressão aumentada de genes relacionados a sinalização e resposta aos IFNs tipo I e II em comparação a expressão por neutrófilos imaturos. O mesmo estudo revelou que os IFNs são fortes indutores da fosforilação de STAT 1 em neutrófilos maturos, padrão não observado em neutrófilos imaturos. Desta maneira, evidências apontam que a transdução de sinal e ativação celular pelo IFN-γ é mais eficiente em neutrófilos maduros em comparação com neutrófilos imaturos.

Uma vez que os neutrófilos de pacientes deficientes de CD40L não mostraram resposta ao tratamento com IFN-γ, mantendo similar a produção de EROs após o tratamento e em oposição ao aumento na produção observado em neutrófilos de indivíduos saudáveis (Figura 7), levantou-se a suspeita de que esta ausência de resposta ao IFN-γ poderia estar relacionada a presença de neutrófilos periféricos imaturos nos pacientes. Assim, o perfil de maturação dos neutrófilos foi investigado pela avaliação das moléculas de superfície CD15, CD16 e CD11b, como previamente descrito (106). Confirmando suspeita, a avaliação revelou que os neutrófilos dos pacientes deficientes de CD40L apresentaram expressão significativamente reduzida da molécula CD16 quando comparados com expressão de indivíduos saudáveis, embora tenham apresentado expressão similar das moléculas CD15 e CD11b (perfil $CD15^{+}CD11b^{+}CD16^{-}$), padrão de expressão característico de neutrófilos imaturos (Figura 8), em concordância com estudos que apontam maturação da linhagem mielocítica interrompida no estágio pró-mielócito/mielócito na medula óssea de alguns pacientes (56, 58).

Neutrófilos imaturos apresentam comprometimento de diversas funções, uma vez que a expressão gênica de receptores de anticorpos (p. ex. CD16), citocinas, quimiocinas, assim como moléculas envolvidas na transdução de sinal ocorre durante estágios de diferenciação terminal destas células (106). Diversos mecanismos podem estar afetados em neutrófilos imaturos, como diminuição na expressão de receptores de reconhecimento e capacidade reduzida de interação com bactérias (125), diminuição na fagocitose e sinalização de Ca^{+} (126), resistência a apoptose espontânea (127) e diminuição da capacidade migratória frente a diferentes estímulos (128), embora os mecanismos afetados sejam diferentes dentre as condições patológicas avaliadas, sugerindo que o mecanismo alterado que leva à imaturidade influencie no perfil de resposta subsequentemente apresentado. Além disso, estudos indicam que neutrófilos imaturos apresentam redução na geração de NETs (106, 129, 130). Estes dados levantam fortes indícios que a diminuição na geração de NETs apresentada pelos

pacientes deficientes de CD40L (Figuras 5 e 6) está possivelmente relacionada com a imaturidade apresentada pelos neutrófilos dos pacientes (Figura 8).

Uma vez que pacientes com deficiência de CD40L apresentam expressão normal de CD40, tanto em linfócitos B quanto em neutrófilos (ANEXO E), acredita-se que os defeitos apresentados não estejam relacionados à sinalização direta pela interação CD40L-célula. Tendo em vista que a ausência da sinalização pelo CD40L resulta em desregulação no processo de granulopoiese, como ilustrado pela neutropenia recorrente em pacientes com deficiência de CD40L, acredita-se que a influência da sinalização pelo CD40L sobre os neutrófilos seja a nível medular. Na medula óssea, a interação do CD40Ls secretado por plaquetas e linfócitos B com o CD40 expresso de maneira constitucional por células estromais da medula óssea induzem a secreção dos fatores de crescimento G-CSF e GM-CSF, citocinas centrais no processo de granulopoiese (4). Assim, acredita-se que a ausência da interação CD40-CD40Ls e consequente alteração na produção de fatores essenciais para geração e maturação de neutrófilos resultam em alterações no microambiente medular durante o processo de granulopoiese levando a liberação de neutrófilos com maturação incompleta, apresentando perfil celular e padrão de resposta alterados. As consequências da ausência da interação CD40-CD40L na medula óssea durante a maturação dos neutrófilos sobre o perfil celular posteriormente apresentado ainda necessitam de maior investigação.

Nossos dados indicam que a diminuição na geração de NETs pode estar relacionada a presença de neutrófilos periféricos imaturos, consequência da ausência da sinalização CD40-CD40Ls na medula óssea durante o processo de granulopoiese. Além disso, a ausência de resposta ao tratamento celular com IFN-ɣ em pacientes deficientes de CD40L sugerem defeitos na via de sinalização do IFN-ɣ nos neutrófilos, levantando a possibilidade da existência outros defeitos ainda não descritos. Os resultados obtidos contribuem para a elucidação dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na maior suscetibilidade a infecções em pacientes com deficiência de CD40L, além de melhor entendimento sobre a função da interação CD40-CD40Ls na medula óssea e sua influência na resposta imune. Ademais, o avanço no conhecimento associado ao estudo do efeito do tratamento com IFN-γ possibilita o desenvolvimento e implantação de novas estratégias terapêuticas que visem melhora na qualidade de vida dos pacientes afetados pela síndrome.

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no estudo nos permitem concluir que:

- Pacientes deficientes de CD40L apresentam diminuição na geração de NETs pelo estímulo com PMA;
- Redução na geração de NETs em pacientes deficientes de CD40L não está relacionada a defeitos na produção de EROs;
- Pacientes deficientes de CD40L apresentam neutrófilos periféricos com perfil de maturação incompleta.

REFERÊNCIAS*

1. ETHUIN, F., et al. Human neutrophils produce interferon-γ upon stimulation by interleukin-12. **Lab Invest**, v. 84, n. 10, p. 1363–1371, 2004.

2. BENNOUNA, S., et al. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. **J. Immuno,**.v. 171, n. 11, p. 6052–6058, 2003.

3. CHERTOV, O., et al. Identification of human neutrophilderived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. **J Exp Med,** v. 186, n. 5, p. 739–747, 1997.

4. MAVROUDI, I., et al. The role of CD40/CD40 Ligand Interactions in Bone Marrow Granulopoiesis. **Scientific World Journal**, v. 11, p. 2011-2019, 2011.

5. LIU, F., et al. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. **Immunity**, v. 5, n. 5, p. 491–501, 1996.

6. LIESCHKE, G., et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. **Blood**, v. 4, n. 6, p. 1737–1746, 1994.

7. ROBERTS, A. G-CSF: A key regulator of neutrophil production, but that's not all! **Growth Factors**, v. 23, n. 1, p. 33-41, 2005.

8. FAURSCHOU, M., et al. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**, v. 5, p. 1317-1327, 2003.

9. THEILGAARD-MONCH, K., et al. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. **Curr Opin Immunol**, v. 18, p. 54-60, 2006.

10. MÓCSAI, A.. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. **J Exp Med**, v. 210, n. 7, p. 1283-1299, 2013.

11. SADIK, C., et al. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends Immunol**, v. 32, n. 10, p. 452-460, 2011.

12. KOLACZKOWSHA, E., et al. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature**, v. 13,n. 3, p. 159-175, 2013.

13. ELSBACH, P., et al. Oxygen-independent antimicrobial systems of phagocytes. **Inflammation**, v. 2, n. 3, p. 603-636, 1992.

---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

14. BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity,** v. 33, n. 5, p. 657-670, 2010.

15. HAGER, M., et al. Neutrophil granules in health and disease. **J Intern Med**, v. 268, n. 1, p. 25-34, 2010.

16. DALE, D., et al. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935-945, 2008.

17. WEISS, S. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl J Med**, v. 320, n. 6, p. 365-376, 1989.

18. SELSTED, M., et al. Primary structures of three human neutrophil defensins. **J Clin Invest**, v. 76, n. 4, p. 1436-1439, 1985.

19. PRUCHNIAK, M., et al. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular traps. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 187, n. 1, p. 68-73, 2013.

20. ARRUDA , M., et al. NADPH oxidase activity: in the crossroad of neutrophil life and death. **Front Biosci**, v. 14, p. 4546-4556, 2009.

21. DAHLGREN, C., et al. Respiratory burst in human neutrophils. **J Immunol Methods**, v. 233, p. 3-14, 1999.

22. BRINKMANN, V., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p.1532-1535, 2004.

23. ZAWROTNIAK, M., et al. Neutrophil extracellular traps (NETs)- formation and implications. **Acta Biochim Pol**, v. 60, n. 3, p. 277-284, 2013.

24. YANG, H., et al. New insights into neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in inflammation. **Front Immunol**, v. 7, p. 302-310, 2016.

25. TILLACK, K., et al. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses**. J Immunol**, v. 188, n. 7, p.3150–3159, 2012.

26. FARRERA, C., et al. Macrophage clearence of neutrophil extracellular traps is a silent process. **J Immunol**, v. 191, n. 5, p. 2647-2656, 2013.

27. BARRIENTOS, L., et al. Neutrophil extracellular traps Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Activation of Monocyte-Derived Dendritic cells. **J Immunol**, v. 19, n. 11, p. 5689-5698, 2014.

28. LANDE, R., et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. **Sci Transl Med**, v. 3, n. 73, p. 73ra19, 2011.

29. WARNATSCH, A., et al. Neutrophil extracellular traps license macrophages and Th17 cells for cytokine production in atherosclerosis. **Science**, v. 349, n. 6245, p. 316-320, 2015.

30. LIN, A., et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. **J Immunol**, v. 187, n. 1, p. 490-500, 2011.

31. SIMON, D., et al. Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases. **Allergy**, v. 68, n. 4, p. 409-416, 2013.

32. BARNADO, A., et al. At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune disease. **J Leuk Biol**, V. 99, n. 2, p. 265-278, 2016.

33. MITSIOS, A., et al. NETopathies? Unraveling the dark side of odl diseases through neutrophils. **Front Immunol**. v. 7, 678.

34. PILSCZEK, F., et al. A novel mechanism of rapid nuclear Neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. **J Immunol**, v. 185, n. 12, p. 7413-7425, 2010.

35. YOUSEFI, S., et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death Differ**, v. 16, n.11, p. 1438-1444, 2009.

36. FUCHS, T., et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol**, v. 176, n. 2, p. 231-241, 2007.

37. BIANCHI, M., et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspegillosis. **Blood,** v. 114, n. 13, p. 2619-2622, 2009.

38. PARKER, H., et al. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. **J Leukoc Biol**, v. 92, n. 4, p. 841-849, 2012.

39. ARAI, Y., et al. Uric acid induces NADPHoxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 443, n. 2, p. 556–561, 2014.

40. STOIBER, W., et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the formation of estracellular traps (ETs) in humans. **Biomolecules**,v. 5, p. 702-723, 2015.

41. LI, P., et al. PAD-4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. **J Exp Med**, v. 207, n. 7, p. 1053-1062, 2010.

42. HAKKIM, A., et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. **Nat Chem Biol**, v. 7, n. 2, p. 75-77, 2011.

43. PAPAYANNOPOULOS, V., et al. Neutrophil elastase and mieloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol**, v. 191, n. 3, p. 677-691, 2010.

44. METZLER, K., *et al*. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular traps formation: implications for innate immunity. **Blood**, v. 117, n. 3, p. 953-959, 2011.

45. BRINKMANN, V., et al. Neutrophil extracellular traps: Is the immunity the second function of chromatin? **J Cell Biol**, v. 198, n. 5, p. 773-783, 2012.

46. BRANZK, N., et al. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. **Semin Immunophathol**, v. 35, n. 4, p. 513-530, 2013.

47. BEITER, T., et al. Neutrophil Extracellular Traps: A Walk on the Wild Side of Exercise Immunology. **Sports Med**, v. 45, n. 5, p. 625-640, 2015.

48. LÖGTERS, T., et al. The clinical value of neutrophil extracellular traps. **Med Microbiol Immunol**, v. 198, n. 4, p. 211-219, 2009.

49. YOST, C., et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6419-6427, 2009.

50. BRAKHAGE. A., et al. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 4, p. 409-415, 2010.

51. ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Rev**, v. 11, n. 1, p. 275-288, 2004.

52. ERWIG, L., et al. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nature Rev Microbiol**, v. 14, n. 3, p. 163-173, 2016.

53. KUFE, D., et al. Holland-Frei Cancer Medicine. 6 ed. **Hamilton** (ON): BC Decker. 2003. 2900 p.

54. NETH, O., et al. Susceptibility to infection in patients with neutropenia: the role of the innate immune system. **Br J Haematol**, v. 129, n. 6, p. 713-722, 2005.

55. WALKOVICH, K., et al. How to approach neutropenia in childhood. **Pediatr Rev**, v. 34, n. 4, p.173-184, 2013.

56. JASINSKA, A., et al. Successful haploidentical PBSCT with subsequent T-cell addbacks in a boy with HyperIgM syndrome presenting as severe congenital neutropenia. **Pediatr Transplantation**, v. 17, n. 1, p. 37-40, 2013.

57. REAZEI, N., et al. Neutropenia in patients with prymary antibody deficiency disorders. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 3, n. 2, p. 77-81, 2004.

58. LEVY, J., et al. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. **J Pediatr**, v. 131, n. 1, p. 47-54, 1997.

59. NOTARANGELO, L., et al. Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). **Immunodefic Ver**, v. 3, n. 2, p. 101-121, 1992.

60. DAVIES, E., et al. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. British **J Haematol**, v. 149, n. 2, p. 167-180, 2010.

61. QAMAR, N., et al. The hyper IgM syndromes. **Clinic Rev Allerg Immunol**. v. 46, n 2, p. 120-130, 2014.

62. TSAI, H., et al. X-linked hyper-IgM syndrome with CD40LG mutation: two case reports and literature review in Taiwanese patients. **J Microb**, v. 20, n. 1, p. 113-118, 2015.

63. ROSEN, F., et al. Recurrent bacterial infections and dysgammaglobulinemia: deficiency of &S gammaglobulins in the presence of elevated 19S gamma-globulins. Report of two cases. **Pediatrics,** v. 28, p. 182-195, 1961.

64. BURTIN, P. Um example d'agammaglobulinemie atypique. **Ver Franc Étud Clin Biol**, v. 6, p. 286-289, 1961.

65. SCHNEIDER, L. X-Linked hyper IgM syndrome. **Clin Ver Allergy Immunol**, v. 19, n. 2, p. 205-215, 2000.

66. HEINOLD, A., et al. Pitfalls of ''hyper'-IgM syndrome: a new CD40 ligand mutation in the presence of low IgM levels. A case report and a critical review of the literature. **Infection**, v. 38, n. 6, p. 491-496, 2010.

67. ALLEWELT, H., et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for CD40 Ligand Deficiency: Single Institution Experience. **Pedriatr Blood Cancer**, v. 62, n. 12, p. 2216-2222, 2015.

68. WINKELSTEIN, J., et al. The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients. **Medicine**, v. 82, n. 6, p. 373–384, 2003.

69. DE LA MORENA, M., et al. Long-term outcomes of 176 patients with X-linked hyper-IgM syndrome treated with or without hematopoietic cell transplantation. **J Allergy Clin Immunol**. pii: S0091-6749, 2016.

70. CABRAL-MARQUES O, et al. Expanding the clinical and genetic spectrum of human CD40L deficiency: the occurrence of paracoccidioidomycosis and other unusual infections in brasilian patients. **J Clin Immunol**.,v. 32, n. 2, p. 212-220, 2012.

71. WANG. W., et al. Successful treatment of neutropenia in the hyperimmunoglobulin M syndrome with granulocyte colony-stimulating factor. **Am J Pediatr Hematol Oncol,** v. 259, n. 5097, p. 990-993, 1994.

