

**RANIERI COELHO SALGADO**

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA  
RESPOSTA A FUNGOS E CARACTERIZAÇÃO DE PACIENTES BRASILEIROS  
COM SUSCETIBILIDADE A MICOSES**

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

2022

**RANIERI COELHO SALGADO**

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA  
RESPOSTA A FUNGOS E CARACTERIZAÇÃO DE PACIENTES BRASILEIROS  
COM SUSCETIBILIDADE A MICOSES**

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.

Área de Concentração: Imunologia.

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

Versão Original.

SÃO PAULO

2022



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato: Ranieri Coelho Salgado  
Título da Dissertação: **INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA A FUNGOS E CARACTERIZAÇÃO DE PACIENTES BRASILEIROS COM SUSCETIBILIDADE A MICOSES**

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

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

( ) **Aprovado**      ( ) **Reprovado**

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

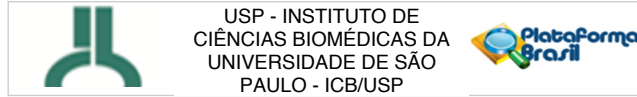
Examinador (a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

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

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



# APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DE PACIENTES BRASILEIROS COM IMUNODEFICIÊNCIAS PRIMÁRIAS ACOMETIDOS POR MICOSES

**Pesquisador:** RANIERI COELHO SALGADO

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 28130119.0.0000.5467

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.984.395

#### Apresentação do Projeto:

O projeto esta bem apresentado.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo do estudo é a investigação da relação entre susceptibilidade a micoses sistêmicas e erros inatos da imunidade para melhorar a compreensão e caracterização de imunodeficiências primárias, bem como do seu diagnóstico, prognóstico e estratégias terapêuticas.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Esta apresentada de forma coreta.A pesquisa nao apresenta riscos a nao ser os relativos a coleta de sangue (mínimos). Os beneficios incluem suporte diagnostico e eventualmente informacoes uteis para abordagem terapeutica

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é relevante na area de atuação

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estao OK

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Agora os documentos estao ok

**Endereço:** Av. Profª Lineu Prestes, 2415  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-7733 **E-mail:** cep@icb.usp.br

Página 01 de 03

|   |                           |                     |                        |        |
|---|---------------------------|---------------------|------------------------|--------|
| Biológico / Biorepositório / Biobanco     | Material_Biologico.pdf    | 10/12/2019 06:20:55 | RANIERI COELHO SALGADO | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_RANIERI.pdf       | 29/10/2019 20:07:58 | RANIERI COELHO SALGADO | Aceito |
| Brochura Pesquisa                         | Projeto_RANIERICOELHO.pdf | 29/10/2019 14:28:17 | RANIERI COELHO SALGADO | Aceito |
| Folha de Rosto                            | PlatBrasilRanieri.pdf     | 29/10/2019 14:26:42 | RANIERI COELHO SALGADO | Aceito |

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Abril de 2020

Assinado por:  
Camila Squarzoni Dale  
(Coordenador(a))

À minha família,  
que tanto me ensinou  
e que tanto amo...

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo, mas também dedicando este trabalho à minha família, pois sem eles eu não teria sido capaz de chegar até aqui. Em primeiro aos meus pais, Edinaldo e Efigênia, por todo amor, carinho, ensinamentos, incentivos e apoio incondicional em diversos momentos da minha vida, além de toda o exemplo de resiliência e renúncias em prol dos meus estudos e também dos da Erica. Também à minha irmã Erica que tanto amo, um verdadeiro exemplo de força e companheirismo, alguém em quem eu me espelho e que admiro, além do meu cunhado, Dustin, por toda força e amizade. I would like to say thank you also to the love of my life... to the one who was, even far away, present in every second of my life during this period. Michael Goodwin, “you’re as beautiful as endless, you’re the universe I’m helpless in, na astronomer at my best...”, thank you for all your love and support, without you this wouldn’t be possible... I love you.

Agradeço ainda às minhas amigas do apartamento 96B e também verdadeiros presentes que São Paulo me trouxe, Isis e Sarah. Muito obrigado por todas as palavras de acolhimento, todas as risadas, todas as lágrimas e diversos outros momentos aqui compartilhados; graças a presença de vocês tudo se tornou mais leve durante esses pouco mais de 2 anos.

Muito obrigado também aos meus tutores:

Professor Dr. Antônio Condino-Neto, meu orientador durante esta trajetória, obrigado por todos ensinamentos, conselhos, generosidade de ter acreditado em mim e, assim, ter me concedido essa oportunidade de crescer pessoalmente e profissionalmente.

Dr. Otávio Cabral-Marques, meu coorientador, muito obrigado pelos ensinamentos, apoio, incentivo e tantos momentos alegres compartilhados, sairei daqui com uma bagagem ainda mais valiosa graças a oportunidade que me foi concedida.

Gostaria de agradecer, ainda, a diferentes amigos que colaboraram muito também com a minha trajetória em São Paulo, assim como no presente trabalho, sendo também presentes que pretendo levar para o resto da vida. Sou muito grato por ter encontrado vocês e por vocês fazerem parte da minha vida – Carol, Luís, Lilian, Tábata e Dennyson.

Muito obrigado também aos meus colegas e amigos do laboratório de Imunologia Humana, por todo parceria, ensino, discussões científicas, celebrações, conquistas e risadas... graças a

vocês eu pude aprender muito em um ambiente tão acolhedor, serei eternamente grato e espero tê-los em minha vida – Christina Arslanian, Lucila Barreiros, Silvana, Renata, Letícia, Raíssa, Tiago e Edson.

Também não posso deixar de agradecer aos colegas do Laboratório de Imunologia Integrativa, com quem pude aprender e dividir momentos únicos... Lena, Paula, Igor, Desiree, Gabriela, Ivana e demais colegas.

Também gostaria de agradecer alguns amigos que estão e estiveram presentes em algum ponto de toda esta trajetória e, que de alguma forma, contribuíram na construção dessa história. Muito obrigado às minha amigas Thalia Silva e Rosely Ferreira, que mesmo após tanto tempo ainda encontram-se presentes em minha vida. Ao melhor squad -- Paulo Roberto, Andrei Caldas e João França, por todo momento de descontração e amizade. Aos meus amigos João Vinícius, Igor Santiago e Pedro Lanza pela amizade e pelos momentos divertidos que compartilhamos. Obrigado também ao Coutinho por todo apoio e amizade desde que o conheci e por estar presente durante esse período por vezes estressante. Obrigado também à Tiemi Akashi pelas experiências trocadas, por todos os momentos extraordinários que compartilhamos e por estar presente na maioria dos momentos felizes e tristes que aqui vivemos.

