TÁBATA TAKAHASHI FRANÇA

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

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

Área de Concentração: Imunologia

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

Versão Original.

São Paulo

2021

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

centros germinativos e níveis séricos elevados de IgM associados à redução de IgG, razão pela qual a doença foi inicialmente chamada de Disgamaglobulinemia[18–20].

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

Tabela 1. Manifestações clínicas na deficiência de CD40L*.

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

* Adaptado de Qamar e Fuleihan, 2014[12].

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

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

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

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

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

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

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

O principal receptor do CD40L é o CD40, proteína transmembrana do tipo I pertencente à superfamília de receptores do TNF e seu gene se encontra localizado no cromossomo 20[46]. O CD40 é constitutivamente expresso em células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *antigen presenting cells*) como linfócitos B, macrófagos e DCs, sendo também expresso por plaquetas, células endoteliais, linfócitos T e neutrófilos após ativação[45,47]. A interação do CD40L com o CD40 induz o recrutamento de proteínas adaptadoras associadas ao receptor TNF (TRAF, do inglês *TNF-receptor associated factors*), predominantemente TRAF1, TRAF2 e TRAF6, que desencadeiam a ativação de diferentes vias de sinalização intracelulares, incluindo a ativação das vias do fator nuclear ḳB (NF-ḳB, do inglês *nuclear fator ḳB*) e JNK/p38/ERK[47]. A sinalização pode também ocorrer independente de proteínas TRAFs por meio de tirosinas quinases incluindo Jak3 e PI3K, gerando subsequente ativação da via Jak-STAT[48,49]. A estimulação destas diferentes vias culminam na ativação dos fatores de transcrição AP1, NF-ḳB e NF-AT e subsequente indução da expressão de genes relacionados a produção de citocinas e resposta celular[48–50]. Além disso, outras moléculas como o Mac-1, αIIbβ3 e α5β1 também podem interagir com o CD40L[51–53], destacando a importância da sinalização gerada pelo CD40L em diferentes contextos da resposta imune[54].

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

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

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

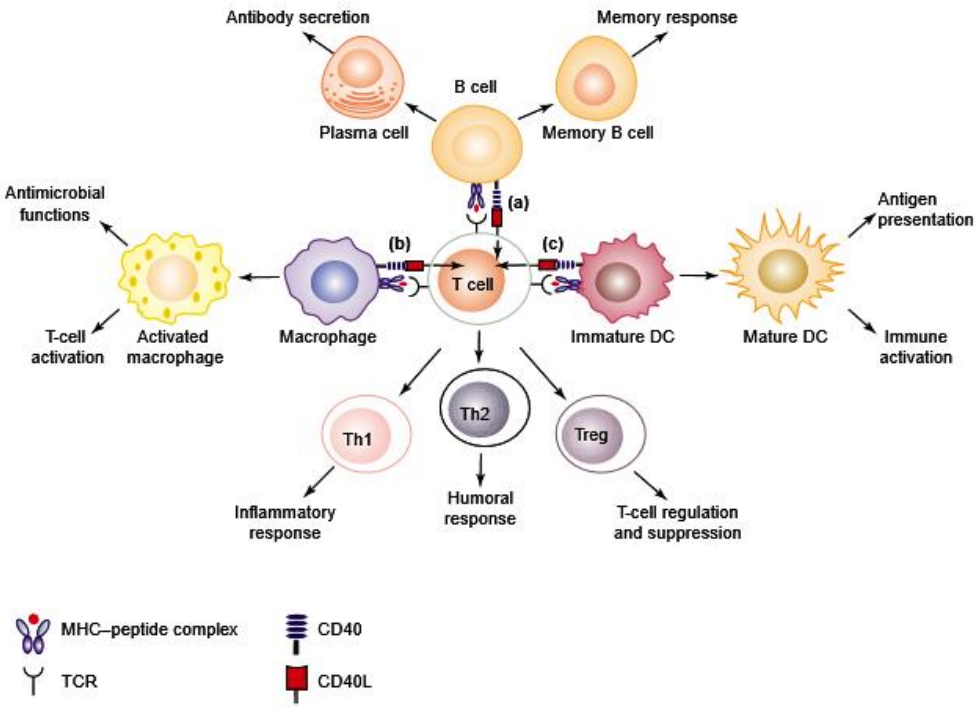

Figura 1. A interação CD40L-CD40 na resposta imune. Linfócitos T CD4+ expressando CD40L interagem com o CD40 expresso por APCs e induz diferentes funções em linfócitos B (a), macrófagos (b) e DCs (c)[55].