72. MORI, M., et al. Mutation analysis and therapeutic response to granulocyte colony-stimulating factor in a case of hyperimmunoglobulin M syndrome with chronic neutropenia. **J Padiatr Hematol Oncol**, v. 22, n. 3, p. 288-289, 2000.

73. GENNERY, A., et al. Treatment of CD40 ligand deficiency by hematopoietic stem cell transplantation: A survey of the European experience, 1993-2002. **Blood**, v. 103, n. 3, p. 1152–1157, 2004.

74. TOMIZAWA, D., et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for seven children with X-linked hyper-IgM syndrome: A single center experience. **Am J Hematol**, v. 76, p. 33–39, 2004.

75. COSTA-CARVALHO, B., et al. Latin American challenges with the diagnosis and ytreatment of primary immunodeficiency diseases. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 21, p. 1-7, 2016.

76. CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Key aspects for successful immunoglobulin therapy of primary immunodeficiences. **Clin Exp Immunol**, v. 164, n. 2, p. 16-19, 2011.

77. AGHAMOHAMMADI, A., et al. Clinical and laboratory findings in hyper-IgM syndrome with novel CD40L and AICDA mutations. **J Clin Immunol**, v. 29, n. 6, p.769-776, 2009.

78. KOOTEN, C., et al. CD40-CD40 ligand. **J Leuk Biol**, v. 67, n. 1, p. 2-17, 2000.

79. ALOUI, C., et al. The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 12, p. 2242-2264, 2014.

80. RAMESH, N., et al. Chromosomal localization of the gene for human B-cell antigen CD40. **Somat Cell Mol Genet**, v. 19, n. 3, p. 295–298, 1993.

81. HSING, Y., et al. Characterization of CD40 signaling determinants regulating nuclear factor-kappa B activation in B lymphocytes. **J Immunol**, v. 159, n. 10, p. 4898–4906, 1997.

82. KARRAS, J., et al. Induction of STAT protein signaling through the CD40 receptor in B lymphocytes: distinct STAT activation following surface Ig and CD40 receptor engagement. **J Immunol**. V. 159, n. 7, p. 4350–4355, 1997.

83. BISHOP, G., et al. TRAF proteins in CD40 signaling. **Adv Exp Med Biol**, v. 597, p. 131–151, 2007.

84. HASSAN, G., et al. CD40 Ligand: A neo-in flammatory molecule in vascular diseases. **Immunobiol**, v. 217, n. 5, p. 521-532, 2012.

85. MATHUR, R., et al. The conundrum of CD40 funnction: host protection or disease promotion? **Trends Parasitol**, v. 22, p. 117-122, 2006.

86. ELGUETA, R., et al. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. **Immunol Ver**, v. 229, n. 1, p. 1-31, 2009.

87. LI, G., et al. CD40 Ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. **Am J Pathol**, v. 172, n. 4, p. 1141-1152, 2006.

88. VANICHAKARN, P., et al. Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation. **Thromb Research**, v. 122, n. 3, p. 346-358, 2008.

89. JIN, R., et al. Soluble CD40 Ligand stimulates cd40-dependent activation of the β2 integrin Mac-1 and protein kinase C zeda (PKCζ) in neutrophils: implications for neutrophil platelet interactions and neutrophil oxidative burst. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e64631, 2013.

90. NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 3, p. 173-182, 2006.

91. DONINI, M., et al. G-CSF treatment of severe congenital neutropenia reverses neutropenia but does not correct the underlying functional deficiency of the neutrophil in defending against microorganisms. **Blood**, v. 109, n. 11, p. 4716-4723, 2007.

92. POLLARD, K., et al. Interferon-γ and Systemic Autoimmunity. **Discov Med**, v. 16, n. 87, p. 123-131, 2013.

93. FRUCHT, D., et al. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends Immunol**, v. 22, n. 10, p. 556–560, 2001.

94. GOLLAB, J., et al. Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18–a bridge too far? **Immunol. Lett**, v. 72, n. 3, p. 153–157, 2000.

95. MILLER, C., et al. Clinical use of interferon-ɣ. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1182, p. 69-79, 2009.

96. GOUGH, D., et al. IFN-ɣ sinaling- Does it mean JAK-STAT. **Cytokine Growth Factor Ver**, v. 19, n. 5, p. 383-394, 2008.

97. ELLIS, T., et al. Interferon-c activation of polymorphonuclear neutrophil function. **Immunology**, v. 112, n. 1, p. 2-12, 2004.

98. ROILIDES, E., et al. Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to Aspergillus fumigatus hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. **Infect Immun**, v. 61, n. 4, p. 1185-1193, 1993.

99. DJEU, J., et al. Growth inhibition of Candida albicans by human polymorphonuclear neutrophils: activation by Interferon-c and tumor necrosis factor. **J Immunol**, v. 137, n. 9, p. 2980-2984, 1986.

100. DIAMOND, R., et al. Disparate effects if interferon-c and tumor necrosis factor-a on early neutrophil respiratory burst and fungicidal responses to Candida albicans hyphae in vitro. **J Clin Invest**, v. 87, p. 711-720, 1991.

101. KURITA, N., et al. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of Paracoccidioides brasiliensis. **Med Mycol**, v. 38, n. 2, p.177-182, 2000.

102. EZEKOWITZ, A., et al. Restoration of phagocyte function by interferon-ɣ in X-Linked Chronic Granulomatous Disease occurs at the level of a progenitor cell. **Blood**, v. 76, n. 12, p. 2443-2448, 1990.

103. GALLIN, J., et al. A controlled Trial of interfern gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. **N Engl J Med**, v. 324, n. 8, p. 509-516, 1991.

104. ERRANTE, P., et al. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 3,n. 3, p. 225-230, 2008.

105. CABRAL-MARQUES O, et al. First report of the Hyper-IgM syndrome registry of the Latin America Society for Immunodeficiences: Novel mutations, unique infections and outcomes. **J Clin Immunol**, v. 34, n. 2, p. 146-156, 2014.

106. MARTINELLI, S., et al. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation**. J Biol Chem**, v. 279, n. 42, p. 4423-4432, 2004.

107. BRANZK, N., et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nat Immunol**, v. 15, n. 11, p. 1017-1025, 2014.

108. LIPPOLIS, J., et al. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by Milk. **Vet Immun Immunoph**, v.113, p. 248-255, 2006.

109. BRINKMAN, V., et al. Neutrophil extracellular traps: How to generate and visualize them. **J Vis Exp**, v. 24, n. 36, Pii: 1724, 2010.

110. HATANAKA, E., et al. Systematic study on ROS production induced by oleic, linoleic, and ɣ-linolenic acids in human and rat neutrophils. **Free Radic Biol Med**, v. 41, n. 7, p. 1124-1132, 2006.

111. MAVROUDI, I., et al. The CD40/CD40 ligand interactions exert pleiotropic effects na boné marrow granulopoiesis. **J Leuk Biol**. V 89, p. 771- 783, 2011.

112. URBAN, C., et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *C. albicans* yeast and hyphal forms. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 668-676, 2006.

113. BYRD, A., et al. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. **J Immunol**, v. 190, p. 4136-4148, 2014.

114. BRUNS, S., et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by Hydrophobin RodA. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, e1000873.

115. MCCORMICK, A., et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **Microbes Infect**, v. 12, n. 12, p. 928-936, 2010.

116. REMIJSEN, Q., et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. **Cell Research**. V. 21, p. 290- 304, 2011.

117. BIANCHI, M., et al. Restoration of anti-Aspergillus defense by neutrophil estracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. **J Allergy Clin Immunol**. v. 277, n. 5, p. 1243-1252, 2011.

118. SNOECK, H., et al. Interferon-ɣ and interleukin-4 reciprocally regulate the production of monocyte/macrophages and neutrophils through a direct effect on commited monopotential bone marrow progenitor cells. **Eur J Immunol**. v. 23, p. 1072-1077, 1993.

119. TERRI, N., et al. Interferon-ɣ activation of polymorphonuclear neutrophil function. **Immunol**. v.112, p. 2-12, 2004.

120. CONDINO-NETO, A., et al. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. **Blood**. v. 95, n. 11, p. 3548-3554, 2000.

121. BERTON, G., et al. Gamma interferon is able to enhance the oxidative metabolism of human neutrophils. **Biochem Biophys Res Commun**. V. 138, n. 3, p. 1276-1282, 1986.

122. CASSATELLA, R., et al. Interferon-gamma activates human neutrophil oxygen metabolism and exocytosis. **Immunol**. V. 63, p. 499-506, 1988.

123. MILANÉS-VIRELLES, M., et al. Adjuvante interferon gamma in patients with pulmonary atypical mycobacteriosis: a randomized, Double-blind, placebo-controlled study. **BMC Infect Dis**. V. 8, n. 17, p. 1-13, 2008.

124. SCHRODER, K., et al. Interferon-ɣ: an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leuk Biol**. v. 75, n.2, p. 163-189, 2004.

125. PILLAY, J., et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. **J Leukoc Biol**. v. 122, n.1, p. 327-336, 2012.

126. TANEJA, R., et al. Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. **Shock**. v. 30, n.6, p. 618-622, 2008.

127. GEERING, B., et al. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. **Cell Death Dif**. v.18, n.9, p. 1457-1469, 2011.

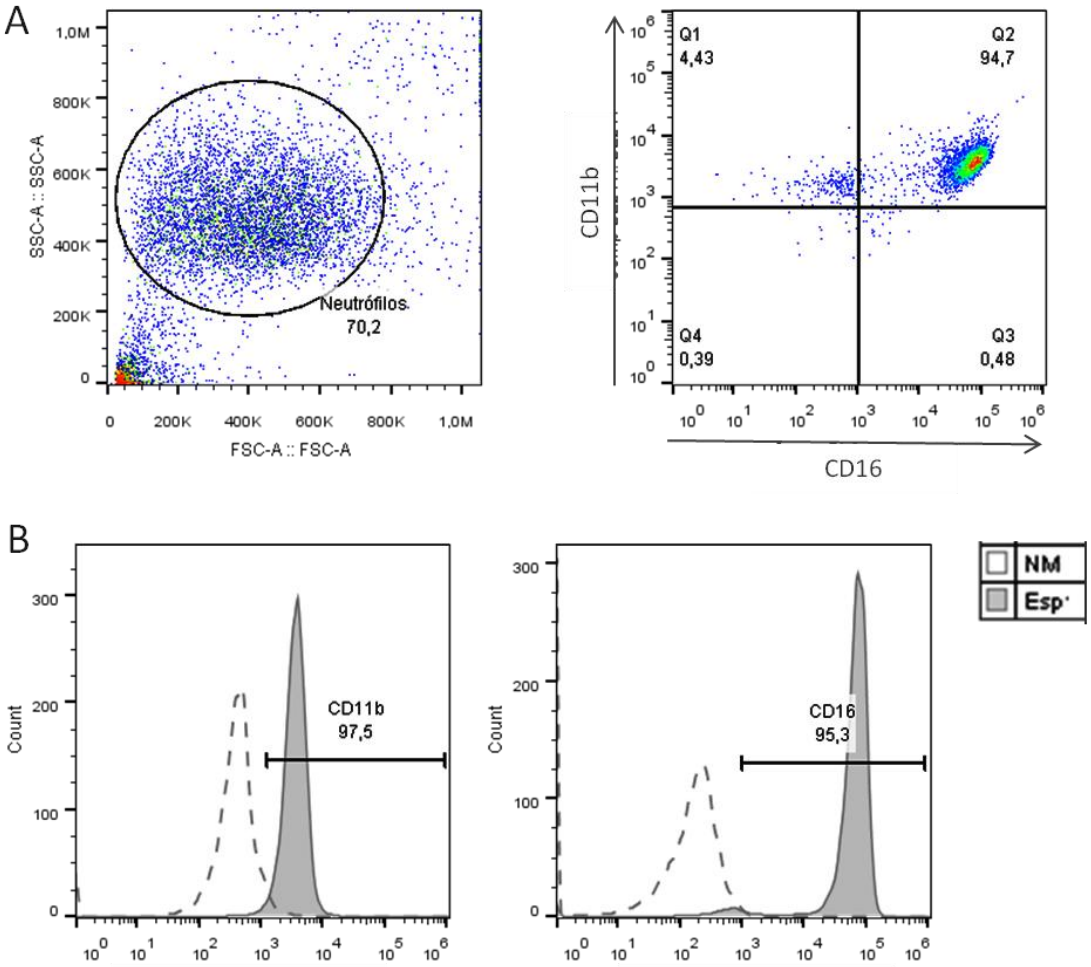
128. DRIFTE, G., et al. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. **Crit Care Med**. v. 41, p. 820-832, 2013.

129. LUKÁSOVÁ, E., et al. . Granulocyte maturation determines ability to release chromatin NETs and loss of DNA damage response; these properties are absent in immature AML granulocytes. **Biochim Biophys Acta**. v. 1833, n. 3, p. 777-779, 2012.

130. YIZENGAW, E., et al. Visceral leishmaniasis patients display altered composition and maturity of neutrophils as well as impaired neutrophil effector functions. **Front Immunol**. v. 7, n. 7, a. 517, 2016.