Às médicas Dra. Janaira Fernandes, Dra. Márcia Galdino e Dra. Fernanda Mariz, bem como às suas equipes pela imensa colaboração e prontidão na organização da coleta e envio de materiais sem os quais este trabalho não ocorreria.

Obrigado aos pacientes e aos seus pais/familiares responsáveis, por aceitarem a participar do presente estudo e compreenderem a importância da pesquisa.

Aos integrantes da banca de qualificação Prof. Dr. Alexandre Barbuto, Dra. Ekaterini Goudouris e Dr. Vinícius Nunes pelas críticas e sugestões durante o Exame de Qualificação, que somaram ainda mais ao presente trabalho.

Aos amigos e colegas do departamento, especialmente à Eni por todo o imenso carinho, atenção, suporte e apoio.

Aos professores do departamento, em especial ao Prof. Dr. Niels Olsen, por todo conhecimento, conselhos e palavras de incentivo dado.

Aos colegas do Departamento de Imunologia do ICB IV.

Aos professores que em diferentes momentos da minha vida contribuíram para a minha formação acadêmica.

### **Agradecimento especial**

Agradeço especialmente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado e auxílio concedido (processo nº 130382/2020-5), sem o qual não seria possível a realização deste estudo.

“Sejamos incontroláveis então... e que a gente não desista porque ninguém acredita.”  
Machado de Assis.

“Deus te livre, leitor, de uma idéia fixa; antes um argueiro, antes uma trave no olho.”  
Memórias Póstumas de Brás Cubas, Machado de Assis.

## RESUMO

SALGADO, R. C. **Investigação dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta a fungos e caracterização de pacientes brasileiros com suscetibilidade a micoses.** 2022. 100 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

As micoses sistêmicas e micoses oportunistas que cursam de forma disseminada são uma preocupação mundial devido às suas elevadas taxas de morbimortalidade. Dentre os componentes associados à resposta imunológica frente a infecções fúngicas, destacam-se na imunidade inata os receptores de padrão molecular, tais quais receptores do tipo Toll e receptores do tipo lectina C, as células do sistema fagocítico monócitos/macrófagos e os neutrófilos e seus mecanismos efetores, como a produção de citocinas pró-inflamatórias, o *burst* oxidativo e a geração de armadilhas extracelulares de neutrófilos. Tal conhecimento é ratificado pelo estudo de pacientes com Erros Inatos da Imunidade (EII), conjunto de doenças causadas por alterações genéticas em componentes do sistema imune que tornam indivíduos afetados propensos a infecções graves e recorrentes causadas por diversas classes de microrganismos, dentre os quais os fungos. Complementarmente a abordagem de genômica amplamente utilizada em estudos relacionados aos EII, técnicas modernas tais quais sequenciamento de transcriptoma e análises de *single-cell* permitem analisar não somente as alterações em nível celular, mas também o impacto sistêmico destas. Assim, o presente trabalho teve duas linhas principais de estudo: a investigação dos mecanismos imunológicos na resposta a fungos por meio de uma análise integrativa realizada com dados públicos e a caracterização de pacientes brasileiros com suscetibilidade a micoses. Para isso, com o auxílio de ferramentas de bioinformática, oito diferentes dados públicos de transcriptoma humano infectados com *Candida spp.* foram avaliados. Identificamos uma rede de interação conectando as vias de receptores do tipo Toll e cascata de sinalização por interferon tipo I/II moduladas em resposta a *Candida spp.*, reforçando estudos anteriores e demonstrando uma interessante sobreposição com a resposta imune antiviral. Em relação ao estudo com enfoque nos EII, realizamos a triagem de pacientes a partir da avaliação do Eixo IL-12/IFN- $\gamma$  e do *Burst* Oxidativo, além da caracterização genética por *Whole Exome Sequencing* e Sanger. Foram incluídos no estudo oito pacientes, dos quais quatro apresentaram alterações nos exames de triagem; entretanto considerando histórico clínico e familiar, todos foram encaminhados para investigação genética. De acordo com análises de predição *in silico*, encontramos variantes provavelmente patogênicas em três destes pacientes, sendo que para a paciente P3 estas apresentaram-se como de significado incerto. Identificamos uma família (de P1 e P2) afetada pela variante patogênica conhecida como Santiago de Cuba no gene *G6PD* cujos indivíduos acometidos apresentaram baixa produção de ROS e suscetibilidade à histoplasmoze disseminada, variante ainda não identificada em indivíduos brasileiros e associação até o momento não descrita na literatura. O estudo da relação entre suscetibilidade a micoses sistêmicas e EII torna-se fundamental na busca da compreensão e caracterização destas doenças, auxiliando no seu diagnóstico, nas estratégias terapêuticas aplicadas e, conseqüentemente, na qualidade de vida de pacientes afetados.

**Palavras-chave:** infecções fúngicas; micoses sistêmicas; erros inatos da imunidade; análise integrativa; Transcriptoma.