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

1.4. Os neutrófilos na saúde e na doença.

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

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

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

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

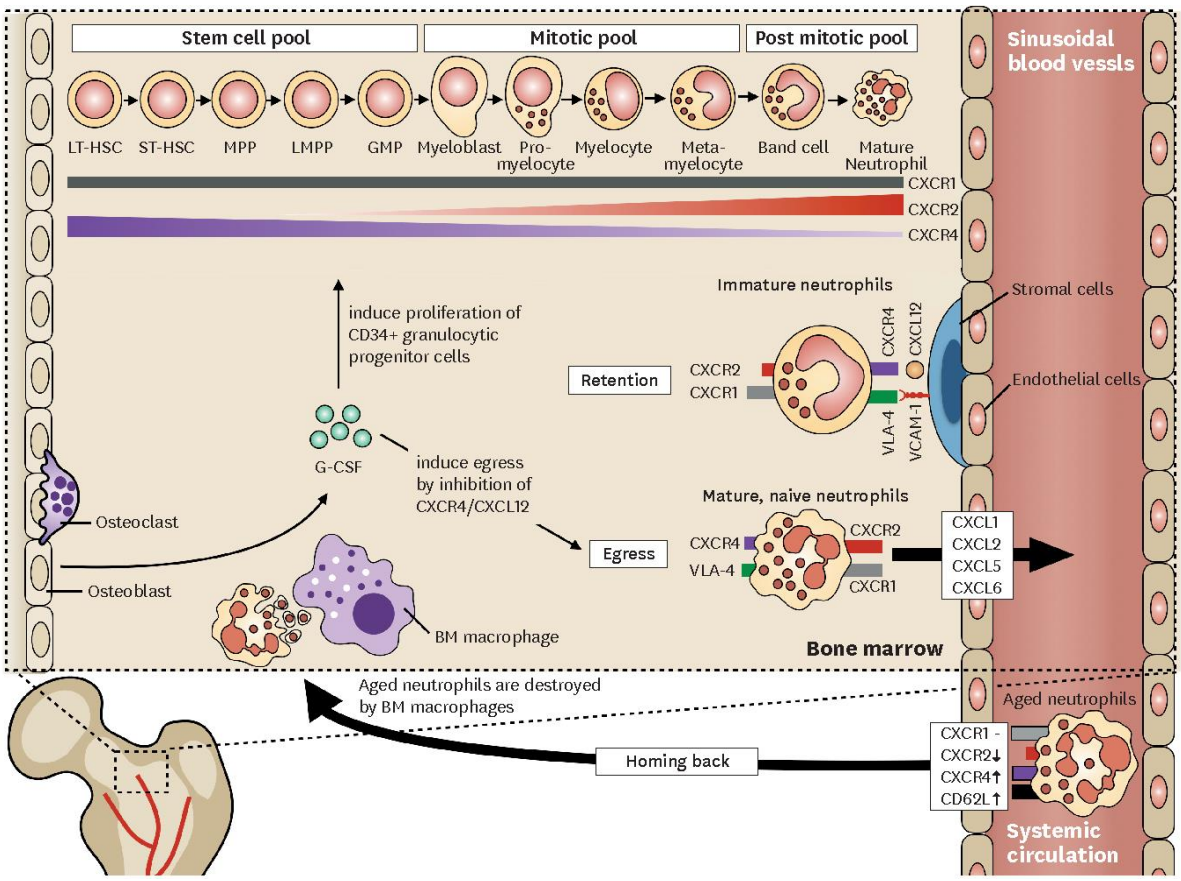

Figura 2. Geração e tráfego de neutrófilos na medula óssea. Os neutrófilos se desenvolvem na medula óssea (MO) a partir de células tronco hematopoiéticas e expressam diferentes receptores de acordo com os estágios do desenvolvimento. O CXCR2 é expresso de acordo com a evolução da maturação, enquanto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