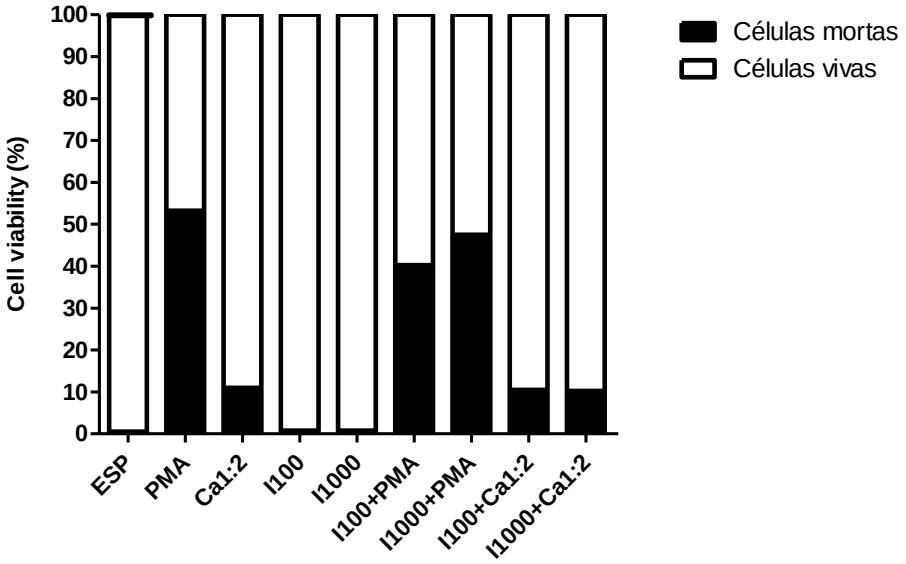
ANEXOS

A- Avaliação da pureza da separação celular



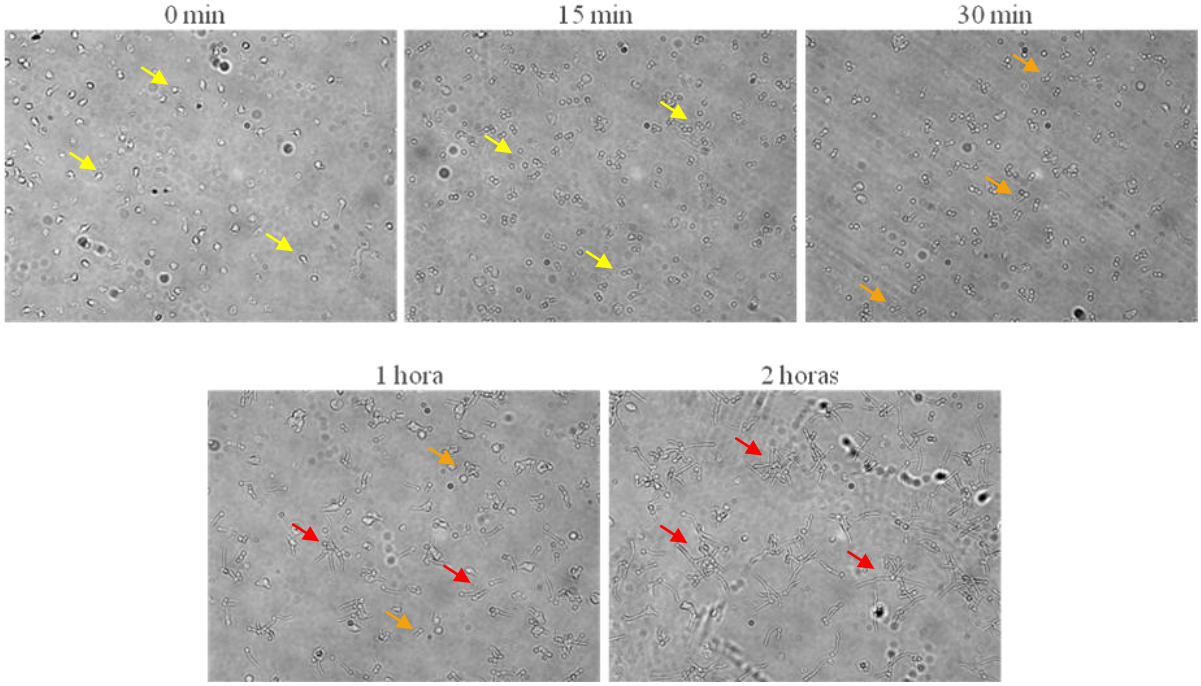
Após separação celular, o isolado celular (5 x 10^5 células) foram marcados para as moléculas de superfície CD11b e CD16 para caracterização da população isolada. (A) Gráfico de pontos da população celular isolada após separação (esquerda) e histograma com marcações para as moléculas CD11b (eixo y) e CD16 (eixo x) a partir de população selecionada (direita). Dupla expressão das moléculas acima de 90% confirma eficiência da separação celular. (B) Histograma da marcação das moléculas CD11b (esquerda) e CD16 (direita) no isolado celular. NM: não marcado; Esp: expressão espontânea da molécula. Figura representativas de 5 experimentos independentes realizados com amostra de indivíduos saudáveis.

B- Avaliação da viabilidade celular



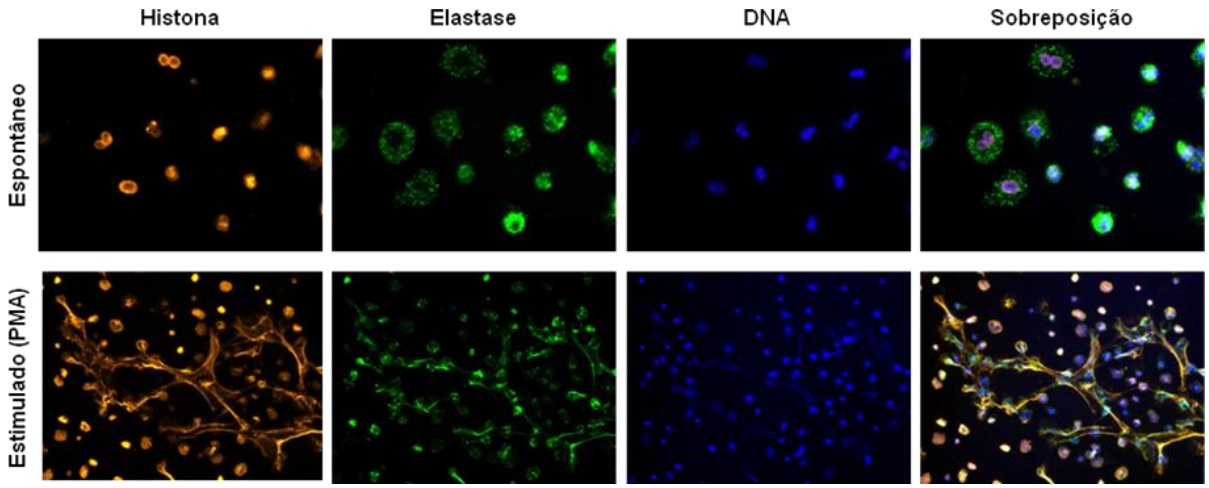
Os neutrófilos de indivíduos saudáveis (5 x 10^5 células) foram tratados por 2 horas com IFN-ɣ nas concentrações de 100 e 1000 UI/mL. Após tempo de tratamento, foram adicionados aos respectivos poços PMA e *C. albicans* e placa incubada por 3 horas em estufa CO_2 a 37°C. Após incubação, células foram marcadas com reagente de viabilidade celular LIVE/DEAD® e análise realizada por citometria de fluxo. Esp: geração espontânea sem estímulo; Ca: *C. albicans*; IFN 100: IFN-ɣ 100UI/mL; IFN 1000: IFN-ɣ 1000UI/mL. *$p<0,05$ dentre os grupos comparados, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey. n=4, experimentos independentes.

C- Avaliação morfológica das *C. albicans* utilizadas nos protocolos experimentais



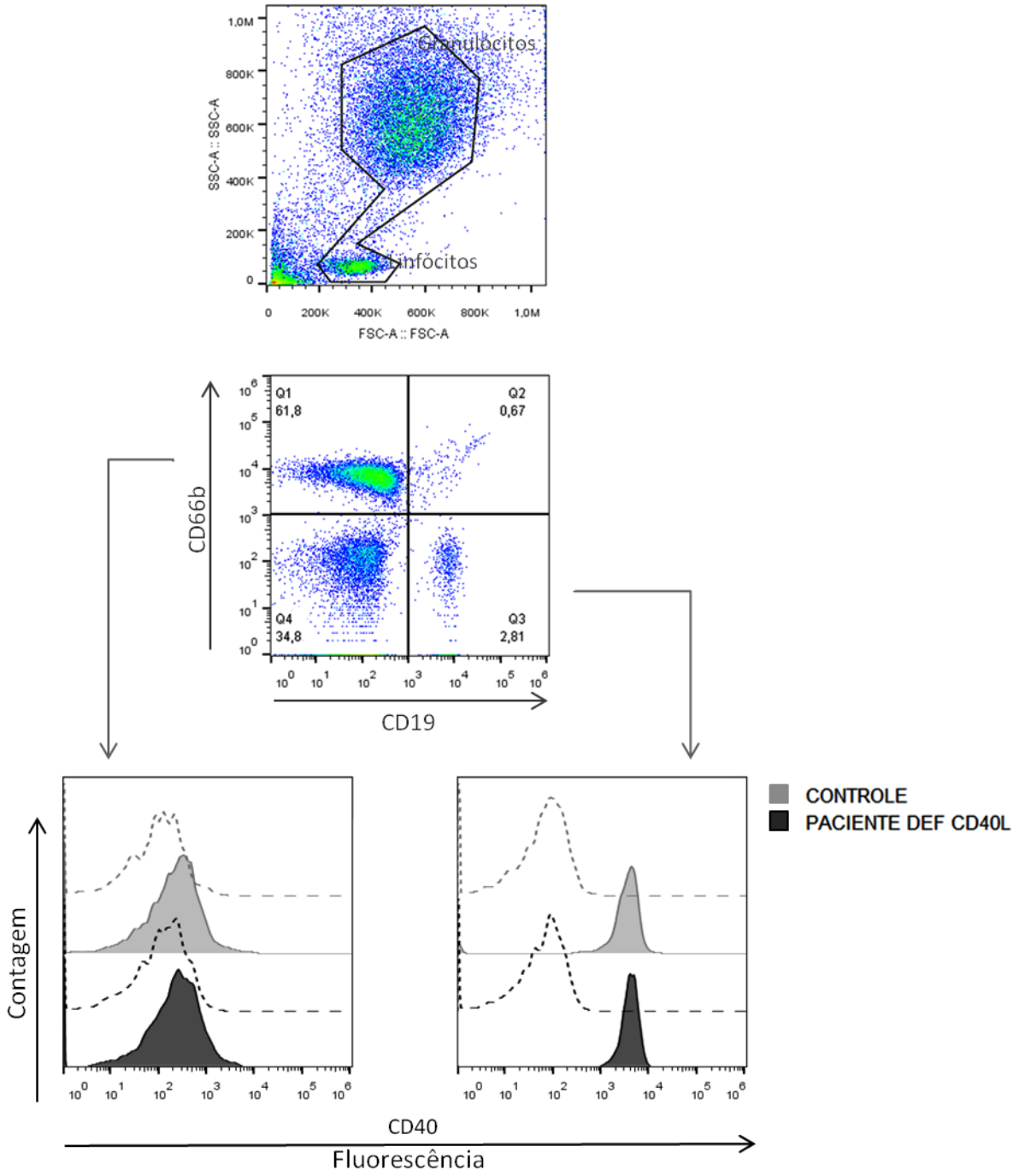
Após separação celular, os neutrófilos (2 x 10^5 células) foram pulsados com *C. albicans* na morfologia de levedura (setas amarelas; MOI 1:2) em placa de 24 poços e avaliação qualitativa realizada em microscopia de luz nos tempos de 0 minuto, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas (imagem de 3 horas não apresentada). Transição morfológica iniciada com 30 minutos de incubação (formação de tubos germinativos, setas laranjas) e transição completa para morfologia de hifa (setas vermelhas) em 2 horas de co-cultura. Figura representativa de 3 experimentos realizados de maneira independente.

D- Marcação de neutrófilos para visualização da formação de NETs



Neutrófilos (2 x 10^5 células) de indivíduo sadio incubados pelo período de 3 horas em estufa CO_2 a 37°C na ausência ou presença de PMA para geração de NETs. Laranja: histona H2A/H2B; Verde: elastase de neutrófilo; Azul: DNA.

E- Avaliação da expressão de CD40 nos neutrófilos de pacientes deficientes de CD40L



Amostra de sangue total em heparina (100µL) foram marcadas para as moléculas de superfície CD66b e CD19, para a seleção das populações de neutrófilos e linfócitos B, respectivamente, e para a molécula CD40. Histograma com marcações para a molécula CD40 a partir das populações $CD66b^{+}$ e $CD19^{+}$. CONTROLE: indivíduos saudáveis; PACIENTE DEF CD40L: paciente deficiente de CD40L. Figura representativas de 3 experimentos independentes.

F- Ficha clínica

Estudo de Pacientes com Suspeita de Imunodeficiência Primária

Laboratório de Imunologia Humana- LIH

Paciente encaminhado por:				
Nome		Data de Nascimento: ___/__/___	Sexo M ( ) F ( )	Idade - Diagnóstico Anos: ____ Meses : ____
H.C.	Tel:			
Idade de início dos primeiros sintomas: _____				
Consanguinidade Sim ( ) Não ( ) Tipo_____	Nº. Gesta: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 NE*	Nº. filhos: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 NE*	Sadios: Sim ( ) Não ( ) Infec. repet. Sim ( ) Não ( )	
Antecedentes Familiares				**Heredograma**
Falecimentos precoces: Sim ( ) Não ( ) Parentesco _____ Idade de óbito _____		Dx IDP: Sim ( ) Não ( ) DGC: Sim ( ) Não ( ) Outra_____		
Vacinas	BCG Sim ( ) Não ( ) Não especificado ( )	Idade de aplicação _____meses	Reação adversa Sim ( ) Não ( )	Adenomegalias BCG disseminada Outra _____

Hep B S ( ) N ( ) ( ) NE*	DPT/dT S ( ) N ( ) ( ) NE*	Tríplice S ( ) N ( ) ( ) NE*	Hib S ( ) N ( ) ( ) NE*	Varicela S ( ) N ( ) ( ) NE*	VTV S ( ) N ( ) ( ) NE*
Sabin S ( ) N ( ) ( ) NE*	Salk S ( ) N ( ) ( ) NE*	Sarampo S ( ) N ( ) ( ) NE*	Meningite S ( ) N ( ) ( ) NE*	Pneumonia S ( ) N ( ) ( ) NE*	Poliomielite S ( ) N ( ) ( ) NE*

Reação adversa? ( ) sim ( ) não	Especificar Vacina: _____	Manifestações: _____

DNPM	BDNPM S ( ) N ( ) NE* ( )	RDNPM S ( ) N ( ) NE* ( ) Detalhar: _____	
DPE	>p90% S ( ) N ( )	<p10% S ( ) N ( )	>p10% e <p90% S ( ) N ( )
1ª Manifestação		**Motivo de Estudo**	

Idade _____ano _____ meses	Local	Infecção Repetição: Sim ( ) Não ( ) Manifestação Grave: Sim ( ) Não ( ) História Familiar :Sim ( ) Não ( ) Outro: Sim ( ) Não ( ) Especificar: _____

Manifestações	Nº. de episódios	Micro-organismo isolado Sim ( ) Não ( ) Nome:_____	Especificar: idade e data em cada manifestação e datas dos episódios da mesma infecção	Localização
1. Otite				
2. Pneumonia				
3. Pneumonia/DP				
4. Amigdalite				
5. Linfonodo (HIPERPLASIA)				
6. ITU				
7. Meningite				
8. Artrite				
9. Osteomielite				
10. Diarreia				
11. Infecções de Pele. Especificar: _____				
12. Artrite				

13. Sepse				
14. Colangite esclerosante				
15. Neutropenia				
16. Hiperplasia				
17. Autoimunidade				
18. Outras				

Granulomas Sim ( ) Não ( )	Nº. de episódios	Localização 1 TGI 2 Cardíaco 3 Urinário 4 Outra: _____	Micro-organismo Isolado	Nº de Hospitalizações

Exames Laboratoriais (Início da Investigação)

HMG	Hb	Leuco	NT	LT	PLQ

Linfócitos/mm³ (colocar em valores absolutos) **Data da dosagem:** Na data da dosagem o paciente estava com alguma infecção? Qual?	CD3	CD4	CD8	CD19	CD16/56

Dosagem de Imunoglobulinas **(colocar os valores antes da primeira reposição de Gama)** **Data da dosagem:**	IgG	IgM	IgA	IgE

Complemento	C3	C4	CH50

Quimiotaxia		Mono	PMN
Mono	Mig.Espontânea		
PMN	Mig estim. soro nl		
	Mig. estim. soro pcte.		

Superóxido	Mono	PMN	**NBT**	
Espontâneo			Repouso	Estimulado
Estimulado				

Tratamento 1 IFN γ 2 ITRA 3 FLUCO	Administração Sim ( ) Não (0) Data de início	Tratamento atual Sim ( ) Não (0)	Óbito Sim ( ) Não (0) Idade: _____	Causa 1 Conhecida 2 Desconhecida

4 SMX +TMP 5 Prednisona 6 TMO 7. Gama (data de início)	_____		**Autópsia** Sim ( ) Não ( )	**Laudo**
Outras Manifestações – Livre Relato de Ocorrências				

* = não especificado

G- TCLE menores de 18 anos

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: Avaliação da formação de neutrophil extracellular traps em pacientes com deficiência de CD40 ligante e influência do tratamento *in vitro* com interferon-gamma

Seu filho está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós, mas se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao(à) seu (sua) filho(a).