## ABSTRACT

SALGADO, R. C. **Investigation of the immunological mechanisms involved in the response to fungi and characterization of Brazilian patients with susceptibility to mycoses.** 2022. 100 f. dissertation (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Systemic mycoses and opportunistic mycoses that occur in a disseminated way are a worldwide concern due to their high rates of morbidity and mortality. Among the components associated with the immune response to fungal infections, are highlighted in innate immunity the molecular pattern receptors, such as Toll-like receptors and C-type lectin receptors, cells of the phagocytic system, monocytes/macrophages and neutrophils as well as their effector mechanisms, including the production of pro-inflammatory cytokines, oxidative burst and also the generation of extracellular neutrophil traps. Such knowledge is confirmed by the study of patients with Inborn Errors of Immunity (IEI), diseases caused by genetic alterations in immune system's components that make affected individuals susceptible to severe and recurrent infections caused by several classes of microorganisms, among which the fungi. In addition to the genomics approach widely used in studies related to IEI, modern techniques such as transcriptome sequencing and single-cell analysis allow analyzing not only alterations at the cellular level, but also their systemic impact. Thus, the present study had two main research lines: investigation of immunological mechanisms in the response to fungi through an integrative analysis performed with public datasets and the characterization of Brazilian patients with susceptibility to mycoses. To this end, approaching by bioinformatics tools, eight different public data of human transcriptome infected with *Candida spp.* were evaluated. We identified an interaction network connecting the Toll-like receptor pathways and the type I/II interferon signaling cascade modulated in response to *Candida spp.*, reinforcing previous studies and demonstrating an interesting overlap with the antiviral immune response. Regarding the study focusing on IEI, we performed a screening of patients based on the evaluation of IL-12/IFN- $\gamma$  axis and Oxidative Burst, in addition to the genetic characterization by Whole Exome Sequencing and Sanger. Eight patients were included in the study, four of which had alterations in the screening tests; however, considering clinical and family history, all of them were referred for genetic investigation. According to *in silico* prediction analyses, we found likely pathogenic variants in three of these patients, and for patient P3 they were of uncertain significance. We identified a family (of patients P1 and P2) affected by the pathogenic variant known as Santiago de Cuba in the *G6PD* gene, whose affected individuals had low ROS production and susceptibility to disseminated histoplasmosis, a variant not yet identified in Brazilian individuals and an association not yet described in the literature. The study of the relationship between susceptibility to systemic mycoses and IEI becomes fundamental in the search for understanding and characterization of these diseases, helping in their diagnosis, in the therapeutic strategies applied and, consequently, in the quality of life of patients.

**Palavras-chave:** fungal infections; systemic mycoses; inborn errors of immunity; integrative analysis; transcriptome.

## LISTA DE FIGURAS

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| Figura 1. Respostas da imunidade inata e adaptativa frente a infecção fúngica.....   | 10                                   |
| Figura 2. Distribuição geográfica de infecções fúngicas endêmicas na América Latina. ....  | 18                                   |
| Figura 3. Indução das vias de sinalização de TLR e IFN em resposta a <i>C. albicans</i> . ....   | 28                                   |
| Figura 4. <i>C. albicans</i> ativa genes comuns associados a TLR e IFN em leucócitos do sangue periférico.....   | 30                                   |
| Figura 5. <i>C. albicans</i> ativa as vias comuns de sinalização de TLR e IFN em diferentes populações de leucócitos.....  | 32                                   |
| Figura 6. Rede de interação evidencia as interações entre os DEGs associados às vias de TLR e IFN, além de demais vias de sinalização classicamente associadas com as respostas imunes antifúngicas..... | 33                                   |
| Figura 7. Relação entre moléculas associadas às cascatas de sinalização de TLR e IFN. ....   | 34                                   |
| Figura 8. Análise de correlação e estratificação entre condição de infecção por <i>C. albicans</i> e controle por genes de TLR e IFN.....  | 35                                   |
| Figura 9. DEGs em comum associadas a TLR e IFN e respectivas vias enriquecidas após estímulo com outras espécies de <i>Candida</i> . ....  | 37                                   |
| Figura 10. Padrão de expressão e sobreposição entre DEGs induzidas por <i>C. albicans</i> e fungo multiresistente <i>C. auris</i> .....  | 39                                   |
| Figura 11. Interactoma das vias de sinalização de enriquecimento de DEGs envolvidas na resposta imune anti- <i>Candida</i> e sua associação com erros inatos de imunidade.....                           | 40                                   |
| Figura 12. DEGs associados a vias de sinalização TLR e IFN presentes entre datasets de <i>microarray</i> , <i>RNAseq</i> e <i>scRNAseq</i> .....   | 42                                   |
| Figura 13. Fluxograma de experimentação e inclusão de pacientes na coorte de estudo....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| Figura 14. Esquema dos estímulos utilizados para teste do Eixo IL-12/IFN- $\gamma$ . <b>Erro! Indicador não definido.</b>  |                                      |
| Figura 15. Dosagem da concentração de citocinas em sobrenadante de cultura do Paciente P3. ....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| Figura 16. Dosagem da concentração de citocinas em sobrenadante de cultura do Paciente P4. ....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |

Figura 17. Representação do heredograma familiar dos pacientes P1 e P2 (II. 1 e II.2)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 18. Ensaio de DHR realizado para indivíduos I. 2 (mãe), II.1 (Paciente P1) e II. 3 (Paciente P2)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 19. Cromatograma representativo do sequenciamento do exon 11 do gene *G6PD*. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 20. Avaliação da função microbicida de neutrófilos em comparativo entre controle saudável e P2. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 21. Análise de estrutura 3D da proteína normal e da proteína mutante p.G447R G6PD. .... **Erro! Indicador não definido.**

## LISTA DE TABELAS

|   |              |
|---|--------------|
| Tabela 1. 10 sinais de alerta para EII em crianças. ....                              | 16           |
| Tabela 2. Lista de <i>datasets</i> selecionados para a análise integrativa.....       | 23           |
| Tabela 3. Pacientes incluídos na coorte do estudo e suas respectivas informações..... | <b>Erro!</b> |

**Indicador não definido.**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|              |   |
|--------------|---|
| CLRs         | receptores do tipo Lectina-C                |
| DCs          | células dendríticas                         |
| DEGs         | genes diferencialmente expressos            |
| EII          | erros inatos da imunidade                   |
| G6PD         | glicose-6-fosfato                           |
| Ig           | imunoglobulina                              |
| IL           | interleucina                                |
| MHC          | complexo principal de histocompatibilidade  |
| NETs         | armadilhas extracelulares de neutrófilos    |
| NLRs         | receptores do tipo NOD                      |
| PAMPs        | padrões moleculares associados a patógenos  |
| PBMCs        | células mononucleadas do sangue periférico  |
| PBS          | solução salina tamponada com fosfato        |
| PRRs         | receptores de reconhecimento padrão         |
| RNAseq       | sequenciamento do RNA                       |
| ROS          | espécies reativas do oxigênio               |
| scRNAseq     | sequenciamento de RNA de células únicas     |
| TCLE         | termo de consentimento livre e esclarecido  |
| TCR          | receptor de células T                       |
| TGF- $\beta$ | fator de crescimento transformador- $\beta$ |
| TLRs         | receptores do tipo Toll                     |
| TNF          | fator de necrose tumoral                    |
| UFC          | unidade formadora de colônia                |
| WBCs         | células de sangue total                     |
| WES          | sequenciamento completo do exoma            |