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

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

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

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

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

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

1.5. Os neutrófilos e a deficiência de CD40L.

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

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

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

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

CONCLUSÕES FINAIS

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

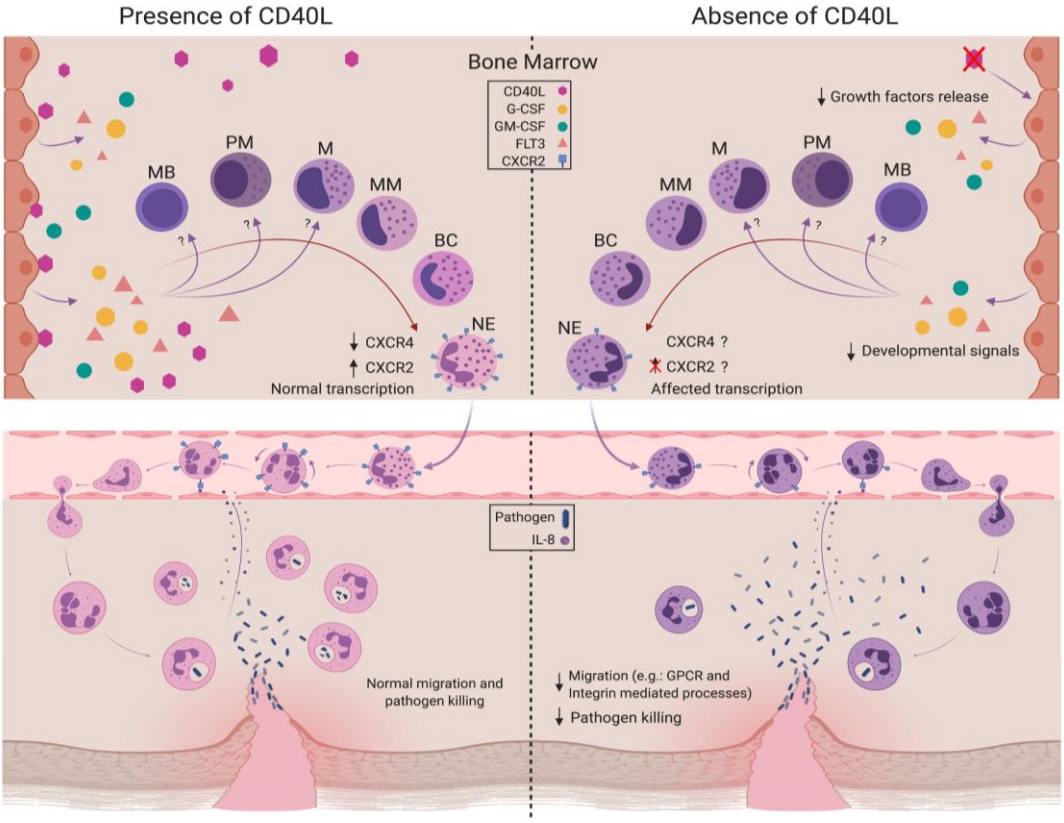

Figura 35. Mecanismo proposto de granulopoiese induzida por CD40L. Na presença de CD40L, células estromais da MO liberaram fatores de crescimento que atuam em linhagens mieloides e neutrófilos, influenciando a produção e o desenvolvimento dessas células; neutrófilos maduros são liberados para a corrente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

2. REFERÊNCIAS

1. Picard, C. *et al*. International Union of Immunological Societies : 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol* **38**, 96–128 (2018).

2. Mccusker, C., Upton, J. & Warrington, R. Primary immunodeficiency. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **14**, 141–152 (2018).

3. Tangye, S. G. *et al*. The Ever-Increasing Array of Novel Inborn Errors of Immunity: an Interim Update by the IUIS Committee. *J. Clin. Immunol.* **41**, 666–679 (2021).

4. Bousfiha, A. *et al*. The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol* **38**, 129–143 (2018).

5. Tangye, S. G., Al-herz, W., Bousfiha, A., Chatila, T. & Cunningham-rundles, C. Human Inborn Errors of Immunity : 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J. Allergy Clin. Immunol.* **40**, 24–64 (2020).

6. Bonilla, F. A. *et al*. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 1186–1205 (2015).

7. Picard, C. *et al*. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J. Clin. Immunol.* **35**, 696–726 (2015).

8. Notarangelo, L. D., Duse, M. & Ugazio, A. G. Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). *Immunodefic. Rev.* **3**, 101–121 (1992).

9. de la Morena, M. T. Clinical Phenotypes of Hyper-IgM Syndromes. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **4**, 1023–1036 (2016).

10. Jhamnani, R. D., Nunes-santos, C. J., Bergerson, J. & Rosenzweig, S. D. Class-Switch Recombination (CSR)/ Hyper-IgM (HIGM) Syndromes and Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Defects. *Front. Immunol.* **9**, 3–8 (2018).

11. Davies, E. G. & Thrasher, A. J. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. *Br. J. Haematol.* **149**, 167–180 (2010).

12. Qamar, N. & Fuleihan, R. L. The Hyper IgM Syndromes. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **46**, 120–130 (2014).

13. Yu, K. & Lieber, M. R. Current insights into the mechanism of mammalian immunoglobulin class switch recombination. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **11**, 1–19 (2019).

14. Levy, J. *et al*. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J. Pediatr.* **131**, 47–54 (1997).

15. Yazdani, R. *et al*. The hyper IgM syndromes : Epidemiology , pathogenesis , clinical manifestations , diagnosis and management. *Clin. Immunol.* **198**, 19–30 (2019).

16. Winkelstein, J. A. *et al*. The X-Linked Hyper-IgM Syndrome: Clinical and Immunologic Features of 79 Patients. *Medicine (Baltimore).* **82**, 373–384 (2003).

17. de la Morena, M. T. *et al*. Long term outcomes of 176 patients with X-linked hyper IgM syndrome treated with or without hematopoietic cell transplantation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 1282–1292 (2017).

18. Rosen, F. S., Kevy, S. V, Merler, E., Janeway, C. A. & Gitlin, D. Recurrent bacterial infections and dysgammaglobulinemia: deficiency of 7S gamma-globulins in the presence of elevated 19S gamma-globulins. *Pediatrics* **28**, 182 LP – 195 (1961).

19. BURTIN, P. An example of atypical agammaglobulinemia (a case of severe hypogammaglobulinemia with increase of the beta-2 macroglobulin. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.* **6**, 286–289 (1961).

20. Etzioni, A. & Ochs, H. D. The hyper IgM syndrome - An evolving story. *Pediatr. Res.* **56**, 519–525 (2004).

21. Smith, T. & Cunningham-rundles, C. Primary B-Cell Immunodeficiencies. *Hum. Immunol.* **80**, 351–362

(2019).

22. França, T. T. *et al.* CD40 ligand deficiency: treatment strategies and novel therapeutic perspectives. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **15**, 529–540 (2019).

23. Orange, J. S., Grossman, W. J., Navickis, R. J. & Wilkes, M. M. Impact of trough IgG on pneumonia incidence in primary immunodeficiency: A meta-analysis of clinical studies. *Clin. Immunol.* **137**, 21–30 (2010).