Eu ..... , RG ..... , concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a) ..... nascido (a) em _____ / _____ /_____ , seja voluntário do estudo "**Avaliação da formação de neutrophil extracellular traps em pacientes com deficiência de CD40 ligante e influência do tratamento *in vitro* com interferon-gamma**". Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente de que:

II) Será realizada coleta de sangue venoso em tubo de heparina;

III) A participação neste estudo não tem objetivo de submeter meu filho a um tratamento, bem como não terá custo algum para mim;

IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;

V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho (a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médico a que ele (ela) estiver sendo submetido;

VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

VII) Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo:

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VIII) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP no telefone 3091-7733 (e-mail: *cep@icb.usp.br*) ou a pesquisadora responsável Tábata Takahashi França no telefone 3091-7387 para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.

IX) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo a mim ou ao meu (minha) filho (a).

( ) Sim ou ( ) Não

X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

XII) Resolução 196/96 – Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

São Paulo, de de 20.....

( ) Paciente / ( ) Responsável .....

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

TÁBATA TAKAHASHI FRANÇA

H- TCLE maiores de 18 anos

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(maiores de 18 anos)

ESTUDO: Avaliação da formação de neutrophil extracellular traps em pacientes com deficiência de CD40 ligante e influência do tratamento *in vitro* com interferon-gamma

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, (inserir o nome, profissão) ....., residente e domiciliado na ....., portador da Cédula de identidade, RG ..... , e inscrito no CPF/MF..... nascido(a) em _____ / _____ /_____ , concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo **"Avaliação da formação de neutrophil extracellular traps em pacientes com deficiência de CD40 ligante e influência do tratamento *in vitro* com interferon-gamma"**. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

I) O estudo é necessário para que se possam descobrir as possíveis causas e/ou o tratamento da doença denominada ***"Síndrome do Hiper IgM ligado ao X";***

II) Será realizada coleta de sangue venoso em tubo de heparina;

III) A participação neste estudo não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não terá custo algum para mim;

IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;

V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico, nem interferirá no atendimento ou tratamento médico a que eu estiver sendo submetido;

VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

VII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VIII) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo para mim.

( ) Sim ou ( ) Não

IX) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP no telefone 3091.7733 (e-mail: *cep@icb.usp.br*) ou a pesquisadora responsável Tábata Takahashi França no telefone 3091-7387 para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.

X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

XII) Resolução 196/96 - Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

São Paulo, de de 20.....

( ) Paciente / ( ) Responsável .....

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

TÁBATA TAKAHASHI FRANÇA

I- Artigo publicado

Immune deficiencies, infection, and systemic immune disorders

Human CD40 ligand deficiency dysregulates the macrophage transcriptome causing functional defects that are improved by exogenous IFN-γ

Otavio Cabral-Marques, PhD,[a,b] Rodrigo Nalio Ramos, PhD,[a] Lena F. Schimke, MD,[a,b] Taj Ali Khan, PhD,[a,c] Eduardo Pinheiro Amaral, PhD,[a] Caio César Barbosa Bomfim, MSc,[a] Osvaldo Reis Junior, MSc,[d] Tabata Takahashi França, MSc,[a] Christina Arslanian, BSc,[a] Joanna Darck Carola Correia Lima, MSc,[e] Cristina Worm Weber, MD,[f] Janaíra Fernandes Ferreira, MD,[g] Fabiola Scancetti Tavares, MD,[h] Jing Sun, MD,[i] Maria Regina D'Imperio Lima, PhD,[a] Marília Seelaender, PhD,[e] Vera Lucia Garcia Calich, PhD,[a] José Alexandre Marzagão Barbuto, MD, PhD,[a,j] Beatriz Tavares Costa-Carvalho, MD, PhD,[k] Gabriela Riemekasten, MD,[b] Gisela Seminario, MD,[l] Liliana Bezrodnik, MD,[l] Luigi Notarangelo, MD,[m] Troy R. Torgerson, MD, PhD,[n] Hans D. Ochs, MD,[n] and Antonio Condino-Neto, MD, PhD[a]

São Paulo, Caxias do Sul, Fortaleza, and Brasilia, Brazil; Lübeck, Germany; Kohat, Pakistan; Cincinnati, Ohio; Buenos Aires, Argentina; Boston, Mass; and Seattle, Wash

Background: CD40 ligand (CD40L) deficiency predisposes to opportunistic infections, including those caused by fungi and intracellular bacteria. Studies of CD40L-deficient patients reveal the critical role of CD40L-CD40 interaction for the function of T, B, and dendritic cells. However, the consequences of CD40L deficiency on macrophage function remain to be investigated.
Objectives: We sought to determine the effect of CD40L absence on monocyte-derived macrophage responses.
Methods: After observing the improvement of refractory disseminated mycobacterial infection in a CD40L-deficient patient by recombinant human IFN-γ (rhIFN-γ) adjuvant therapy, we investigated macrophage functions from CD40L-deficient patients. We analyzed the killing activity, oxidative burst, cytokine production, and *in vitro* effects of rhIFN-γ and soluble CD40 ligand (sCD40L) treatment on macrophages. In addition, the effect of CD40L absence on the macrophage transcriptome before and after rhIFN-γ treatment was studied.
Results: Macrophages from CD40L-deficient patients exhibited defective fungicidal activity and reduced oxidative burst, both of which improved in the presence of rhIFN-γ but not sCD40L. In contrast, rhIFN-γ and sCD40L ameliorate impaired production of inflammatory cytokines. Furthermore, rhIFN-γ reversed defective control of *Mycobacterium tuberculosis* proliferation by patients' macrophages. The absence of CD40L dysregulated the macrophage transcriptome, which was improved by rhIFN-γ. Additionally, rhIFN-γ increased expression levels of pattern recognition receptors, such as Toll-like receptors 1 and 2, dectin 1, and dendritic cell–specific intercellular adhesion molecule 3–grabbing nonintegrin in macrophages from both control subjects and patients.
Conclusion: Absence of CD40L impairs macrophage development and function. In addition, the improvement of macrophage immune responses by IFN-γ suggests this cytokine as a potential therapeutic option for patients with CD40L deficiency. (J Allergy Clin Immunol 2017;139:900-12.)

Key words: *Macrophages, CD40 ligand, opportunistic infections, IFN-γ*

From [a]the Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; [b]the Department of Rheumatology, University Lübeck; [c]the Department of Microbiology, Kohat University of Science and Technology; [d]the Central Laboratory of High Performance Technologies (LaCTAD), State University of Campinas, São Paulo; [e]the Cancer Metabolism Research Group, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; [f]Pediatric Allergy & Immunology Clinic, Caxias do Sul; [g]Albert Sabin Hospital, Fortaleza; [h]the Pediatric Immunology Clinic, Unit of Pediatrics, Hopital de Base do Distrito Federal Brasilia, Brasilia; [i]the University of Cincinnati College of Medicine; [j]the Cell and Molecular Therapy Center, NETCEM, University of São Paulo; [k]the Division of Allergy-Immunology and Rheumatology, Department of Pediatrics, Federal University of São Paulo; [l]Dr Ricardo Gutierrez Children's Hospital, Immunology, Buenos Aires; [m]the Division of Immunology, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston; and [n]the Department of Pediatrics, University of Washington School of Medicine, and Seattle Children's Research Institute.

Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant 2012/50515-4 to O.C.-M. and grant 2012/51745-3 to A.C.-N.) and the Jeffrey Modell Foundation.

Disclosure of potential conflict of interest: C. C. Barbosa Bomfim receives payment for lectures from the São Paulo Research Foundation and travel support from São Paulo Research Foundation. M. Seelaender receives grant support from FAPESP and University Sorbonne Paris Cite-University of São Paulo and serves as a consultant from Metabolic Foods Brazil. J. A. Marzagão Barbuto receives grant support from FAPESP and serves as a consultant for Recepta Biopharma. L. Notarangelo serves on the board for Novimmune, is an employee of Children's Hospital Pediatric Associates, receives grant support from the National Institutes of Health (NIH), and receives royalties from UpToDate. T. R. Torgerson serves as a consultant for Baxalta Biosciences, CSL Behring, and ADMA; receives grant support from Baxalta Biosciences, CSL Behring, and the NIH; and receives payments for lectures from Baxalta Biosciences, CSL Behring, Questor Pharmaceuticals, and RWJF. H. D. Ochs receives grant support from the Jeffrey Modell Foundation. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication February 6, 2016; revised June 15, 2016; accepted for publication July 12, 2016.

Available online August 20, 2016.

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. Or: antoniocondino@gmail.com.

The CrossMark symbol notifies online readers when updates have been made to the article such as errata or minor corrections

0091-6749/$36.00

© 2016 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.018

Abbreviations used

CD40L: CD40 ligand
CFU: Colony-forming units
CGD: Chronic granulomatous disease
CLR: C-type lectin receptor
DC: Dendritic cell
DEG: Differentially expressed gene
G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor
GO: Gene Ontology
IP-10: IFN-γ–induced protein 10
M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor
MDM: Monocyte-derived macrophage
PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR: Pattern recognition receptor
rhIFN-γ: Recombinant human IFN-γ
sCD40L: Soluble CD40 ligand
TLR: Toll-like receptor

The CD40 ligand (CD40L)–CD40 interaction was initially described to play an essential role during membrane-membrane interactions between activated $CD4^+$ T lymphocytes and B cells,[1-5] as well as between $CD4^+$ T cells and antigen-presenting cells.[6,7] However, further studies showed that soluble CD40 ligand (sCD40L) produced by T cells and platelets[8-11] can also exert an important role in immune system regulation, including myeloid progenitor cell development. Bone marrow stromal cells, hematopoietic progenitors, and myeloid progenitors express CD40. Furthermore, the CD40L-CD40 interaction has been shown to influence differentiation of these cells directly and indirectly through regulation of cell proliferation and maturation or through control of the cytokine milieu in the bone marrow, respectively.[10,12-14]

Macrophages are essential myeloid cells, exhibiting microbicidal activity and regulating inflammatory immune responses. Thus macrophages comprise a pivotal component of the innate immune system. Macrophages express CD40 constitutively,[15,16] but their functional capability in patients with CD40L deficiency has not been investigated.

Patients with X-linked hyper-IgM syndrome caused by mutations in the gene encoding CD40L *(CD40LG)* have a broad spectrum of opportunistic infections caused by intracellular bacteria and fungi. These infections resemble infections seen in patients with abnormal myeloid cells, such as those in patients with chronic granulomatous disease (CGD).[17-19] Although CD40L-deficient patients can experience intermittent neutropenia, they are also susceptible to fatal opportunistic infections, even when neutrophil counts are normal or when receiving granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and immunoglobulin replacement therapy.[20,21] These observations indicate that absence of CD40L might impair macrophage function in human subjects and that new therapeutic approaches need to be investigated for optimal treatment of these patients.

Failure to produce IFN-γ has been reported in patients with CD40L deficiency.[22-24] This cytokine primes and activates mature phagocytes. Additionally, IFN-γ affects development of progenitor cells to generate mature phagocytes capable of efficiently eliminating opportunistic pathogens.[25] For this reason, recombinant human IFN-γ (rhIFN-γ) has been used as an adjunctive therapy for patients with CGD[26,27] and patients with defects in the IL-12/IFN-γ axis to prevent and treat invasive mycobacterial or fungal infections. However, IFN-γ has not been broadly used to treat patients with adaptive primary immunodeficiency disorders.[28-31]

Here we aimed to analyze the *in vitro* macrophage response in patients with CD40L deficiency with respect to macrophage killing activity, oxidative burst, and production of inflammatory cytokines. Furthermore, we investigated the effects of rhIFN-γ and sCD40L treatment on macrophages from CD40L-deficient patients. In addition, we assessed the effect of CD40L deficiency on the macrophage transcriptome before and after rhIFN-γ treatment.

METHODS

Case report

An Argentinian CD40L-deficient patient included in our collaborative Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID) studies[18] was treated with adjuvant rhIFN-γ at the Dr Ricardo Gutierrez Children's Hospital. The hospital is in Argentina, where rhIFN-γ (Imukin; Boehringer Ingelheim, Ridgefield, Conn) is already approved for clinical use (Disposicion no. 1265-12). The patient was born to nonconsanguineous family and received BCG vaccine in the first month of life without complication. At 9 months of age, he was given a diagnosis of dysgammaglobulinemia (hyper-IgM syndrome), chronic neutropenia, and pneumonia caused by *Pseudomonas* species. Conventional treatment for CD40L deficiency (trimethoprim/sulfamethoxazole prophylaxis, intravenous immunoglobulin, and Granulokine) was initiated, and the patient was given a diagnosis of the mutation Q174X in *CD40LG* (details have been previously reported[18]). At 5 years of age, he had cervical adrenomegaly caused by mycobacterial disease. The extent and severity of this mycobacterial infection were assessed by means of biopsy, which showed granulomas. Additionally, the PCR result was positive for *M tuberculosis* complex.

Conventional antituberculosis therapy with a 4-drug regimen (ethambutol, levofloxacin, isoniazid, and rifampicin) was initiated, but the patient had typhlitis requiring surgery. Abundant caseating granulomas were observed in the bowel mucous membrane, requiring colostomy for 6 months, and the patient continued to have refractory mycobacterial disease despite antituberculosis treatment. Therefore simultaneous with the conventional CD40L deficiency and antituberculosis therapy, subcutaneous rhIFN-γ (50 $\mu g/m^2$ administered 3 times a week) was administrated for 6 months. Under this therapeutic regimen, the patient improved clinically. After that, rhIFN-γ therapy was discontinued and isoniazid and rifampicin was continued for 1 additional year until no symptoms of mycobacterial disease were observed. Currently, the patient is 9 years old, has no stem cell donor available, and has had hepatic cryptococcosis.

Subjects

We enrolled 6 CD40L-deficient patients (age range, 3-21 years) from 6 unrelated Brazilian families. Except for the occurrence of *M tuberculosis* infection in P1, the clinical, immunologic, and genetic characteristics of these patients have been previously described[18] and are summarized in Table E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org. For each experiment, a healthy subject (age range, 23-30 years) was included for comparison. Informed consent was obtained from the patients or their parents and from healthy control subjects. The blood was collected under institutional guidelines, and the study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo.