## SUMÁRIO

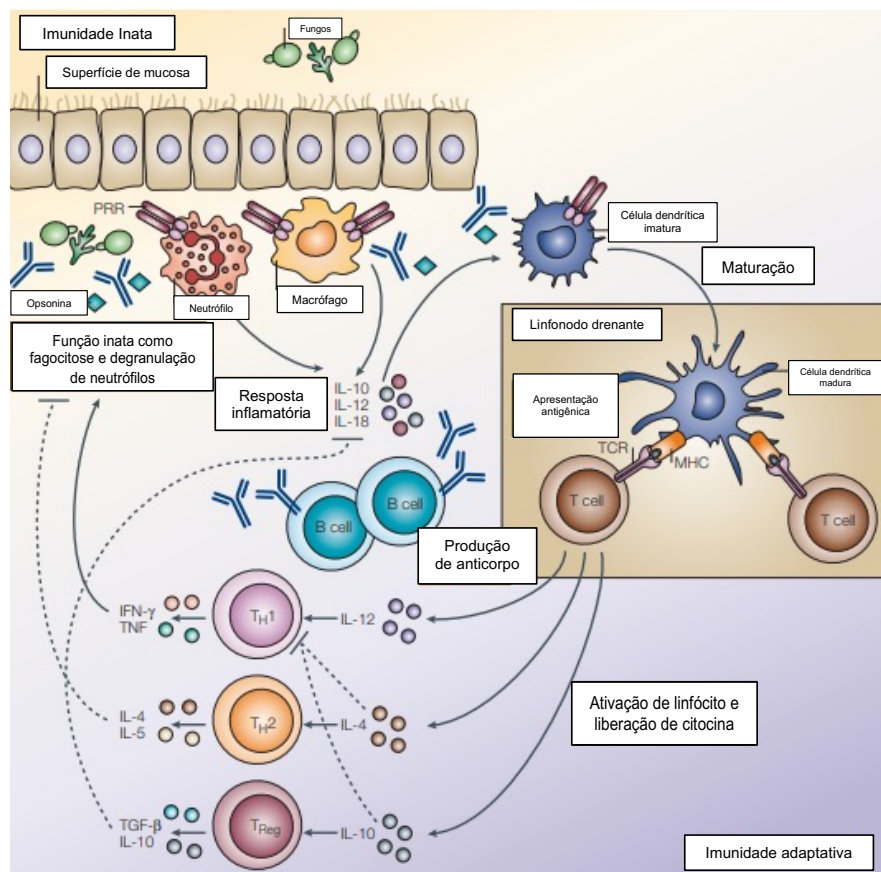
|  |  |    |
|--|--|----|
| 1  | INTRODUÇÃO .....   | 10 |
| 1.1  | Panorama da resposta imune a fungos.....   | 10 |
| 1.1.1  | Imunidade inata .....  | 11 |
| 1.1.2  | Imunidade adaptativa .....   | 13 |
| 1.2  | Estudo e caracterização de Erros Inatos da Imunidade .....   | 15 |
| 1.3  | Micoses sistêmicas e Erros Inatos da Imunidade .....   | 17 |
| CAPÍTULO 1 – REDE DE INTERAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE INTERFERON E DO RECEPTOR DO TIPO TOLL NA RESPOSTA IMUNE ANTI-CANDIDA ..... |  | 21 |
| 2  | OBJETIVO .....   | 22 |
| 2.1  | Objetivo geral .....   | 22 |
| 2.2  | Objetivos específicos .....  | 22 |
| 3  | MÉTODOS.....   | 23 |
| 3.1  | Seleção de dados de sequenciamento públicos.....   | 23 |
| 3.2  | Análise de expressão diferencial .....   | 23 |
| 3.3  | Análises de módulos de co-expressão de genes .....   | 24 |
| 3.4  | Análise de enriquecimento e visualização de dados de transcriptoma humano .....  | 24 |
| 3.5  | Análises de correlação .....   | 25 |
| 3.6  | Redes de interação proteína-proteína .....   | 25 |
| 3.7  | Análise fatorial de vários estudos .....   | 25 |
| 3.8  | Análise de interferoma.....  | 26 |
| 4  | RESULTADOS .....   | 27 |
| 4.1  | Resposta imune a <i>C. albicans</i> é marcada por vias de TLR e IFN em diferentes tipos celulares .....  | 27 |
| 4.2  | Genes associados a sinalização por TLR e IFN em leucócitos do sangue periférico são ativados por <i>C. albicans</i> .....                                    | 29 |
| 4.3  | <i>C. albicans</i> ativa sinalização de TLR e IFN em diferentes camadas do sistema imune .....   | 31 |
| 4.4  | Infecção por <i>C. albicans</i> aumenta o grau de correlação entre os genes associados a vias de TLR e IFN .....   | 33 |
| 4.5  | Interação entre as vias de sinalização de TLR e IFN é conservada em resposta a espécies de <i>Candida</i> não-albicans .....                                 | 36 |
| 4.6  | Erros inatos de imunidade corroboram a interação entre as cascatas de sinalização de TLR e IFN.....  | 39 |
| 4.7  | DEGs associados a vias de sinalização TLR e IFN presentes entre <i>datasets</i> de <i>microarray</i> , <i>RNAseq</i> e sequenciamento de células únicas..... | 41 |
| CAPÍTULO 2 – INVESTIGAÇÃO DE PACIENTES COM SUSCETIBILIDADE A INFECÇÕES FÚNGICAS SISTÊMICAS .....                                     |  | 44 |