24. Orange, J. S. *et al.* Use of intravenous immunoglobulin in human disease: A review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, S525-553 (2006).

25. De Gracia, J. *et al.* Immunoglobulin therapy to control lung damage in patients with common variable immunodeficiency. *Int. Immunopharmacol.* **4**, 745–753 (2004).

26. Boxer, L. A. How to approach neutropenia. *Hematology* **2012**, 174–182 (2012).

27. Notarangelo, L. D. & Hayward, A. R. X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (XHIM). *Clin. Exp. Immunol.* **120**, 399–405 (2000).

28. Gennery, A. R. *et al.* Treatment of CD40 ligand deficiency by hematopoietic stem cell transplantation : a survey of the European experience , 1993-2002. *Blood* **103**, 1152–1157 (2004).

29. Al-Saud, B. *et al.* Hematopoietic stem cell transplant for hyper-IgM syndrome due to CD40L defects: A single-center experience. *Pediatr. Transplant.* **19**, 634–639 (2015).

30. Mitsui-Sekinaka, K. *et al.* Clinical features and hematopoietic stem cell transplantations for CD40 ligand deficiency in Japan. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 1018–1024 (2015).

31. Allewelt, H. *et al.* Hematopoietic Stem Cell Transplantation for CD40 Ligand Deficiency: Single Institution Experience. *Pediatr. Blood Cancer* **62**, 2216–2222 (2015).

32. Ferrua, F. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation for CD40 ligand deficiency : Results from an EBMT / ESID-IEWP-SCETIDE-PIDTC study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **143**, 2238–2253 (2019).

33. Costa-carvalho, B., González-Serrano, M., Espinosa-padilla, S. & Segundo, G. Latin American Challenges with the Diagnosis and Treatment of Primary Immunodeficiency Diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **13**, 483–489 (2016).

34. Allen, R. C. *et al.* CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* **259**, 990–3 (1993).

35. Aruffo, A. *et al.* The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* **72**, 291–300 (1993).

36. DiSanto, J. P., Bonnefoy, J. Y., Gauchatt, J. F., Fischer, A. & Saint Basile, G. De. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* **361**, 541–543 (1993).

37. Fuleihan, R. *et al.* Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2170–2173 (1993).

38. Korthäuer, U. *et al.* Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* **361**, 539–541 (1993).

39. Shimadzu, M. *et al.* Structural organization of the gene for CD40 ligand: molecular analysis for diagnosis of X-linked hyper-IgM syndrome. *Biochim. Biophys Acta* **1260**, 67–72 (1995).

40. Villa, A. *et al.* Organization of the human CD40L gene: Implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2110–2114 (1994).

41. Thusberg, J. & Vihinen, M. The structural basis of hyper IgM deficiency - CD40L mutations. *Protein Eng. Des. Sel.* **20**, 133–141 (2007).

42. Noelle, R. J. *et al.* A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6550–6554 (1992).

43. Bodmer, J. L., Schneider, P. & Tschopp, J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends*

Biochem. Sci. **27**, 19–26 (2002).

44. Farrera, C. & Fadeel, B. Macrophage Clearance of Neutrophil Extracellular Traps Is a Silent Process. *J. Immunol.* **191**, 2647–2656 (2013).

45. Libby, P. The CD40 / CD154 receptor / ligand dyad. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 4–43 (2001).

46. Ramesh, N., Ramesh, V., Gusella, J. F. & Geha, R. Chromosomal localization of the gene for human B-cell antigen CD40. *Somat. Cell Mol. Genet.* **19**, 295–298 (1993).

47. Michel, N. A., Zirlik, A. & Wolf, D. CD40L and Its Receptors in Atherothrombosis—An Update. *Front. Cardiovasc. Med.* **4**, 40 (2017).

48. Kooten, C. Van, Banchereau, J. & Gene, C. D. L. CD40-CD40 ligand. **67**, (2000).

49. Bishop, G. A., Moore, C. R., Xie, P., Stunz, L. L. & Kraus, Z. J. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* **597**, 131–151 (2007).

50. Elgueta, R. *et al.* Molecular mechanism and function of Cd40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* **229**, 1–31 (2009).

51. Léveillé, C. *et al.* CD40 ligand binds to α5β1 integrin and triggers cell signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 5143–5151 (2007).

52. El Fakhry, Y. *et al.* Functional interaction of CD154 protein with α5β1 integrin is totally independent from its binding to αIIbβ3 integrin and CD40 molecules. *J. Biol. Chem.* **287**, 18055–18066 (2012).

53. Zirlik, A. *et al.* CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation* **115**, 1571–1580 (2007).

54. Hassan, G. S., Merhi, Y. & Mourad, W. M. CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies. *Trends Immunol.* **30**, 165–172 (2009).

55. Mathur, R. K., Awasthi, A. & Saha, B. The conundrum of CD40 function: Host protection or disease promotion? *Trends Parasitol.* **22**, 117–122 (2006).

56. Wykes, M. Why do B cells produce CD40 ligand ? *Immunol. Cell Biol.* **81**, 328–331 (2003).

57. Durandy, A. & Kracker, S. Immunoglobulin class-switch recombination deficiencies. *Arthritis Res. Ther.* **14**, 218 (2012).