Generation of monocyte-derived macrophages

Human monocyte-derived macrophages (MDMs) were obtained, as previously described, with minor modifications.[32] In summary, $CD14^+$ monocytes were obtained from PBMCs by using the Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), according to the manufacturer's instructions. Monocytes were cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS at

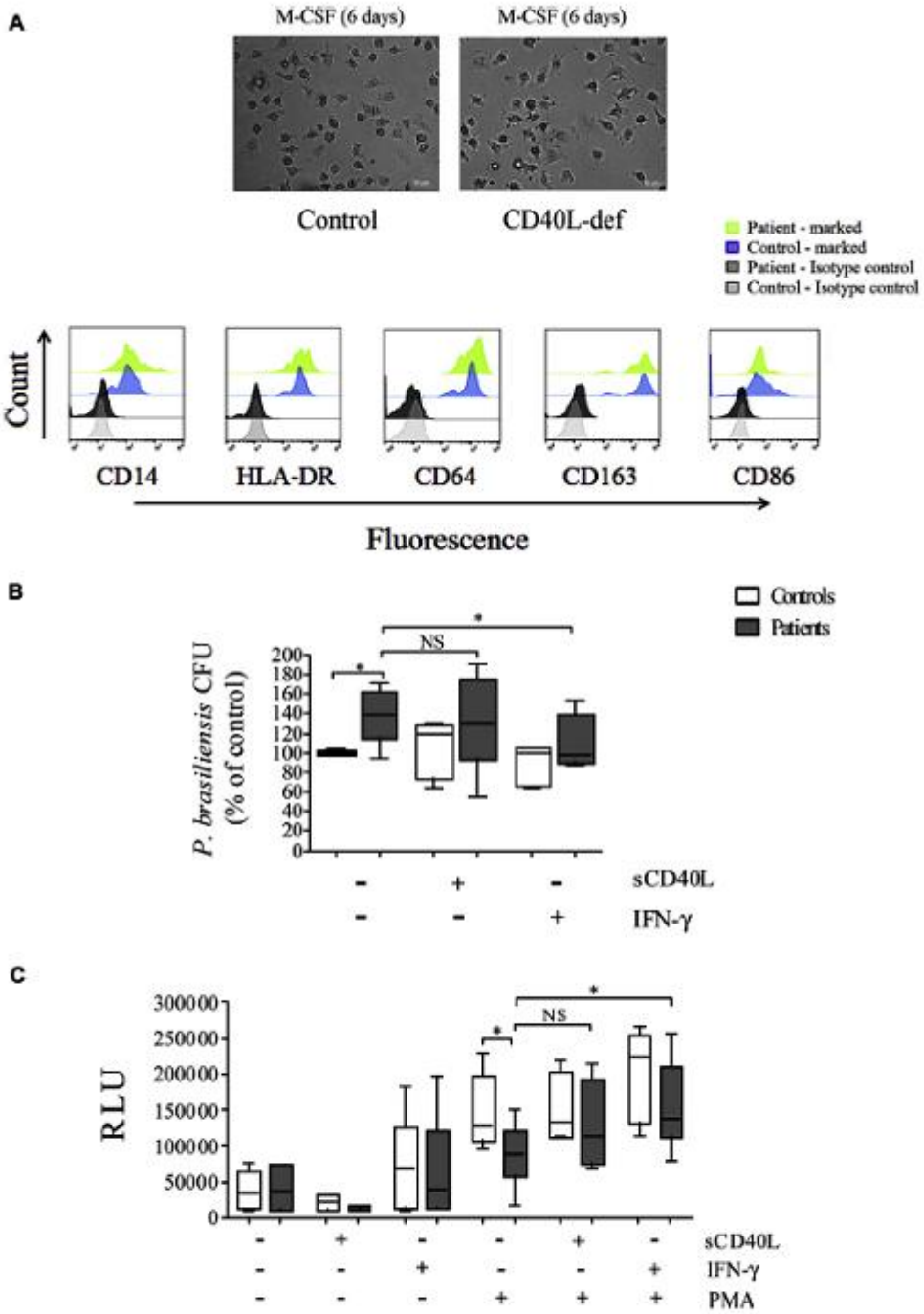


FIG 1. rhIFN-γ, but not sCD40L, improves the defective fungicidal activity and oxidative burst of MDMs from CD40L-deficient patients. **A,** Cell morphology *(top)* was assessed by means of phase contrast (Axio Vert.A1) after 5 days in the presence of M-CSF. Flow cytometric analysis *(bottom)* was used to characterize expression of CD14, HLA-DR, CD64, CD163, and CD86 on the surfaces of MDMs. **B,** After challenging MDMs with *P brasiliensis*, fungicidal activity was assessed by determining CFU values. Before assay, MDMs were untreated *(−)* or treated with *(+)* sCD40L (500 ng/mL) or rhIFN-γ (100 U/mL) for 48 hours. CFU values (as percentages of control values) were determined in relation to the CFU number of untreated MDMs from healthy control subjects. The results in scatter plots and raw data in CFU per milliliter are shown in Fig E2. **C,** MDMs remained untreated or were cultured for 48 hours in the presence of sCD40L (500 ng/mL) or rhIFN-γ (100 U/mL); the respiratory burst of MDMs was induced by PMA (90 mmol/L). Cells were analyzed with the luminol-enhanced chemiluminescence assay, and values are expressed as relative light units *(RLU)*. A significant difference is denoted as follows: $^*P \leq .05$ (n = 6 patients and 6 control subjects), Mann-Whitney test. *NS,* Not significant.

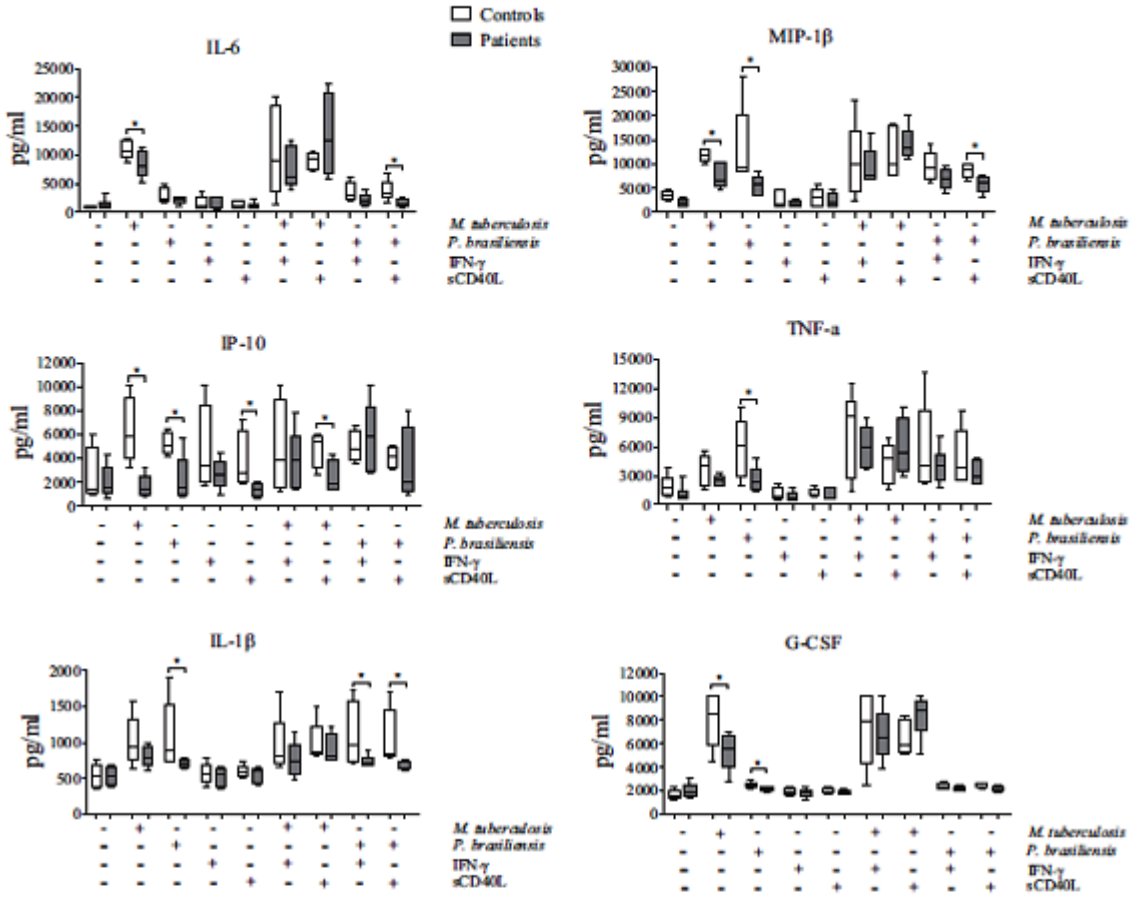


FIG 2. Impaired cytokine production by macrophages from CD40L-deficient patients. Patients' macrophages secrete abnormal levels of IL-6, TNF-α, IL-1β, macrophage inflammatory protein 1β *[MIP-1β]*, IP-10, and G-CSF in response to *M tuberculosis* and *P brasiliensis*. After 48 hours of sCD40L (500 ng/mL) or rhIFN-γ (100 U/mL) treatment, cytokine production by patients' macrophages achieved a pattern similar to that observed in healthy control subjects. Significant differences are denoted as follows: $*P \leq .05$ (n = 6 patients and 6 control subjects), Mann-Whitney test.

37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere for 5 days in the presence of 50 ng/mL macrophage colony-stimulating factor (M-CSF; PeproTech, Princeton, NJ). Afterward, the cells underwent phenotypic characterization, including analysis of HLA-DR, CD14, CD40, CD64, CD86, CD80, and CD163. They were also characterized for the following pattern recognition receptors (PRRs): Toll-like receptors (TLRs; TLR1, TLR2, and TLR4) and C-type lectin receptors (CLRs; dectin-1, dectin-3, mannose receptor, CD206, and dendritic cell–specific intercellular adhesion molecule 3–grabbing nonintegrin [DC-SIGN]). Phenotypic expression was analyzed by using flow cytometry (BD FACSCanto II Cytometer). The data obtained were analyzed with FlowJo software (TreeStar, Ashland, Ore). When indicated, MDMs were incubated for 2 more days in the presence of 100 U/mL rhIFN-γ (Immukine, Boehringer Ingelheim), 20 ng/mL IL-4 (PeproTech), or 500 ng/mL sCD40L (Life Technologies, Frederick, Md).

Fungicidal activity

MDMs were challenged with *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18, a highly virulent isolate), and the microbicidal activity was determined by counting colony-forming units (CFU), as previously described.[33] Briefly, 0.2×10^5 MDMs were cultured in 200 μL of RPMI 1640 in 96-well flat-bottom plates and challenged with *P brasiliensis* (ratio 1:10, fungus/MDMs) for 48 hours. Five days after seeding and challenging, *P brasiliensis* CFU were counted, and CFU values (percentage of control values) were determined in relation to the CFU numbers of untreated MDMs from healthy control subjects.

Analysis of respiratory burst by means of chemiluminescence

MDM oxidative burst was measured by using luminol-dependent chemiluminescence, as previously described.[34] Luminol (1 mmol/L; Sigma Laboratories, St Louis, Mo)–preloaded MDMs (0.2×10^5/300 μL) were activated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 90 nmol/L, Sigma Laboratories), and chemiluminescence was monitored for 2 hours with a microplate luminometer reader (EG&G Berthold LB96V, Bad Wildbad, Germany). Results were expressed as relative light units.

Analysis of cytokine production

Supernatants of macrophages treated or untreated with rhIFN-γ or sCD40L were harvested 48 hours after *P brasiliensis* or *M tuberculosis* (lysate)[35] incubation. Cytokine levels were evaluated by using a HCYTMAG-60K-PK30 Cytokine Kit (Millipore, Bedford, Mass), and data obtained were analyzed with a Luminex instrument, according to the manufacturer's instructions.

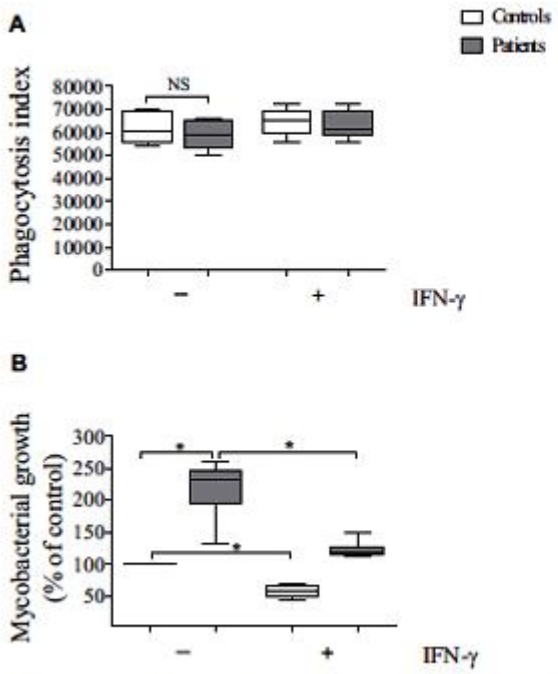


FIG 3. Defective control of the proliferation of *M tuberculosis* by MDMs from CD40L-deficient patients is improved by rhIFN-γ. **A,** Macrophages were challenged with *M tuberculosis* (H37Rv strain), and the phagocytosis index was determined on day 0 based on CFU counts. **B,** The bacterial proliferation index on day 6 was determined based on the ratio of CFU numbers on day 6 to CFU numbers on day 0. Data were normalized according to the average mycobacterial growth of untreated MDMs from healthy control subjects. Significant differences are denoted as follows: $*P \leq .05$ ($n = 6$ patients and 6 control subjects), Mann-Whitney test. *NS*, Not significant.

Phagocytosis and control of *M tuberculosis* proliferation by MDMs

Analyses of *M tuberculosis* (H37Rv strain) phagocytosis and proliferation control by MDMs were carried out, as previously described.[36] In brief, MDMs were challenged at a 1:1 ratio (*M tuberculosis*/MDMs) for 3 hours (day 0) and washed to remove extracellular mycobacteria. On day 0 and 6 days later, the MDMs were lysed with 0.1% saponin treatment, and the homogenates were diluted and plated in Middlebrook 7H10 medium supplemented with 10% OADC (Difco; acid/albumin/dextrose/catalase). The resultant colonies were assessed after 21 days of incubation at 37°C. *M tuberculosis* uptake (phagocytosis index) data were obtained from CFU counts performed on day 0, and the *M tuberculosis* growth index was determined based on the ratio of CFU numbers on day 6 to CFU numbers on day 0.

In addition to MDMs, to gain evidence about the role of CD40L-CD40 interaction in myeloid cell development, we analyzed the ability of the promyelocytic HL-60 cell line to control *M tuberculosis* proliferation by challenging the cells at a 1:1 ratio (*M tuberculosis*/HL-60 cells). HL-60 cells were only challenged for 3 hours because of rapid HL-60 proliferation. After this, HL-60 cells were lysed, and *M tuberculosis* proliferation was assessed based on CFU values, as performed for MDMs.

RNA sequencing and data processing

Macrophage transcriptome profiles from 3 CD40L-deficient patients and 3 healthy control subjects were analyzed, as previously described.[32,37] Total RNA was obtained by using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, Calif), according to the manufacturer's instructions. RNA integrity and concentration were assessed by using the Agilent 2100 Bioanalyser RNA Nano chip (Agilent Technologies, Santa Clara, Calif) and orthogonally validated by means of visualization of the integrity of the 28S and 18S band on an agarose gel. cDNA libraries were obtained with the Illumina CBot station and HiScanSQ using the Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, Calif), according to the manufacturer's instructions. Sequencing was carried out with the Illumina HiSeq 2000 paired-end 100-bp (PE 100) system.

Bioinformatic analysis

After quality assessment with FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), reads were aligned with the human cDNA transcriptome from Ensembl 82 by using Kallisto.[38] Data were further processed by using Sleuth (pachterlab.github.io/sleuth/), and the read values were expressed as transcripts per million. The transcripts with more than 5 reads in each sample for at least 47% of the sample and false discovery rate–adjusted *P* values (or *q* values) of less than .05 were considered differentially expressed genes (DEGs). Hierarchical clustering analysis was performed with Perseus (MaxQuant, v1.11, Martinsried, Germany). Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis was performed with STRING[39] and DAVID[40,41] to categorize and group DEGs based on a known functional association, as defined by the Gene Ontology Consortium.[42] GeneMANIA/Cytoscape[43] was used to predict interactions between DEGs by using GO biological process and source organism *Homo sapiens* as additional parameters.

Statistical analysis

Statistical significance was assessed by using the nonparametric Mann-Whitney test. Data were expressed as medians and 25th and 75th percentiles. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 4.03 software (GraphPad Software, San Diego, Calif), and *P* values of .05 or less were considered significant.