|       |  |                                      |
|-------|--|--------------------------------------|
| 5     | OBJETIVOS.....   | 45                                   |
| 5.1   | Objetivo geral .....   | 45                                   |
| 5.2   | Objetivos específicos.....   | 45                                   |
| 6     | MATERIAIS E MÉTODOS .....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 6.1   | Casuística.....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 6.2   | Avaliação do eixo IL-12/IFN- $\gamma$ .....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 6.3   | Avaliação do <i>Burst</i> Oxidativo através da produção de ROS. <b>Erro! Indicador não definido.</b> |                                      |
| 6.4   | Obtenção de neutrófilos de sangue periférico .....   | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 6.5   | Avaliação da atividade microbicida de neutrófilos .....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 6.6   | Reação da cadeia de polimerase (PCR).....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 6.7   | Sequenciamento Completo do Exoma e validação por Sanger .....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 7     | RESULTADOS .....   | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 7.1   | Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo.....                    | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 7.2   | Caso de Deficiência na Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.....  |                                      |
| 7.2.1 | Histórico familiar e clínico.....  |                                      |
| 7.2.2 | Avaliação da produção espécies reativas de oxigênio .....  |                                      |
| 7.2.3 | Caracterização genética da variante <i>G6PD</i> c.1339G>A .....                                      |                                      |
| 7.2.4 | Ensaio de atividade microbicida de neutrófilos .....   |                                      |
| 7.2.5 | Análise in silico relacionada à proteína G6PD p.G447R mutante .....                                  |                                      |
| 8     | DISCUSSÃO.....   |                                      |
| 9     | CONCLUSÕES FINAIS .....  |                                      |
| 10    | REFERÊNCIAS .....  | 46                                   |
|       | ANEXOS .....   | 53                                   |
|       | ANEXO A - Genes descritos associados a suscetibilidade a candidíase.....                             | 53                                   |
|       | ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (maiores de 18 anos) .....                      |                                      |
|       | ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (menores de 18 anos).....                       |                                      |
|       | ANEXO D – Resultados de exames complementares Paciente P3 .....                                      |                                      |
|       | ANEXO E – Resultados de exames complementares Paciente P5.....                                       |                                      |
|       | ANEXO F – Resultados de exames complementares Paciente P6.....                                       |                                      |
|       | ANEXO G – Resultados de exames complementares Paciente P7 .....                                      |                                      |
|       | ANEXO H – Resultados de exames complementares Paciente P8 .....                                      |                                      |
|       | ANEXO I – Publicações e participação em artigos científicos .....                                    | 57                                   |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Panorama da resposta imune a fungos

Os fungos compreendem microrganismos eucarióticos uni ou multicelulares agrupados no reino *Fungi*, sendo que considerável parte desses microrganismos apresentam interação comensal com o hospedeiro humano e, nesse sentido, a resposta imunológica é responsável por desenvolver um ambiente tolerante entre o organismo e os fungos sítio-residentes<sup>1</sup>. Entretanto, quando em contato com fungos patogênicos ou quando a resposta imunológica do hospedeiro se torna ineficaz, tal qual ocorre em indivíduos imunocomprometidos, os fungos podem disseminar-se em tecidos e órgãos distintos<sup>2</sup>. A figura abaixo resume os mecanismos associados à resposta imune formada, mecanismos estes que serão abordados nas sessões seguintes (Figura 1).



**Figura 1. Respostas da imunidade inata e adaptativa frente a infecção fúngica.** A resposta antifúngica do hospedeiro envolve diversos mecanismos divididos didaticamente em dois estágios, mas que atuam em conjunto – a imunidade inata, que envolve barreiras físicas, químicas e biológicas, além de células atuantes e moléculas solúveis; e a imunidade adaptativa, induzida especificamente durante a infecção, em que atuam linfócitos e as moléculas solúveis que estes produzem.  $IFN-\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL, interleucina; TCR, receptor de células T; TGF- $\beta$ , fator de crescimento transformador- $\beta$ ; TNF, fator de necrose tumoral<sup>3</sup>.



### 1.1.1 Imunidade inata

As barreiras físicas, representadas pela pele e superfícies de mucosa, como trato respiratório, gastrointestinal e o genito-urinário, são responsáveis pela notória separação dos tecidos internos do organismo com o ambiente externo, onde encontram-se diversos microrganismos, inclusive os fungos. Quando estas barreiras são rompidas durante lesões ou quando microrganismos adentram utilizando distintas vias, tal qual a inalatória, pode-se iniciar processo de infecção. Neste momento, o organismo possui um aparato celular e de substâncias antimicrobianas que darão início à resposta antifúngica<sup>3</sup>.

Para que esta resposta imunológica inicie, é necessário que haja o reconhecimento destes microrganismos. Assim, os patógenos serão reconhecidos por intermédio de Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs, do inglês *Pattern recognition receptors*) presentes em variadas células, tais quais células dendríticas (DCs, do inglês *Dendritic Cells*), monócitos, macrófagos e neutrófilos<sup>1</sup>. Especificamente, dentro dos distintos grupos de PRRs, podem ser citados os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like Receptors*): TLR-2, TLR-4 e TLR-9; receptores do tipo Lectina-C (CLRs, do inglês *C-type Lectin Receptors*): dectina-1 e 2, MINCLE, CD206, CR3, além de DC-SIGN; e, em relação aos receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês *NOD-like Receptors*), é válido de nota principalmente o inflamassoma NLRP3<sup>4</sup>. Estes PRRs são responsáveis por identificar os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*) fúngicos, dando assim início à resposta inata. Dentre os PAMPs mais comuns, podem ser citados os complexos presentes na parede celular, tais quais fosfolipomananas,  $\alpha$ - e  $\beta$ -glucanas, manoproteínas e possivelmente quitina<sup>5,6</sup>.

Sucedem-se após o reconhecimento dos PAMPs acima citados, a deflagração de vias e cascatas de sinalização subsequentes. Para isso, ocorre o envolvimento de enzimas quinases, moléculas intermediárias e fatores de transcrição, tais quais IRAK (do inglês *Interleukin receptor-associated kinase*), MAPK (do inglês *Mitogen-activated protein kinase*), CARD9 (do inglês *caspase activation and recruitment domain-containing 9*), MyD88 (do inglês *Myeloid differentiation primary response 88*), TRAFs (do inglês *TNF receptor-associated factors*), TRIFs (do inglês *TIR-domain-containing-adaptor-inducing interferon  $\beta$* ), NF- $\kappa$ B (do inglês *nuclear factor- $\kappa$ B*) e IRF (do inglês *interferon regulatory factor*)<sup>3,5</sup>. Estas e outras vias desencadeiam respostas sítio-específicas e sistêmicas, que estão relacionadas com produção de Interferons (IFNs) do tipo I e II, polarização de linfócitos para perfis T auxiliares (Th, do inglês *T helper*) Th1 e Th17, produção de citocinas pró-inflamatórias, tais quais TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , ativação celular e indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês

*reactive oxygen species*). Além de, em casos específicos, indução de IL-10 e TGF- $\beta$ , bem como células T reguladoras<sup>5</sup>.