58. Foy, T. M. *et al.* gp39-CD40 Interactions Are Essential for Germinal Center Formation and the Development of B Cell. *J Exp Med* **180**, 157–163 (1994).

59. Nonoyama, S., Hollenbaugh, D., Aruffo, A., Ledbetter, J. A. & Ochs, H. D. B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells. *J. Exp. Med.* **178**, 1097–102 (1993).

60. Noelle, R. J., Ledbetter, J. A. & Aruffo, A. CD40 and its ligand , an essential ligand- receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol. Today* **13**, 431–433 (1992).

61. van Kooten, C., Banchereau, J. & Banchereaut, J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Structure* **9**, 330–337 (1997).

62. Kiener, P. A. *et al.* Stimulation of CD40 with Purified Soluble gp39 Induces Proinflammatory Responses in Human Monocytes. *J. Immunol.* **155**, 4917–4925 (1995).

63. Fontana, S. *et al.* Functional defects of dendritic cells in patients with CD40 deficiency. *Blood* **102**, 4099–4106 (2003).

64. Cabral-Marques, O. *et al.* Dendritic cells from X-linked hyper-IgM patients present impaired responses to Candida albicans and Paracoccidioides brasiliensis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 778–86 (2012).

65. Cabral-Marques, O. *et al.* Human CD40 ligand deficiency dysregulates the macrophage transcriptome causing functional defects that are improved by exogenous IFN-γ. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 900-912.e7 (2017).

66. Cabral-Marques, O. *et al.* CD40 ligand deficiency causes functional defects of peripheral neutrophils that are improved by exogenous IFN-γ. *J. Allergy Clin. Immunol.* **142**, 1571-1588.e9 (2018).

67. Chen, Y. *et al*. Internalization of CD40 regulates its signal transduction in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 106–117 (2006).

68. Lievens, D., Eijgelaar, W. J., Biessen, E. A. L., Daemen, M. J. A. P. & Lutgens, E. The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* **102**, 206–214 (2009).

69. Lievens, D. *et al*. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood* **116**, 4317–4328 (2010).

70. Li, G. *et al*. CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am. J. Pathol.* **172**, 1141–1152 (2008).

71. Khan, S. Y. *et al*. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood* **108**, 2455–2462 (2006).

72. Rahman, M. *et al*. Platelet-derived CD40L (CD154) mediates neutrophil upregulation of mac-1 and recruitment in septic lung injury. *Ann. Surg.* **250**, 783–789 (2009).

73. Jin, R. *et al*. Soluble CD40 Ligand Stimulates CD40-Dependent Activation of the β2 Integrin Mac-1 and Protein Kinase C Zeda (PKCζ) in Neutrophils: Implications for Neutrophil-Platelet Interactions and Neutrophil Oxidative Burst. *PLoS One* **8**, e64631 (2013).

74. Hyun, Y. & Hong, C. Deep insight into neutrophil trafficking in various organs. *J. Leukoc. Biol.* **102**, 617–629 (2017).

75. Mavroudi, I. & Papadaki, H. A. The Role of CD40 / CD40 Ligand Interactions in Bone Marrow Granulopoiesis. *Sci. World J.* **11**, 2011–2019 (2011).

76. Saeland, S. *et al*. Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34+ hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* **20**, 24–33 (1992).

77. Solanilla, A. *et al*. CD40-ligand stimulates myelopoiesis by regulating flt3-ligand and thrombopoietin production in bone marrow stromal cells. *Blood* **95**, 3758–64. (2000).

78. Mavroudi, I. *et al*. The CD40/CD40 ligand interactions exert pleiotropic effects on bone marrow granulopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 771–783 (2011).

79. Rosales, C. Neutrophil : A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types ? *Front. Physiol.* **9**, 1–17 (2018).

80. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 173–182 (2006).

81. Minns, D., Smith, K. J. & Findlay, E. G. Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents. *Mediators Inflamm.* **2019**, 8968943 (2019).

82. Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J. & Denkers, Y. Cross-Talk in the Innate Immune System: Neutrophils Instruct Recruitment and Activation of Dendritic Cells during Microbial Infection. *J Immunol* **171**, 6052–6058 (2003).

83. Ley, K. *et al*. Neutrophils : New insights and open questions. *Sci. Immunol.* **4579**, 1–14 (2018).

84. Coffelt, S. B., Wellenstein, M. D. & Visser, K. E. De. Neutrophils in cancer : neutral no more. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 431–446 (2016).

85. Bendall, L. J. & Bradstock, K. F. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 355–367 (2014).

86. Liu, F., Wu, H. Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T. & Link, D. C. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* **5**, 491–501 (1996).

87. Lieschke, G. J. *et al*. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* **84**, 1737–1746 (1994).

88. Pillay, J. *et al*. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human

experimental endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 211–220 (2010).

89. Lukášová, E. *et al.* Granulocyte maturation determines ability to release chromatin NETs and loss of DNA damage response; these properties are absent in immature AML granulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 767–779 (2013).

90. Taneja, R., Sharma, A. P., Hallett, M. B., Findlay, G. P. & Morris, M. R. Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock* **30**, 618–622 (2008).