RESULTS

MDMs from CD40L-deficient patients have defective fungicidal activity and oxidative burst that are reversed by rhIFN-γ but not sCD40L

Based on the morphologic characteristics and expression patterns of the CD14, HLA-DR, CD64, CD163, and CD86 molecules, a homogeneous population of MDMs from CD40L-deficient patients and healthy control subjects was successfully generated (Fig 1, *A*). When challenged with *P brasiliensis*, macrophages from patients demonstrated reduced fungicidal activity compared with those from healthy control subjects (Fig 1, *B*, and see Fig E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Although sCD40L treatment did not significantly increase the killing activity of macrophages from CD40L-deficient patients, rhIFN-γ improved the fungicidal activity of macrophages from patients. This finding is consistent with IFN-γ's established beneficial therapeutic effect for patients with opportunistic infections and its well-known role as a phagocyte activator.

Considering the essential role of the oxidative burst during macrophages killing activity,[44] we evaluated the production of reactive oxygen species by PMA-activated MDMs from CD40L-deficient patients. Patients' macrophages did not trigger the oxidative burst after activation in comparison with those from healthy subjects (Fig 1, *C*). Although sCD40L showed a slight increase in macrophage responses, no significant enhancement was achieved. However, rhIFN-γ statistically enhanced the oxidative burst of macrophages in both patients and control subjects. After rhIFN-γ treatment, patients' MDMs displayed no significant difference compared with untreated or rhIFN-γ–treated MDMs from healthy control subjects.

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME 139, NUMBER 3

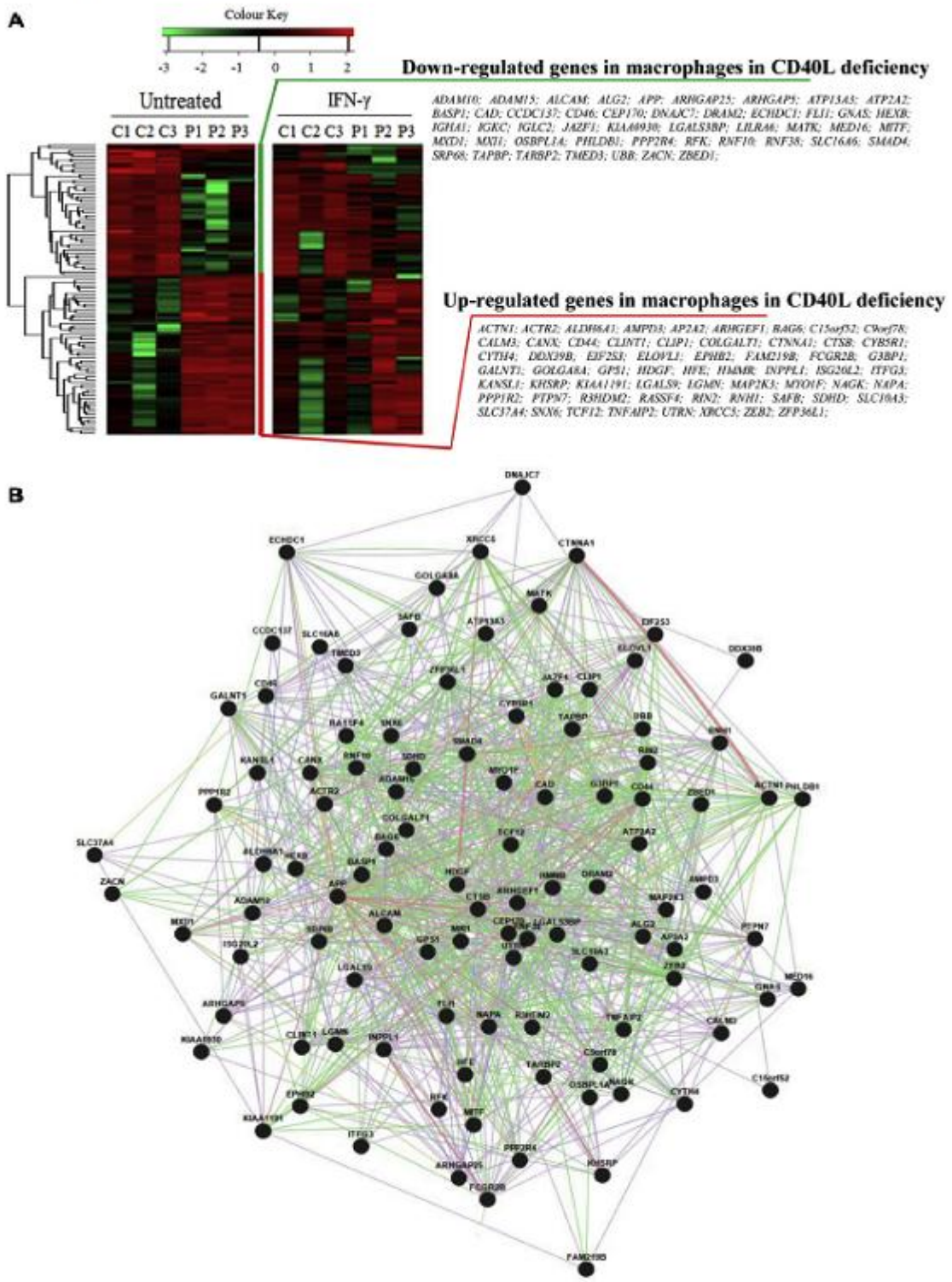
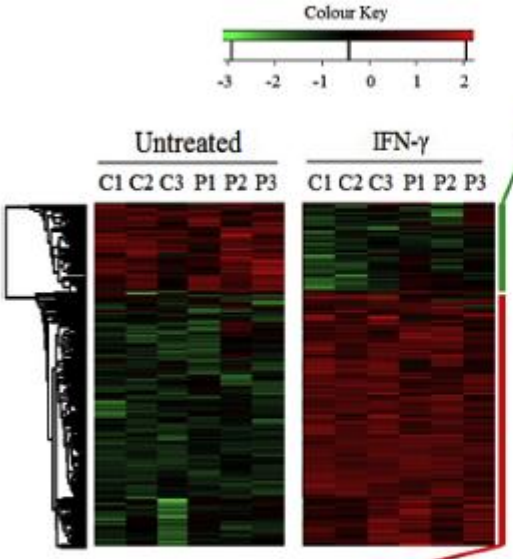


FIG 4. Hierarchical cluster analysis showing MDM gene signature in patients with CD40L deficiency and the subsequent effects of IFN-γ. **A,** RNA from MDMs was sequenced, and the transcripts per million *(TPM)* values are represented on a $\log_2$ scale, where *green* shows low expression and *red* shows high expression. The results of untreated *(left panel)* and rhIFN-γ–treated *(right panel)* cells are shown in the heat map. **B,** Interaction networks for the DEGs in CD40L deficiency are shown. Networks are shown as predicted by GeneMania and visualized with Cytoscape.



Genes down-regulated by IFN-γ

ACER3; ADAM12; ALK; ANKH; ARHGAP26; ARMC9; ARMT1; ARRDC3; ASIC1; ASPH; ATP2B4; ATP6V0D2; BACE1; BCAT1; BIRC5; BNIP3L; C11orf45; C5AR1; CABLES1; CAPN2; CCNB1; CD109; CD163; CD163L1; CD180; CD9; CDK1; CDKN2C; CEBPG; CENPF; CEP55; CRABP2; CYBRD1; DEXI; DPP4; FABP3; FBLN5; FRMD4A; GAS2L3; GLIPR1; GNG12; GPNMB; GPR183; GPR34; GTSE1; HGSNAT; HIF1A; HMOX1; HS2ST1; HS3ST1; IFNGR1; IQGAP3; JAKMIP2; KCTD7; KIAA1147; KIF11; KIF18B; KIF2C; KITLG; LDLRAD3; LMNA; LPL; MAOA; MAPK13; MCM6; MECP2; MERTK; MKI67; MMD; MMP2; MRO; MS4A4A; MS4A7; MYBL2; NADK; NCAPG; NCS1; NGFRAP1; NOTCH3; NOV; OLFML2B; OPN3; PAQR3; PCSK6; PCYOX1; PHACTR1; PID1; PIK3R5; PITHD1; PLK1; PLXNA2; PPM1L; PRC1; PTGFRN; PTGR1; PTX3; PVRL4; RAB7B; RAPH1; RDH10; RGCC; RP11-368J21.3; RRM2; SDC2; SERINC2; SERINC5; SH3D21; SHB; SIGLEC15; SLC11A1; SLC16A10; SLC7A11; STMN1; TDP2; TGFBI; THBD; TK1; TLE3; TMEM87B; TNFRSF11A; TNFRSF21; TNS1; TOP2A; TPX2; TSPAN15; TUBB3; TYMS; UBASH3B; VGLL4; WBP5; XYLT1; ZNF395; ZNF589;

Genes up-regulated by IFN-γ

AB13; AD000671.6; ADAR; ADGRE5; AIM2; AK2; AKR1A1; AKT1S1; ALDH1A1; ANKRD22; ANKRD44; AOAH; APOBEC3A; APOBEC3C; APOBEC3G; APOL1; APOL2; APOL3; APOL4; APOL6; ASCL2; ASPHD2; ATF5; ATG3; ATOX1; ATP13A2; AXL; B2M; BAK1; BATF2; BCL3; BTN2A2; BTN3A1; BTN3A2; BTN3A3; C11orf21; C1orf228; C1QA; C1QB; C1QC; C1R; C1S; C2; C2CD2L; C4A; C4B; C4orf32; C5orf15; C5orf56; CA11; CALCOCO2; CARD16; CASP1; CASP4; CASP8; CBR1; CCDC109B; CCDC50; CCDC88B; CCL8; CCRL2; CD274; CD33; CD38; CD40; CD47; CD7; CD74; CDC42SE2; CDKN1A; CFB; CH13L1; CHMP5; CIITA; CLEC10A; CLIC1; CMPK2; CRISPLD2; CSF2RB; CSK; CTC-479C5.12; CTNNBL1; CTSC; CUL1; CXCL10; CXCL11; CXCL9; CXCR2P1; CYSLTR2; DAPP1; DCAF11; DDX60; DHX58; DNAJA1; DOCK8; DRAM1; DTX3L; DYNLT1; DYSF; EIF5A; ENDOD1; EPSTI1; ERAP2; ERICH1; ETHE1; ETV7; FAM26F; FARP2; FAS; FBXO6; FBXO7; FCER1G; FCGR1A; FCGR1B; FCGR1C; FCRL6; FGD2; FGL2; FNBP1; FRMD3; FXR1; FYB; GABARAP; GADD45B; GAS7; GBP1; GBP1P1; GBP2; GBP4; GBP5; GCH1; GIMAP1-GIMAP5; GIMAP4; GIMAP5; GIMAP6; GIMAP7; GIMAP8; GPBAR1; GPR132; GRAMD1A; GRIN3A; GSAP; GSDMD; GSTK1;GTPBP1; GUK1; GVINP1; HAPLN3; HELZ2; HIST2H2BE; HLA-B; HLA-DMB; HLA-DOA; HLA-DPA1; HLA-E; HLA-F; HS3ST3B1; HVCN1; ICAM1; IDO1; IFI27; IFI35; IFI44; IFI44L; IFI6; IFIH1; IFIT1; IFIT2; IFIT3; IFIT5; IFITM1; IFITM3; IFT172; IKBKE; IL10RA; IL12RB1; IL15; IL15RA; IL18BP; IL27; IL31RA; IL32; IL4I1; ILK; IRF1; IRF7; IRG1; ISG15; ISG20; ISOC1; ITGAL; ITGB7; ITPRIPL2; JADE2; JAK2; KARS; KCNE5; KCNJ2; KDM1B; LAG3; LAP3; LCP2; LGALS17A; LIMK2; LIPM; LMNB1; LMO2; LPCAT2; LRRK2; LY6E; LY75; LYN; LYPD5; MAP3K7CL; MAT2B; MAX; MB21D1; MCOLN2; MDK; MMP25; MOV10; MSRB1; MT2A; MTHFD2; MX1; MX2; MYOF; N4BP2L1; NAPRT; NCF1; NCF1B; NCF1C; NEURL3; NFAM1; NFIX; NFKB2; NLRC5; NMI; NOD2; NT5C3A; NUB1; NUCB1; NUMA1; OAS1; OAS2; OAS3; ODF3B; OGFR; OPTN; P2RX7; P2RY14; P2RY6; PAK1; PARP10; PARP14; PARP9; PCGF5; PDCD1LG2; PDE4B; PDGFB; PDIA3; PLA2G4A; PLEK; PLEKHO1; PML; POMP; PPA1; PRDM1; PRDX1; PRELID1; PRPF19; PRPF3; PSMA2; PSMA4; PSMA5; PSMA6; PSMB10; PSMB2; PSMB8; PSMB9; PSME1; PSME2; PSTPIP2; PTGES3P1; PVRL2; RAB24; RALB; RAPGEF2; RARRES3; RBCK1; RCSD1; REEP4; RERE; RFX5; RGS3; RHBDF2; RHOBTB3; RHOU; RMI2; RNF144B; RNF19B; RNF213; ROGDI; RP11-1094M14.8; RPS6KA4; RSAD2; RSU1; RTP4; SAMD9L; SAT1; SCARB2; SCARF1; SCIMP; SCO2; SCPEP1; SDHB; SECTM1; SEMA4D; SERPINB9; SERPING1; SFT2D2; SH3BP2; SHKBP1; SIDT2; SIGLEC1; SIGLEC11; SLAMF7; SLAMF8; SLC10A3; SLC15A3; SLC25A28; SLC2A6; SLC31A2; SLC37A1; SLC50A1; SLC6A12; SLC8A1; SMCO4; SMTNL1; SNX10; SNX20; SOCS1; SOD2; SP110; SP140L; SQRDL; SRI; STAT1; STAT2; STOM; STX11; TAGAP; TAP1; TAP2; TAPBPL; TBC1D17; TCN2; TFEC; TICAM2; TIFA; TIFAB; TLR8; TMEM109; TMEM140; TMEM30A; TMSB10; TNF; TNFAIP6; TNFSF10; TNFSF13B; TPMT; TRAF2; TRAFD1; TRANK1; TRIM21; TRIM22; TRIM69; TRPM2; TXN; TYMP; UBA7; UBD; UBE2L6; UBE2Z; UNC93B1; USP18; USP30; VAMP5; VPS9D1; WARS; WWC3; XAF1; XRN1; XX6ac-BPG116M5.17

FIG 5. Heat map of genes not dysregulated in patients with CD40L deficiency but affected by rhIFN-γ treatment. Results for untreated and rhIFN-γ–treated cells are shown in the heat map. RNA from MDMs were sequenced, and the transcripts per million *(TPM)* values are represented on a $\log_2$ scale, where *green* shows low expression and *red* shows high expression. Genes significantly upregulated or downregulated are listed.

Defective production of inflammatory cytokines by macrophages from CD40L-deficient patients is reversed by rhIFN-γ and sCD40L

In addition to responding to invading pathogens by inducing microbicidal activity, macrophages produce inflammatory cytokines in response to CD40L-CD40 interaction.[42] Therefore we analyzed inflammatory cytokines released by MDMs from patients or control subjects treated or untreated with rhIFN-γ or sCD40L in response to *P brasiliensis*. In addition, considering the increased susceptibility to mycobacterial diseases reported in patients with CD40L deficiency,[18,20,45] we also challenged the macrophages with *M tuberculosis*. After 48 hours of culture in the presence of *P brasiliensis* or *M tuberculosis*, macrophages from CD40L-deficient patients had significantly impaired production of IL-6, TNF-α, IL-1β, macrophage inflammatory protein 1β, IFN-γ–induced protein 10 (IP-10), and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) compared with those of healthy control subjects (Fig 2). With few exceptions, the impaired cytokine production in CD40L-deficient patients was significantly improved by both rhIFN-γ and sCD40L.