Seguida à ativação celular, células como os fagócitos (macrófagos e neutrófilos) assumem importância na morte e inibição do crescimento fúngico. Essas células realizam englobamento de partículas fúngicas opsonizadas por proteínas solúveis ou reconhecidas por receptores específicos, dentre os quais Dectina-1, Mincle e DC-SIGN<sup>7</sup>. Tais mecanismos microbicidas envolvem principalmente a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, processo este realizado pelos complexos enzimáticos *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oxidase e *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Tal processo, denominado de *burst* oxidativo, induz a morte dos patógenos fúngicos pela ação das espécies reativas através de alterações nas proteínas, quebras nos ácidos nucleicos e peroxidações lipídicas<sup>3</sup>.

Os macrófagos, monócitos diferenciados nos tecidos periféricos, podem apresentar fenótipos funcionais distintos, classicamente M1 e M2<sup>1</sup>. O perfil M1 é pró-inflamatório, cujo gatilho de diferenciação é a citocina IFN- $\gamma$ . Macrófagos M1 são importantes produtores da citocina IL-12, que será melhor discutida adiante, e relacionam-se com elevada atividade fagocítica e indução de ROS. Por outro lado, a polarização para M2 está relacionada a um microambiente com prevalência de citocinas como TGF- $\beta$ , IL-4 e/ou IL-13<sup>3</sup>; macrófagos com este perfil e suas respectivas citocinas auxiliam em diversos processos, tais quais angiogênese, remodelação e reparo tecidual, além da imunorregulação<sup>8</sup>. O balanço entre respostas M1/M2 é relevante, uma vez que estudos demonstram que a prevalência de resposta associada ao perfil M1 associa-se a uma depuração mais eficiente de patógenos fúngicos, como *Cryptococcus neoformans*<sup>9</sup>. Entretanto, é válido notar que apesar desta simplificação, a plasticidade entre os distintos perfis de macrófagos é ainda mais complexa, uma vez que estudos apontam que os estados funcionais dos macrófagos mudam continuamente<sup>10</sup>.

Em relação aos neutrófilos, enquadrados no grupo de leucócitos polimorfonucleares, além da atividade fungicida por intermédio de ROS, apresentam outro importante mecanismo – as denominadas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *Neutrophil extracellular traps*). Sabe-se que as NETs são complexos formados por cromatinas condensadas e componentes derivados dos grânulos e citoplasma dos neutrófilos, envolvendo assim peptídeos antimicrobianos e enzimas proteolíticas e nucleolíticas<sup>11</sup>. As NETs promovem a lise da parede celular e de membranas, inibição do crescimento, restrição de suprimentos e bloqueio da disseminação dos patógenos fúngicos<sup>12</sup>. Além disso, como importante mecanismo

de contenção para microrganismos extracelulares, as NETs tornam-se críticas para a morte de fungos principalmente quando em sua forma de hifas, uma vez que durante fase leveduriforme tais partículas são facilmente fagocitadas<sup>13</sup>.

Para além dos fagócitos, outro importante componente da imunidade inata é a célula Natural Killer (NK), notável célula de origem linfóide presente no grupo de células denominado células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*)<sup>1</sup>. Os recursos de citotoxicidade desencadeados pelas células NK ocorrem principalmente sob células do hospedeiro infectadas com patógenos e também células próprias transformadas, impedindo a proliferação e disseminação destes. Dentre os mecanismos, podem ser destacados toxicidade por meio da liberação de grânulos, tais quais granzima B e perforina, principalmente mediante engajamento do receptor celular CD16 em opsoninas, e a indução de morte via interação Fas com Fas ligante (FasL)<sup>14</sup>. Ademais, as células NK são relevantes produtoras de IFN- $\gamma$ , citocina essencial na ativação de fagócitos e formação do complexo NADPH-oxidase<sup>15</sup>. Outro recente mecanismo descoberto é a capacidade, *in vitro*, de fagocitose das formas leveduriformes de *Candida albicans*<sup>16</sup>.

Além das células abordadas anteriormente, as DCs também desempenham função essencial na imunidade aos fungos. Embora disponham de baixa atividade microbicida, estas células possuem diversos PRRs que possibilitam reconhecimento dos PAMPs fúngicos, além de ativação celular com liberação de citocinas pró-inflamatórias, endocitose dos patógenos com posterior processamento dos antígenos e, por fim, apresentação aos linfócitos T; ou seja, apesar de classicamente enquadradas dentro da imunidade inata, desempenham importante papel na orquestração da imunidade adaptativa a partir da apresentação e modulação da resposta ao antígeno<sup>1,3</sup>.

Diversos estudos visam maior compreensão da participação das DCs na resposta a patógenos fúngicos. Recentemente, Ramirez-Ortiz e colaboradores<sup>17</sup> descreveram que o subtipo plasmocitoide de DCs (pDCs, do inglês *plasmacytoid dendritic cells*) possui ação inibitória à hifas do fungo *Aspergillus fumigatus*, destacando a importância dessas células na resposta imune.

### **1.1.2 Imunidade adaptativa**

Parte significativa da resposta associada à imunidade adaptativa é desencadeada pelos linfócitos T CD4+, células que são ativadas via engajamento do receptor de célula T (TCR, do inglês *T cell receptor*) ao MHC II, bem como dos sinais de moléculas coestimulatórias,

presentes nas células apresentadoras de antígeno – macrófagos, células dendríticas e linfócitos B<sup>1</sup>. Este grupo celular é responsável por modular a resposta imunológica a partir da secreção de citocinas, o que varia de acordo com o seu perfil de ativação. No contexto de imunidade a patógenos fúngicos, os principais perfis associados com resposta protetora são os perfis de células Th1 e Th17, que produzem e liberam citocinas pró-inflamatórias e que ativam as respostas imunes celular e humoral – ativação e recrutamento de células da imunidade inata, como os fagócitos, e indução da troca de classe para anticorpos mais específicos, respectivamente<sup>3</sup>. Dentre as citocinas, podem ser citadas IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2 e TNF- $\alpha$  relacionadas ao perfil Th1 e IL-17, IL-21 e IL-22 para perfil Th17 – além disso, importante citar que IL-17 e IL-21 potencializam a produção de peptídeos antimicrobianos pelo tecido infectado<sup>18</sup>.