91. Geering, B. & Simon, H. U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ.* **18**, 1457–1469 (2011).

92. Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissières, P. & Pugin, J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* **41**, 820–832 (2013).

93. Pruchniak, M. P., Arazna, M. & Demkow, U. Life of neutrophil : From stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **187**, 68–73 (2013).

94. Eash, K. J. *et al.* CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.* **120**, 2423–2431 (2010).

95. Hong, C. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw* **17**, 298–306 (2017).

96. De Filippo, K. & Rankin, S. M. CXCR4, the master regulator of neutrophil trafficking in homeostasis and disease. *Eur. J. Clin. Invest.* **48**, c12949 (2018).

97. Semerad, C. L. *et al.* G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood. *Immunity* **17**, 413–423 (2002).

98. Semerad, C. L. *et al.* G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* **106**, 3020–3027 (2005).

99. Hyun, K. K., De La Luz Sierra, M., Williams, C. K., Gulino, A. V. & Tosato, G. G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood* **108**, 812–820 (2006).

100. Köhler, A. *et al.* G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood* **117**, 4349–4357 (2011).

101. Petit, I., Ponomaryov, T., Zipori, D. & Tsvee, L. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat. Immunol.* **3**, 687–694 (2002).

102. Voisin, M. B. & Nourshargh, S. Neutrophil trafficking to lymphoid tissues: physiological and pathological implications. *J. Pathol.* **247**, 662–671 (2019).

103. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).

104. Domínguez-Luis, M. J. *et al.* L-selectin expression is regulated by CXCL8-induced reactive oxygen species produced during human neutrophil rolling. *Eur. J. Immunol.* **49**, 386–397 (2019).

105. Sadik, C., Kim, N. & Luster, A. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* **32**, 452–460 (2011).

106. Petri, B. & Sanz, M. J. Neutrophil chemotaxis. *Cell Tissue Res.* **371**, 425–436 (2018).

107. De Oliveira, S., Rosowski, E. E. & Huttenlocher, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 378–391 (2016).

108. Burn, G. L., Foti, A., Marsman, G., Patel, D. F. & Zychlinsky, A. The Neutrophil. *Immunity* **54**, 1377–1391 (2021).

109. Elsbach, P. & Weiss, J. Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils. *Immunol. Lett.* **11**, 159–163 (1985).

110. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80-.).* **303**, 1532–1535 (2004).

111. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 134–147 (2018).

112. Lawrence, S. M., Corriden, R. & Nizet, V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **82**, 1–22 (2018).

113. Faurschou, M. & Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**, 1317–1327 (2003).

114. Hager, M., Cowland, J. B., Borregaard, N. & Ha, M. Neutrophil granules in health and disease. *J. Int. Med.* **268**, 25–34 (2010).

115. Spoor, J., Farajifard, H. & Rezaei, N. Congenital neutropenia and primary immunodeficiency diseases. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **133**, 149–162 (2019).

116. Rezaei, N. *et al.* Neutropenia in patients with primary antibody deficiency disorders. *Iran. J. Allergy. Asthma. Immunol.* **3**, 77–81 (2004).

117. Neth, O. W., Bajaj-Elliott, M., Turner, M. W. & Klein, N. J. Susceptibility to infection in patients with neutropenia: The role of the innate immune system. *Br. J. Haematol.* **129**, 713–722 (2005).

118. Mehta, H. M., Malandra, M. & Corey, S. J. G-CSF and GM-CSF in Neutropenia. *J. Immunol.* **195**, 1341–1349 (2015).

119. Donini, M. *et al.* G-CSF treatment of severe congenital neutropenia reverses neutropenia but does not correct the underlying functional deficiency of the neutrophil in defending against microorganisms. *Blood* **109**, 4716–4723 (2007).

120. Flores-Romo, L. *et al.* CD40 ligation on human cord blood CD34 + hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *J. Exp. Med.* **185**, 341–349 (1997).

121. Canque, B., Camus, S., Yagello, M. & Gluckman, J. C. IL-4 and CD40 ligation affect differently the differentiation, maturation, and function of human CD34 cell-derived CD1a1CD142 and CD1a2CD141 dendritic cell precursors in vitro. *J Leukoc Biol* **64**, 235–244 (1998).

122. Jasinska, A. *et al.* Successful haploidentical PBSCT with subsequent T-cell addbacks in a boy with HyperIgM syndrome presenting as severe congenital neutropenia. *Pediatr. Transplant.* **17**, 1–4 (2012).

123. França, T. T. *et al.* A novel de novo mutation in the CD40 ligand gene in a patient with a mild X-linked hyper-IgM phenotype initially diagnosed as CVID: New aspects of old diseases. *Front. Pediatr.* **6**, 130 (2018).

124. Barnhart, B., Ford, G. S., Bhushan, A., Song, C. & Covey, L. R. A polymorphic CD40 ligand (CD154) molecule mediates CD40-dependent signalling but interferes with the ability of soluble CD40 to functionally block CD154:CD40 interactions. *Immunology* **99**, 54–61 (2000).

125. Rigaud, S. *et al.* Human X-linked variable immunodeficiency caused by a hypomorphic mutation in XIAP in association with a rare polymorphism in CD40LG. *Blood* **118**, 252–261 (2011).