Impaired control of *M tuberculosis* proliferation by macrophages from CD40L-deficient patients is reversed by rhIFN-γ

Considering the essential role of IFN-γ in the response to mycobacteria[46] and the increased susceptibility to mycobacteria

TABLE I. Biological process dysregulated in patients with CD40L deficiency

GO term	GO category	Dysregulated genes in patients with CD40L deficiency	Genes not affected by the CD40L deficiency but modulated by rhIFN-γ treatment
GO:0002376	Immune system process	*ACTR2, ADAM10, ADAM15, AP2A2, APP, BAG6, CANX, CD44, CD46, CTSB, FCGR2B, FLI1, IGLL5, INPPL1, LGMN, IL1RA6, MAP2K3, MATK, MITF, MYO1F, OSBPL1A, PPP2R4, TCF12, UBB, ZFP36L1*	*AOAH, APOBEC3G, APOL1, APOL2, APOL3, BCL3, BNIP3L, C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1S, C2, C4A, C4B, C5AR1, CALCOCO2, CCL8, CD163, CD180, CD40, CD74, CEBPG, CFB, CIITA, CLIC1, CXCL10, CXCL11, CXCL9, DHX58, FCGR1A, FCGR1C, GCH1, HIF1A, HIST2H2BE, HLA-B, HMOX1, IDO1, IFIH1, IL15, IL27, IL31RA, IL32, IRF7, ITGAL, LY75, LYN, MMP25, MX1, MX2, NCF1, NCF1C, NFAM1, NMI, NOD2, P2RX7, PRDX1, PTX3, RSAD2, SERPING1, SIGLEC1, SLAMF7, SLC11A1, TAP1, TAP2, TICAM2, TLR8, TNF, TNFAIP6*
GO:0048002	Antigen processing and presentation of peptide antigen	*AP2A2, CANX, HFE, IGLL5, LGMN, OSBPL1A, UBB*	*B2M, CD74, ERAP2, FCER1G, HLA-B, HLA-DMB, HLA-DOA, HLA-DPA1, HLA-E, HLA-F, ICAM1, PSMB8, PSMB9, PSME1, SLC11A1, TAP2, TAPBPL*
GO:0045087	Innate immune response	*ACTR2, ADAM15, APP, CD44, CD46, CTSB, IGLL5, LGMN, MAP2K3, MATK, UBB, XRCC5*	*APOBEC3G, APOL1, C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1S, C2, C4A, C4B, CALCOCO2, CD180, CEBPG, CFB, CIITA, DHX58, FCGR1A, FCGR1C, GCH1, IFIH1, IL27, NCF1, NCF1C, NOD2, PRDX1, SERPING1, SLAMF7, SLC11A1, TICAM2, TLR8*
GO:0080134	Regulation of response to stress	*AP2A2, CD44, CD46, CTSB, DDX39B, DNAJC7, LGMN, MAP2K, MYO1F, TARBP2, UBB, XRCC5, ZEB2*	—
GO:0007259	JAK-STAT cascade	—	*IL31RA, JAK2, NMI, SOCS1, STAT1, STAT2*
GO:0055114	Oxidation reduction process	*ALDH6A1, CYB5R1, GNAS, KIAA1191, PPP1R2, UBB*	
GO:0006897	Endocytosis	*ACTR2, AP2A2, APP, CLINT1, IGLL5, INPPL1, RIN2, SNX6*	*CDC42SE2, CLEC10A, FCER1G, FCGR1A, FCGR1C, FNBP1, LY75, MERTK, P2RX7, PTX3, SCARF1, SLC11A1*
GO:0030335	Positive regulation of cell migration	*ADAM10, ARHGAP5, MYO1F*	*CXCL10, HIF1A, ICAM1, ILK, JAK2, PDGFB*
GO:0007264	Small GTPase-mediated signal transduction	*ACTR2, ARHGAP25, ARHGEF1, CLIP1, CTNNA1, G3BP1, PPP2R4, RIN2*	*FARP2, HMOX1, IQGAP3, LRRK2, MAPK13, RAB24, RAB7B, RALB, RAPGEF2, RHOU, RSU1*
GO:0016192	Vesicle-mediated transport	*ACTN1, ACTR2, APP, CLINT1, IGLL, INPPL1, MYO1F, OSBPL1A, RIN2, SNX6, TAPBP*	*CCL8, CDC42SE2, CHMP5, CLEC10A, FCER1G, FCGR1A, FCGR1C, FNBP1, LY75, LYN, MERTK, OPTN, P2RX7, PLEK, PTX3, RHOBTB3, SCARF1, SLC11A1, STX11, VAMP5*
GO:0007599	Hemostasis	*ACTN1, APP, ATP2A2, CD44, FLI1, GNAS, PPP2R4*	*CD40, CD9, FBLN5, PLEK, SERPING1, THBD*
GO:0010628	Positive regulation of gene expression	*APP, DDX39B, FLI1, HEXB, MAP2K3, MED16, SAFB, UBB*	*BCL3, CIITA, HIF1A, IL31RA, IRF1, PRDM1, SLC11A1, TNF, TNFSF13B*
GO:0045892	Negative regulation of transcription, DNA templated	*BASP1, HDGF, JAZF1, MITF, MXD1, MXI1, SMAD4, SNX6, UBB, XRCC5*	*CIITA, IRF7, MECP2, PRDM1, RFX5, TNF*
GO:0030154	Cell differentiation	*ACTR2, ADAM10, ADAM15, ALDH6A1, AP2A2, APP, ARHGEF1, BAG6, BASP1, CD74, CTSB, EPHB2, FLI1, GIMAP5, HEXB, HIF1A, ILK, JAK2, KITLG, LPL, LYN, MATK, NAPA, PRPF19, SEMA4D, SMAD4, TCF12, TNFAIP2, UBB, XRCC5, ZEB2, ZFP36L1*	*CD46, CD74, CTNNA1, EPHB2, GIMAP5, GNAS, HIF1A, ILK, JAK2, KITLG, LPL, LYN, PRPF19, SEMA4D, TCF12, XRCC5*
GO:0002521	Leukocyte differentiation	*ZFP36L1*	*BAK1, BCL3, CASP8, CD74, CEBPG, FASL, GIMAP5, GPR183, IL15, IL31RA, IRF1, NFAM1, TNF*
GO:0030099	Myeloid cell differentiation	*FLI1, GNAS, MITF*	*CASP8, CEBPG, GIMAP5, IL31RA, JAK2, LYN, PML, TNF*

(Continued)

TABLE I. *(Continued)*

GO term	GO category	Dysregulated genes in patients with CD40L deficiency	Genes not affected by the CD40L deficiency but modulated by rhIFN-γ treatment
GO:0010608	Posttranscriptional regulation of gene expression	*APP*	*BCL3, EIF5A, FBXO7, MOV10, PML, SLC11A1, TNF*
GO:0006417	Regulation of translation	*APP, TARBP2, ZFP36L1*	*BCL3, EIF5A, PML, TNF*
GO:0031401	Positive regulation of protein modification process	*CD44, HDGF, HFE, PPP2R4, UBB, ZEB2*	*CCNB1, CDK1, CUL1, IL31RA, JAK2, KITLG, LRRK2, LYN, NOD2, P2RX7, PLK1, PML, PSMA2, PSMA4, PSMA5 PSME2, PSMA6, PSMB10, PSMB2, PSMB8, PSMB9, PSME1, TNF*
GO:0045859	Regulation of protein kinase activity	*APP, GPS1, HDGF, SNX6, TARBP2, UBB, ZEB2*	*AKT1S1, C5AR1, CD74, CDKN1A, CDKN2C, GADD45B, ILK, JAK2, KITLG, P2RX7, PAK1, PDGFB, RGS3, SLC11A1, TNF, TRAF2*

in patients with CD40L deficiency,[18,20,45] we asked whether macrophages from CD40L-deficient patients have normal capacity to control the growth of *M tuberculosis*. Macrophages from CD40L-deficient patients phagocytosed *M tuberculosis* normally compared with macrophages from healthy control subjects (Fig 3, *A*) but did not control the intracellular proliferation of *M tuberculosis*. Most importantly, in accordance with the observation that refractory mycobacterial disease improves with rhIFN-γ treatment (case report), rhIFN-γ significantly increased the control of *M tuberculosis* proliferation *in vitro* by macrophages from patients and healthy control subjects (Fig 3, *B*).

rhIFN-γ improves dysregulation of the macrophage transcriptome in patients with CD40L deficiency

Based on the multiple macrophage functional defects observed in CD40L-deficient patients, we hypothesized that macrophages from CD40L-deficient patients have systemic dysregulation at the gene expression level. Therefore we analyzed the transcriptome of MDMs from CD40L-deficient patients using RNA sequencing and evaluated the effect of rhIFN-γ on gene expression. Because it was not possible to collect enough macrophages to stimulate them with both rhIFN-γ and sCD40L, we focused on the effect of rhIFN-γ because it had the most potential as a new therapeutic option for patients with CD40L deficiency. We based this decision on the previously observed success of rhIFN-γ therapy for certain infections,[28-31] its approval by the US Food and Drug Administration, and its feasibility for clinical use.

We obtained sufficient numbers of MDMs from 3 patients (P1, P2, and P3). Before rhIFN-γ treatment, we identified a total of 109 dysregulated genes (DEGs; 48 downregulated and 61 upregulated genes) when macrophages from CD40L-deficient patients were compared with those from healthy control subjects (Fig 4, *A*, left panel). The functional association network of the DEGs in patients with CD40L deficiency is demonstrated in Fig 4, *B*. Dysregulation of the macrophage transcriptome in patients with CD40L deficiency was not due to M-CSF–induced CD40L effects during MDM generation because M-CSF was unable to induce CD40L expression on MDMs (see Fig E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Furthermore, no CD40L transcript was undetectable by using RNA sequencing. On the other hand, sCD40L increased the capacity of the promyelocytic HL-60 cells to control *M tuberculosis* proliferation (see Fig E3 in this article's Online Repository at www.jacionline.org), indicating a role of CD40L-CD40 interaction on myeloid cell development. A detailed investigation about the effect of the CD40L-CD40 interaction on promyelocytic HL-60 cells will be published elsewhere (manuscript in preparation).

It is noteworthy that rhIFN-γ restored the gene expression profile of the majority of DEGs in patients' macrophages. After rhIFN-γ treatment, only 11 of 109 genes remained differentially expressed in comparison with results seen in healthy control subjects (Fig 4, *A*, right panel). In addition to improving the expression of 109 DEGs, rhIFN-γ influenced the expression of 526 additional genes (133 downregulated and 393 upregulated genes) compared with that seen in healthy control subjects (Fig 5). The subsets of 109 DEGs and the additional 526 genes that were affected by the rhIFN-γ treatment are shown within GO categories (Table I). The main subsets of genes are directly involved with the immune system (GO0002376), including the inflammatory response (GO0006954) and wound response (GO0009611). Moreover, genes responsible for regulation of transcription (GO:0010628 and GO:0045892) and cell differentiation (GO:0030154, GO:0000904, GO:0045597, GO:0002521, and GO:0030099) were also affected.

rhIFN-γ increases TLR and CLR expression levels

Production of proinflammatory cytokines, oxidative burst, and effective microbicidal activity are essential functions of M1 macrophages, which contrast with M2 macrophages (called alternatively activated macrophages).[47,48] Despite the functional defects we observed, no phenotypic alteration was identified on macrophages from CD40L-deficient patients. The normal expression of CD86, CD163, and CD206 molecules is shown in Fig E4 in this article's Online Repository at www.jacionline.org, all of which are markers that have been used to distinguish M1/M2 subpopulations.[49-51] Moreover, macrophages from patients with CD40L deficiency expressed TLRs and CLRs normally (Fig 6). Remarkably, rhIFN-γ significantly increased expression of TLR1, TLR2, dectin-1, and CD209 molecules in macrophages from patients and healthy control subjects.

DISCUSSION

Here we show that human CD40L deficiency impairs innate immune responses by affecting macrophage differentiation and function. Macrophage defects associated with impaired dendritic

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME 139, NUMBER 3

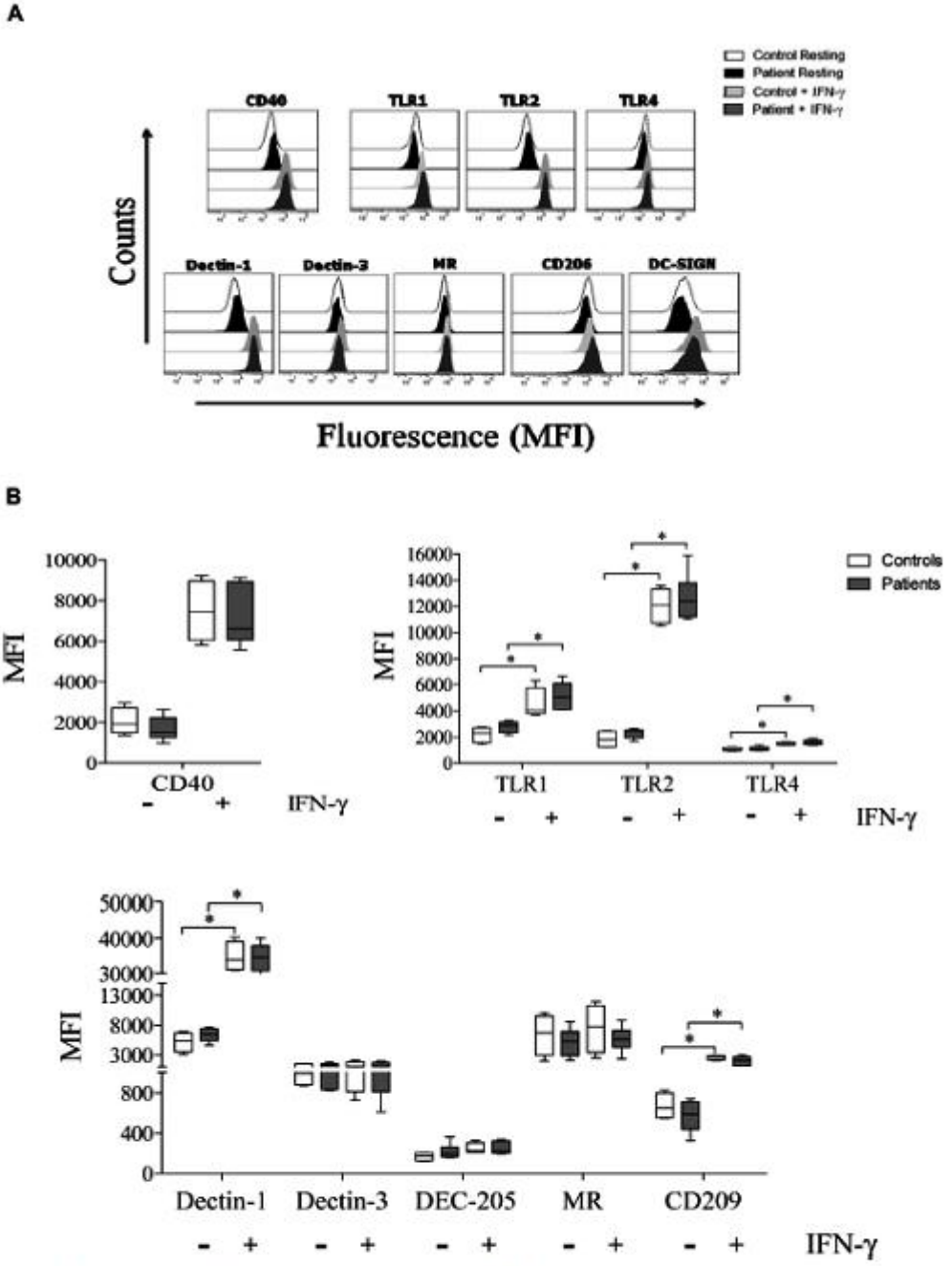


FIG 6. Effect of rhIFN-γ on expression of CD40, TLRs, and CLRs by macrophages. Representative histograms **(A)** and graphics **(B)** showing CD40, TLR (TLR1, TLR2, and TLR4), and CLR (dectin-1, dectin-3, mannose receptor or MR, DEC-205, and CD209) expression, as analyzed by means of cytometry. MDMs were analyzed after 5 days in the presence of M-CFS, followed by 2 additional days in the presence or absence of rhIFN-γ. No significant differences in MDMs from patients versus healthy subjects were observed. $^{*}P \leq .05$ (n = 6 patients and 6 control subjects), Mann-Whitney test. *NS*, Not significant; *MFI*, Mean fluorescence intensity.

cell (DC) response in patients with CD40L[22] and CD40[52] deficiencies point to an essential role of the CD40L-CD40 interaction during differentiation of myeloid cells. This fact clarifies a new immunopathologic mechanism underlying the increased susceptibility of CD40L-deficient patients to opportunistic infections, which might explain the increased rate of deaths observed in

patient with CD40L deficiency despite the current treatment armamentarium.[18,20] The possibility that the differences observed between CD40L-deficient patients and young adult control subjects are age related is unlikely. It is well known that innate immune cells, such as macrophages, from neonates and infants less than 2 years of age have inherent defects; however, older children display immune responses comparable with those of adults.[53-59] In our diagnostic laboratory we have routinely observed that infants in the first years of life with undefined primary immunodeficiency disorders, in whom the diagnosis of CGD has been ruled out by demonstrating normal NADPH activity, have normal phagocyte responses compared with those in healthy control subjects (data not shown).