Há, ainda, o perfil Th2 cuja resposta imunológica é classicamente associada com uma piora do quadro infeccioso, uma vez que além de induzir ativação de macrófagos M2, suas citocinas de assinatura IL-4, IL-5 e IL-13 são importantes na manutenção deste perfil e inibição do perfil Th1. No entanto, alguns estudos indicam papel da citocina IL-4 no desenvolvimento de resposta à patógenos fúngicos, tais quais *C. albicans* e *C. neoformans*, assim como de macrófagos M2 auxiliando na resposta protetora à fungos que acometem o sistema respiratório<sup>1,19–21</sup>.

Ademais, outros perfis celulares de T CD4<sup>+</sup> como as Th9, Th22 e Tregs (células T reguladoras) também participam da resposta contra fungos. A respeito da Th9, estudos recentes indicam que esta possui importante papel na pele, além da sugestão de que podem estar envolvidas na resposta a *C. albicans*, evidência ratificada pela existência de células de memória Th9 específicas para tal patógeno<sup>22</sup>. Relacionada a Th22, trata-se de uma célula que produz principalmente IL-22, citocina envolvida na proteção a fungos nas mucosas, como em casos de candidíase<sup>23</sup>. As Tregs são necessárias no contrabalanceamento da resposta inflamatória, impedindo o dano tecidual proveniente desta<sup>24</sup>; entretanto, interessante, estudos demonstram que essas células também são capazes de induzir Th17 protetivas durante infecção *in vitro* por *C. albicans*<sup>25</sup>.

Outro grupo de linfócitos T são os conhecidos como T CD8<sup>+</sup>, que exibem atividade citotóxica ao serem ativadas durante apresentação de peptídeos fúngicos via MHC I e moléculas coestimulatórias, seja por células hospedeiras infectadas ou DCs, em processo de apresentação cruzada<sup>26</sup>. Tal atividade citotóxica é semelhante à discutida para células NK, ocorrendo a partir da liberação de grânulos contendo granzima e perforina, ou via sinalização de Fas-FasL<sup>27,28</sup>. Para além desta função, sabe-se que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos também realizam

secreção de citocinas com funções semelhantes às aquelas associadas aos perfis de T CD4+, sendo estas células inclusive recentemente denominadas de modo semelhante – linfócitos T citotóxicos (Tc) 1 e 17<sup>29</sup>.

Para além da resposta associada à linfócitos T, os linfócitos B e plasmócitos são outras células atuantes no contexto da imunidade adaptativa. Dentre os mecanismos pelos quais exercem suas funções, o principal é a secreção de anticorpos que atuam na neutralização do fungo e inibição da sua replicação, bem como do impedimento da formação de tubos germinativos e biofilmes, importantes para a sua infecção e instalação<sup>26</sup>. Ademais, tais anticorpos, principalmente a imunoglobulina G (IgG), são opsoninas e podem ser reconhecidos por diversos PRRs, auxiliando na ativação celular, do sistema complemento e no mecanismo de citotoxicidade dependente de anticorpo. Por fim, é válido citar que os linfócitos B também são capazes de realizar a apresentação de antígenos, colaborando para ativação celular de linfócitos T<sup>1</sup>.

## **1.2 Estudo e caracterização de Erros Inatos da Imunidade**

Os erros inatos da imunidade (EII), também denominados de imunodeficiências primárias, são um conjunto de doenças causadas por alterações genéticas que levam a suscetibilidade a infecções, autoimunidade, doenças autoinflamatórias, e/ou malignidade<sup>30</sup>. Tais defeitos genéticos estão associados a mutações de ganho ou perda de função (GOF ou LOF, do inglês *gain-* ou *loss-of-function*, respectivamente), que como o nome sugere relacionam-se a mutações que intensificam ou atenuam as funções envolvendo genes codificantes de enzimas, proteínas estruturais, como receptores, moléculas envolvidas em transdução de sinais, dentre outros<sup>31</sup>.

Em relação ao padrão de herança, os EII podem ter herança autossômica dominante, em que apenas uma cópia do gene mutante é suficiente para expressão do fenótipo modificado; herança autossômica recessiva, em que são necessárias duas cópias mutantes do gene; e ligada ao X, que sumariamente relacionam-se a genes localizados em uma região não homóloga do cromossomo X e, portanto, mutações nestes afetam com maior frequência indivíduos do sexo masculino. Além disso, o fenótipo alterado observado em pacientes em heterozigose, ou seja, indivíduos que possuem um alelo com alteração e outro selvagem, pode estar normalmente associada a variantes autossômicas dominantes por GOF, haploinsuficiência, em que apenas uma cópia não é suficiente para expressão da função selvagem, ou dominância negativa, que ocorre quando o alelo modificado inibe a expressão ou função do alelo selvagem<sup>31-33</sup>.

A partir do avanço no estudo das doenças genéticas gerado pela disponibilidade de metodologias robustas de sequenciamento, um número crescente de EII vem sendo caracterizados<sup>34</sup>. Tal observação é ratificada pelos relatórios do Comitê de Especialistas em Erros Inatos da Imunidade da *International Union of Immunological Societies* (IUIS), no qual o último relatório de 2020 referiu 430 defeitos genéticos associados a EII, 64 a mais comparado ao último parecer de 2018. Além do mais, embora considerados individualmente raros na população, estima-se que a prevalência de EII estejam mais próximo de 1/1000 a 1/5000<sup>30</sup>, prevalência muito acima do que inicialmente esperado quando considerado o grupo de doenças como um todo.