126. Katta, A., Hong, J. & Knutsen, A. P. Hyper immunoglobulin M syndrome in a 15-year-old boy caused by a Gly219Arg missense mutation. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **110**, 391–393 (2013).

127. Aghamohammadi, A. *et al.* Clinical and laboratory findings in Hyper-IgM syndrome with novel CD40L and AICDA mutations. *J. Clin. Immunol.* **29**, 769–776 (2009).

128. Rawat, A. *et al.* Clinical and molecular features of X-linked hyper IgM syndrome – An experience from North India. *Clin. Immunol.* **195**, 59–66 (2018).

129. Cabral-Marques, O. *et al.* First report of the hyper-IgM syndrome registry of the latin american society for immunodeficiencies: Novel mutations, unique infections, and outcomes. *J. Clin. Immunol.* **34**, 146–156 (2014).

130. Macchi, P. *et al.* Characterization of nine novel mutations in the CD40 ligand gene in patients with X-linked hyper IgM syndrome of various ancestry. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 898–906 (1995).

131. Cabral-Marques, O. *et al.* Expanding the clinical and genetic spectrum of human CD40L deficiency: The occurrence of paracoccidioidomycosis and other unusual infections in brazilian patients. *J. Clin. Immunol.* **32**, 212–220 (2012).

132. Bajorath, J., Seyama, K., Nonoyama, S., Ochs, H. D. & Aruffo, A. Classification of mutations in the human CD40 ligand, gp39, that are associated with X-linked hyper IgM syndrome. *Protein Sci.* **5**, 531–534 (1996).

133. Nonoyama, S. *et al.* Mutations of the CD40 ligand gene in 13 Japanese patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Hum. Genet.* **99**, 624–627 (1997).

134. Seyama, K. *et al.* Mutations of the CD40 ligand gene and its effect on CD40 ligand expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Blood* **92**, 2421–2434 (1998).

135. Serra, H. *et al.* A new CD154 mutation. *Allergy* **65**, 1230–1231 (2001).

136. Danielian, S., Oleastro, M., Rivas, M. E., Cantisano, C. & Zelazko, M. Clinical follow-up of 11 Argentinian CD40L-deficient patients with 7 unique mutations including the so-called 'milder' mutants. *J. Clin. Immunol.* **27**, 455–459 (2007).

137. Katz, F. *et al.* Mutation analysis in CD40 ligand deficiency leading to X-linked hypogammaglobulinemia with hyper IgM syndrome. *Hum. Mutat.* **8**, 223–228 (1996).

138. Lin, Q. *et al.* A single strand conformation polymorphism study of CD40 ligand. Efficient mutation analysis and carrier detection for X-linked hyper IgM syndrome. *J. Clin. Invest.* **97**, 196–201 (1996).

139. Heinold, A. *et al.* Pitfalls of 'hyper'-IgM syndrome: A new CD40 ligand mutation in the presence of low IgM levels. A case report and a critical review of the literature. *Infection* **38**, 491–496 (2010).

140. Partida-Sánchez, S. *et al.* Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat. Med.* **7**, 1209–1216 (2001).

141. Kutsuna, H. *et al.* Actin reorganization and morphological changes in human neutrophils stimulated by TNF , GM-CSF , and G-CSF : the role of MAP kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, 55–64 (2004).

142. K, G JCarulli, G. *et al.* Actin Polymerization in Neutrophils from Donors of Peripheral Blood Stem Cells: Divergent Effects of Glycosylated and Nonglycosylated Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Am. J. Hematol.* **81**, 318–323 (2006).

143. Xu, J. *et al.* Mice Deficient for the CD40 Ligand. *Immunity* **1**, 423–431 (1994).

144. Edgar, R., Domrachev, M. & Lash, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* **30**, 207–210 (2002).

145. Barrett, T. *et al.* NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res.* **41**, D991–D995 (2013).

146. Athar, A. *et al.* ArrayExpress update – from bulk to single-cell expression data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D711–D715 (2019).

147. Xie, X. *et al.* Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection. *Nat. Immunol.* **21**, 1119–1133 (2020).

148. Zhou, G. *et al.* NetworkAnalyst 3.0: A visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res.* **47**, W234–W241 (2019).

149. Russo, P. S. T. *et al.* CEMiTool: A Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses. *BMC Bioinformatics* **19**, 56 (2018).

150. Krzywinski, M. *et al.* Circos : an Information Aesthetic for Comparative Genomics. *Genome Res.* **19**, 1639–1645 (2009).

151. Metsalu, T. & Vilo, J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* **43**, W566–W570 (2015).

152. Heberle, H., Meirelles, G. V., Silva, F. R., Telles, G. P. & Minghim, R. InteractiVenn : a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* **16**, 1–7 (2015).

153. Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X. & Thomas, D. PANTHER version 14 : more genomes , a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **47**, 419–426 (2019).

154. Krupa, S. *et al*. The NCI-Nature Pathway Interaction Database: A cell signaling resource. *Nat. Preced.* (2007) doi:10.1038/npre.2007.1311.1.