Macrophages have to undergo maturation to a stage that allows normal clearance of invading pathogens through different mechanisms, including generation of a fully potent oxidative burst. The importance of this pathway is illustrated by CGD, which is caused by defects affecting components of the phagocyte NADPH oxidase complex that are crucial in oxidative burst. Patients with CGD face life-threatening infections, even when oxidative burst is only slightly reduced or partially inhibited.[17,60,61] Therefore the partially defective oxidative burst observed in macrophages from CD40L-deficient patients might contribute to the abnormal microbicidal activity that we demonstrated in our experiments and might be a risk factor for the increased susceptibility to opportunistic fungal and intracellular bacterial infections. However, it seems unlikely that defective fungicidal activity in macrophages from CD40L-deficient patients is solely due to reduced reactive oxygen species production because additional nonoxidative killing mechanisms might also be affected.

The impaired microbicidal activity, oxidative burst, and defective production of cytokines (eg, IL-6, TNF-α, IL-1β, macrophage inflammatory protein 1β, IP-10, and G-CSF) by patients' macrophages suggest that the absence of CD40L not only impairs effector function of macrophages but also initiation of inflammatory responses. These results are in accordance with the proinflammatory role of CD40L-CD40 interaction on activation of macrophages from healthy subjects.[9,42] The multiple defects identified in macrophages from patients with CD40L deficiency indicate that more than 1 aspect of the macrophage immune response can be affected in these subjects. In accordance with the numerous functional defects displayed by patients' macrophages, we also observed a dysregulated gene expression signature, which was improved in the presence of rhIFN-γ. Considering the high number of DEGs in macrophages from CD40L-deficient patients, multiple other functions of these cells remain to be investigated further.

Contradictory results regarding IFN-γ production by CD40L-deficient T cells have been reported. However, such incongruences might be explained by the fact that PBMCs/T cells from CD40L-deficient patients are intrinsically capable of producing IL-12 and IFN-γ but do not respond to certain stimuli. We found that PBMCs from CD40L-deficient patients normally produce IL-12 in response to IFN-γ and release IFN-γ in response to IL-12 stimulation (see Fig E5 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). These findings contrast with our previous observation of a significantly impaired IL-12/IFN-γ axis[22] in DC/T-cell cocultures stimulated by *Candida albicans* or *P brasiliensis*. Both Jain et al[23] and Subauste et al[24] described impaired IFN-γ production by PBMCs from CD40L-deficient patients after anti-CD3 stimulation and *Toxoplasma gondii* exposure, respectively. In contrast, Uronen and Callard[62] reported normal IFN-γ release by T cells from CD40L-deficient patients in response to PMA plus ionomycin. In turn, Felipe-Santos et al[63] observed decreased production of IL-12 and IFN-γ in response to PHA; however, normal generation of IL-12 by LPS and IFN-γ by PMA/ionomycin was seen in PBMCs from CD40L-deficient patients compared with generation in healthy control subjects.

The treatment of opportunistic infections in CD40L-deficient patients with rhIFN-γ might reduce the high mortality rate associated with CD40L deficiency, despite currently available treatment options.[18,19,64,65] This possibility has been illustrated by the response of one of our CD40L-deficient patients who, despite all the treatment available, had refractory disseminated mycobacterial infection that was improved after rhIFN-γ adjuvant therapy. Taken together, our data point to rhIFN-γ as a possible adjunct immunotherapy, in combination with conventional therapy, for cases of disseminated opportunistic infections in CD40L-deficient patients. Furthermore, this cytokine is already available and licensed for clinical use.[27,52,54]

Another mechanism by which rhIFN-γ might potentiate macrophage immune responses of macrophages from CD40L-deficient patients is by increasing the expression of TLRs and CLRs, both of which are essential for immune responses against different pathogens.[66] rhIFN-γ treatment of macrophages from both patients and control subjects caused significantly increased expression of TLR1, TLR2, dectin-1, and CD209. The potential of IFN-γ influencing PRR expression might explain how rhIFN-γ can restore microbicidal activity in macrophages from CD40L-deficient patients. However, we did not observe significant changes in TLR1, TLR2, dectin-1, and CD209 mRNA expression after *in vitro* rhIFN-γ treatment in our transcriptome analysis (data not shown). Whether IFN-γ regulates the protein expression of these PRRs by modulating mRNA expression at a different time point than those we assessed or whether it acts at a posttranscriptional level requires further investigation.

In conclusion, our data demonstrated that in the absence of the CD40L-CD40 interaction, macrophages from CD40L-deficient patients exhibit impaired function and differentiation because of dysregulation of gene expression that might contribute to their susceptibility to opportunistic infections. Furthermore, rhIFN-γ might represent a new therapeutic option for patients with CD40L deficiency by restoring certain functions to macrophages.

We thank all the patients and their families for participation in this study. We also thank Dr Eunice Duarte from the Lab Alfa LTDA and Lusinete Tavares from the Federal University of São Paulo for blood sample collection.

Clinical implications: The absence of CD40L impairs macrophage differentiation and function, and its lack contributes to increased susceptibility of CD40L-deficient patients to life-threatening infections. Furthermore, rhIFN-γ improves the function of macrophages from CD40L-deficient patients, indicating this cytokine as a potential new adjuvant therapy.

REFERENCES

1. 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.

2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Korthäuer U, Graf D, Mages HW, Brière 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.
6. Kim HS, Zhang X, Choi YS. Activation and proliferation of follicular dendritic cell-like cells by activated T lymphocytes. J Immunol 1994;153:2951-61.
7. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J Exp Med 1994;180:1263-72.
8. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, et al. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. N Engl J Med 2003;348:1104-11.
9. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature 1998;391:591-4.
10. Mavroudi I, Papadaki H. The role of CD40/CD40 ligand interactions in bone marrow granulopoiesis. Sci World J 2011;11:2011-9.
11. Mazzei GJ, Edgerton MD, Losberger C, Lecoanet-Henchoz S, Graber P, Durandy A, et al. Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. J Biol Chem 1995;270:7025-8.
12. Saeland S, Duvert V, Caux C, Pandrau D, Favre C, Vallé A, et al. Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34+ hematopoietic cells. Exp Hematol 1992;20:24-33.
13. Solanilla A, Dechanet J, El Andalousi A, Dupouy M, Godard F, Chabrol J, et al. CD40-ligand stimulates myelopoiesis by regulating flt3-ligand and thrombopoietin production in bone marrow stromal cells. Blood 2000;95:3758-64.
14. Flores-Romo L, Bjørck P, Duvert V, van Kooten C, Saeland S, Banchereau 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.
15. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. J Immunol 1996;156:3952-60.
16. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science 2010;327:656-61.
17. Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, et al. Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. N Engl J Med 2010;363:2600-10.
18. Cabral-Marques O, Klaver S, Schimke LF, Ascendino ÉH, Khan TA, Pereira PVS, et al. First report of the hyper-IgM syndrome registry of the Latin American Society for Immunodeficiencies: novel mutations, unique infections, and outcomes. J Clin Immunol 2014;34:146-56.
19. de Oliveira-Junior EB, Zurro NB, Prando C, Cabral-Marques O, Pereira PV, Schimke L-F, et al. Clinical and genotypic spectrum of chronic granulomatous disease in 71 Latin American patients: first report from the LASID registry. Pediatr Blood Cancer 2015;62:2101-7.
20. Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P, et al. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. J Pediatr 1997;131:47-54.
21. Cabral-Marques O, Schimke L-F, Pereira PV, Falcai A, de Oliveira JB, Hackett MJ, et al. Expanding the clinical and genetic spectrum of human CD40L deficiency: the occurrence of paracoccidioidomycosis and other unusual infections in Brazilian patients. J Clin Immunol 2012;32:212-20.
22. Cabral-Marques O, Ardanian C, Ramos RN, Morato M, Schimke L, Soeiro Pereira PV, et al. Dendritic cells from X-linked hyper-IgM patients present impaired responses to *Candida albicans* and *Paracoccidioides brasiliensis*. J Allergy Clin Immunol 2012;129:778-86.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Bemiller LS, Roberts DH, Starko KM, Curnutte JT. Safety and effectiveness of long-term interferon gamma therapy in patients with chronic granulomatous disease. Blood Cells Mol Dis 1995;21:239-47.
27. Marciano BE, Wesley R, De Carlo ES, Anderson VL, Barnhart LA, Darnell D, et al. Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. Clin Infect Dis 2004;39:692-9.
28. Gao XF, Yang ZW, Li J. Adjunctive therapy with interferon-gamma for the treatment of pulmonary tuberculosis: a systematic review. Int J Infect Dis 2011;15:e594-600.
29. Abzug MJ, Walsh TJ. Interferon-gamma and colony-stimulating factors as adjuvant therapy for refractory fungal infections in children. Pediatr Infect Dis J 2004;23:769-73.
30. Kelleher P, Goodall A, Mulgirigama A, Kunst H, Henderson DC, Wilson R, et al. Interferon-gamma therapy in two patients with progressive chronic pulmonary aspergillosis. Eur Respir J 2006;27:1307-10.
31. Al-Muhsen S, Casanova JL. The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. J Allergy Clin Immunol 2008;122:1043-51.
32. Beyer M, Mallmann MR, Xue J, Staratschek-Jox A, Vorholt D, Krebs W, et al. High-resolution transcriptome of human macrophages. PLoS One 2012;7:e45466.
33. 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.
34. Soeiro-Pereira PV, Falcai A, Kubo CA, Oliveira-Júnior EB, Marques OC, Antunes E, et al. BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase agonist, activates human mononuclear phagocytes. Br J Pharmacol 2012;166:1617-30.
35. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:4560-5.
36. Amaral EP, Ribeiro SCM, Lanes VR, Almeida FM, de Andrade MR, Bomfim CC, et al. Pulmonary infection with hypervirulent *Mycobacteria* reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. PLoS Pathog 2014;10:e1004188.
37. Dong C, Zhao G, Zhong M, Yue Y, Wu L, Xiong S. RNA sequencing and transcriptomal analysis of human monocyte to macrophage differentiation. Gene 2013;519:279-87.
38. Hensman J, Papastamoulis P, Glaus P, Honkela A, Rattray M. Fast and accurate approximate inference of transcript expression from RNA-seq data. Bioinformatics 2015;31:3881-9.
39. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Res 2015;43:D447-52.
40. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res 2009;37:1-13.
41. Huang da DW, Lempicki RA, Sherman BT. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc 2009;4:44-57.
42. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet 2000;25:25-9.
43. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. Nucleic Acids Res 2010;38:W214-20.
44. Bustamante J, Arias AA, Vogt G, Picard C, Galicia LB, Prando C, et al. Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. Nat Immunol 2011;12:213-21.
45. Wang LL, Zhou W, Zhao W, Tian ZQ, Wang WF, Wang XF, et al. Clinical features and genetic analysis of 20 Chinese patients with X-linked hyper-IgM syndrome. J Immunol Res 2014;2014:683160.
46. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova J-L. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-γ immunity. Semin Immunol 2014;26:454-70.
47. Covarrubias A, Byles V, Horng T. ROS sets the stage for macrophage differentiation. Cell Res 2013;23:984-5.
48. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. Nat Rev Immunol 2009;9:259-70.
49. Weber M, Moebius P, Büttner-Herold M, Amann K, Preidl R, Neukam FW, et al. Macrophage polarisation changes within the time between diagnostic biopsy and tumour resection in oral squamous cell carcinomas—an immunohistochemical study. Br J Cancer 2015;113:510-9.
50. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat Immunol 2010;11:889-96.

51. Röszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. Mediators Inflamm 2015;2015:816460.
52. 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.
53. De Kleer I, Willems F, Lambrecht B, Goriely S. Ontogeny of myeloid cells. Front Immunol 2014;5:423.
54. Maródi L, Káposzta R, Campbell DE, Polin RA, Csongor J, Johnston RB Jr. Candidacidal mechanisms in the human neonate. Impaired IFN-gamma activation of macrophages in newborn infants. J Immunol 1994;153:5643-9.
55. Lu CY, Calamai EG, Unanue ER. A defect in the antigen-presenting function of macrophages from neonatal mice. Nature 1979;282:327-9.
56. Weston WL, Carson BS, Barkin RM, Slater GD, Dustin RD, Hecht SK. Monocyte-macrophage function in the newborn. Am J Dis Child 1977;131:1241-2.
57. Maródi L. Neonatal innate immunity to infectious agents. Infect Immun 2006;74:1999-2006.
58. Wilson CB, Lewis DB. Basis and implications of selectively diminished cytokine production in neonatal susceptibility to infection. Rev Infect Dis 1990;12(suppl 4):S410-20.
59. Marodi L. Down-regulation of Th1 responses in human neonates. Clin Exp Immunol 2002;128:1-2.
60. Borregaard N, Cross AR, Herlin T, Jones OT, Segal AW, Valerius NH. A variant form of X-linked chronic granulomatous disease with normal nitroblue tetrazolium slide test and cytochrome b. Eur J Clin Invest 1983;13:243-8.
61. Roesler J, Segerer F, Morbach H, Kleinert S, Thieme S, Rösen-Wolff A, et al. 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.
62. Uronen H, Callard RE. Absence of CD40-CD40 ligand interactions in X-linked hyper-IgM syndrome does not affect differentiation of T helper cell subsets. Clin Exp Immunol 2000;121:346-52.
63. Filipe-Santos O, Bustamante J, Haverkamp MH, Vinolo E, Ku C-L, Puel A, et al. X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. J Exp Med 2006;203:1745-59.
64. Seminario AG, Diaz Ballve D, Comas D, Gomez Raccio A, Di Giovanni D, Bezrodnik L. Disseminated mycobacterial infection in a patient with CD40L deficiency. J Clin Immunol 2013;33:S108.
65. Winkelstein JA, Marino MC, Ochs H, Fuleihan R, Scholl PR, Geha R, et al. The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients. Medicine (Baltimore) 2003;82:373-84.
66. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. Nat Rev Immunol 2009;9:465-79.