155. Kuleshov, M. V. *et al*. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W90–W97 (2016).

156. Hennig, C., Happle, C. & Hansen, G. A bad wound may heal, but a bad name can kill - Lessons learned from 'hyper-IgM syndrome'. *J. Allergy Clin. Immunol.* **128**, 1380–1382 (2011).

157. Tang, W. J. *et al*. Clinical, molecular, and T cell subset analyses in a small cohort of Chinese patients with hyper-IgM syndrome type 1. *Hum. Immunol.* **75**, 633–640 (2014).

158. Wang, L. L. *et al*. Clinical features and genetic analysis of 20 Chinese patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *J. Immunol. Res.* **Epub 2014**, (2014).

159. Castagnoli, R., Delmonte, O. M., Calzoni, E. & Notarangelo, L. D. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Primary Immunodeficiency Diseases: Current Status and Future Perspectives. *Front. Pediatr.* **7**, 1–25 (2019).

160. Madkaikar, M. *et al*. X-linked hyper IgM syndrome: Clinical, immunological and molecular features in patients from India. *Blood Cells, Mol. Dis.* **53**, 99–104 (2014).

161. Du, X. *et al*. Clinical, genetic and immunological characteristics of 40 Chinese patients with CD40 ligand deficiency. *Scand. J. Immunol.* **90**, 1–12 (2019).

162. Erdos, M. *et al*. Molecular genetic analysis of Hungarian patients with the hyper-immunoglobulin M syndrome. *Mol. Immunol.* **45**, 278–282 (2008).

163. Azizi, G. & Yazdani, R. Predominantly antibody deficiencies. *Immunol. Genet. J.* **1**, 52–80 (2018).

164. Song, Z. *et al*. CD40 is essential in the upregulation of traf proteins and NF-KappaB-dependent proinflammatory gene expression after arterial injury. *PLoS One* **6**, 1–11 (2011).

165. Xiaowen Liu, Bo Ma, Asrar B. Malik, Haiyang Tang, Tao Yang, Bo Sun, Gang Wang, Richard D. Minshall, Yan Li, Yong Zhao, Richard D. Ye, and J. & Xu. Bidirectional Regulation of Neutrophil Migration by MAP Kinases. *Nat. Immunol.* **13**, 457–464 (2012).

166. Heit, B., Tavener, S., Raharjo, E. & Kubes, P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J. Cell Biol.* **159**, 91–102 (2002).

167. Mori, M. *et al*. Mutation Analysis and Therapeutic Response to Granulocyte Colony-Stimulating Factor in a Case of Hyperimmunoglobulin M Syndrome With Chronic Neutropenia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **22**, 288–289 (2000).

168. Marini, O. *et al*. Mature CD10+ and immature CD10- neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* **129**, 1343–1356 (2017).

169. Silvestre-Roig, C., Fridlender, Z. G., Glogauer, M. & Scapini, P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol.* **40**, 565–583 (2019).

170. Silvestre-Roig, C., Hidalgo, A. & Soehnlein, O. Neutrophil heterogeneity: Implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood* **127**, 2173–2181 (2016).

171. Garley, M. & Jabłońska, E. Heterogeneity Among Neutrophils. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* **66**, 21–30 (2018).

172. Grigoriou, M. *et al*. Transcriptome reprogramming and myeloid skewing in haematopoietic stem and progenitor cells in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **79**, 242–253 (2020).

173. Noz, M. P. *et al*. Reprogramming of bone marrow myeloid progenitor cells in patients with severe coronary artery disease. *Elife* **9**, e60939 (2020).

174. Durrans, A. *et al*. Identification of Reprogrammed Myeloid Cell Transcriptomes in NSCLC. *PLoS One* **7**, 1–22 (2015).

175. Zarebski, A. *et al*. Mutations in Growth Factor Independent-1 Associated with Human Neutropenia Block Murine Granulopoiesis through Colony Stimulating Factor-1. *Immunity* **28**, 370–380 (2008).

176. Hock, H. *et al*. Intrinsic Requirement for Zinc Finger Transcription Factor Gfi-1 in Neutrophil

Differentiation. *Immunity* **18**, 109–120 (2003).

177. Sierra, M. de la L. *et al*. The transcription factor Gfi1 regulates G-CSF signaling and neutrophil development through the Ras activator RasGRP1. *Blood* **115**, 3970–3980 (2010).

178. Yáñez, A., Ng, M. Y., Hassanzadeh-kiabi, N. & Goodridge, H. S. IRF8 acts in lineage-committed rather than oligopotent progenitors to control neutrophil vs monocyte production. *Blood* **125**, 1452–1459 (2015).

179. Kurotaki, D. *et al*. IRF8 inhibits C/EBPα activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. *Nat. Commun.* **5**, 4978 (2014).

180. Porse, B. T. *et al*. Loss of C/EBPα cell cycle control increases myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage. *J Exp Med* **202**, 85–96 (2005).

181. Zhang, L. & Friedman, A. D. SHP2 tyrosine phosphatase stimulates CEBPA gene expression to mediate cytokine-dependent granulopoiesis. *Blood* **118**, 2266–2274 (2011).

182. França, T. T. *et al*. CD40L modulates transcriptional signatures of neutrophils in the bone marrow associated with development and trafficking. *J. Clin. Investig. Insight* **6**, e148652. (2021).