Apesar de uma prevalência estimada elevada, inúmeros pacientes permanecem sem diagnóstico ou são diagnosticados tardiamente, durante intercorrências associadas principalmente a infecções graves ou complicações relacionadas, fator causado pela heterogeneidade das manifestações clínicas, acesso limitado a exames diagnósticos e deficiência na educação médica<sup>35</sup>. Em relação a este último, de acordo com pesquisa desenvolvida em 2013 pelo *Brazilian Group for Immunodeficiency* (BRAGID)<sup>36</sup>, de 3047 pediatras consultados, 97% destes haviam atendido paciente com infecções de repetição, entretanto apenas 63% suspeitaram e realizaram avaliações para EII, sendo que somente 50% destes conheciam imunologistas para encaminhar os pacientes<sup>37</sup>.

Reforçando tais dados, estima-se que no Brasil mais de 20 mil pacientes possuem EII, entretanto apenas 5 mil destes têm diagnóstico adequado e estão em devido tratamento disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS)<sup>36</sup>. Desta forma, consideráveis esforços são realizados na tentativa de incentivar o diagnóstico precoce de EII visando tratamento nos estágios iniciais aos pacientes. Com o objetivo de auxiliar médicos pediatras e clínicos, a Cruz Vermelha Americana e a Fundação Jeffrey Modell propuseram 10 sinais de alerta para EII em crianças. Tal proposta foi adaptada para cada país de acordo com o contexto de patógenos e doenças circulantes (**Tabela 1**).

**Tabela 1. 10 sinais de alerta para EII em crianças.** Adaptado de BRAGID<sup>36</sup>.

| Condições   |
|---|
| 1. Duas ou mais pneumonias no último ano                        |
| 2. Quatro ou mais otites no ano                                 |
| 3. Estomatites de repetição ou monilíase por mais de dois meses |
| 4. Abscessos de repetição ou ectima                             |

5. Um episódio de infecção sistêmica grave (meningite, osteoartrite, septicemia)
  6. Infecções intestinais de repetição/diarreia crônica
  7. Asma grave, doença do colágeno ou doença autoimune
  8. Efeito adverso ao BCG e/ou infecção por micobactéria
  9. Fenótipo clínico sugestivo de síndrome associada a Imunodeficiência
  10. História familiar de imunodeficiência
- 

Como exposto anteriormente, a crescente disponibilidade de técnicas robustas e novas plataformas de análises e sequenciamento genético, como sequenciamento completo do exoma (WES, do inglês *Whole-exome sequencing*) e Sanger, tem possibilitado uma maior compreensão acerca dos aspectos pontuais das variantes genéticas e sua correlação com as manifestações clínicas<sup>32</sup>. Complementarmente, técnicas modernas, tais quais sequenciamento de transcriptoma, assumem relevância ao dispor de uma possibilidade de investigar como tais alterações genéticas funcionam não apenas a nível estrutural, mas celular, detalhando a consequência celular intrínseca dessas alterações<sup>38</sup>.

### 1.3 Micoses sistêmicas e Erros Inatos da Imunidade

As micoses sistêmicas compreendem um grupo de doenças causadas por patógenos fúngicos associados a elevadas taxas de morbimortalidade<sup>39</sup>. Dentre as micoses categorizadas como micoses sistêmicas, podem ser citadas aquelas causadas pelos fungos dimórficos e endêmicos *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Coccidioides* spp.; além do fungo leveduriforme *Cryptococcus neoformans*, responsável por uma das apresentações clínicas mais comuns em pacientes imunocomprometidos, a criptococose<sup>40</sup>. Por vezes, tais micoses enquadram-se como micoses pulmonares, devido ao recorrente acometimento do sítio pulmonar<sup>41</sup>. É válido de nota, ainda, que no contexto de pacientes imunodeficientes, fungos considerados de ambiente, tais quais *Aspergillus* spp. e *Candida* spp., podem cursar clinicamente como infecções sistêmicas<sup>42</sup>.

Levando em consideração a imunidade a fungos discutida anteriormente, bem como as perspectivas acerca dos EII, espera-se que defeitos genéticos em vias relevantes à imunidade do hospedeiro a fungos correlacionem-se com comprometimento da resposta e, por conseguinte, suscetibilidade a tais patógenos<sup>43</sup>. Entretanto, apesar dessa vasta possibilidade de componentes imunológicos, notavelmente poucos EII encontram-se caracterizados na literatura no que se refere especificamente a infecções fúngicas sistêmicas, sobretudo considerando o

impacto e a frequência deste grupo de micoses, especialmente na América Latina<sup>44</sup>, como observado na **Figura 2**, abaixo.



**Figura 2. Distribuição geográfica de infecções fúngicas endêmicas na América Latina.** Demais infecções fúngicas sistêmicas, como criptococose, aspergilose e candidíase não estão representadas, pois apresentam distribuição mundial. Adaptado de Sifuentes-Osornio e colaboradores<sup>45</sup>.

Utilizando a classificação de Lionakis e colaboradores<sup>43</sup>, dentre os EII mais estudados e associados a micoses sistêmicas ou com desfecho clínico sistêmico, no caso das infecções oportunistas, podem ser destacados os grupos de (1) desordens na maquinaria oxidativa dos fagócitos; (2) desordens na sinalização de citocinas; (3) desordens em fatores de transcrição e (4) desordens na sinalização de outras moléculas.



Em relação a desordens na maquinaria oxidativa dos fagócitos, dentre os principais defeitos congênitos relacionados a infecções fúngicas podem ser destacados aqueles associados à Doença Granulomatosa Crônica (DGC), doença causada por variantes patogênicas nos genes *CYBB*, *NCF1*, *CYBA* e outros. Pacientes com essa deficiência possuem subunidades defeituosas do complexo NADPH-oxidase, o que impede que este complexo funcione normalmente e produza as ROS<sup>46</sup>. Há, ainda, a deficiência de Mieloperoxidase (MPO), uma enzima importante na produção de ácido hipocloroso, importante para atividade fungicida em formas filamentosas e leveduriformes de fungos<sup>47</sup>. Além destas, inclui-se ainda a deficiência na enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD, do inglês *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*), enzima associada a função de proteção ao estresse oxidativo, principalmente nas hemácias. Para isso, uma das reações catalisadas pela enzima G6PD é a conversão de glicose-6-fosfato em 6-fosfoglucoactona, a qual libera prótons H<sup>+</sup> que, por sua vez, são captados pelo NADP<sup>+</sup>, levando à produção de NADPH; conseqüentemente encontrado em baixas concentrações em pacientes com deficiência nesta enzima, tornando-os, assim, propensos a crises hemolíticas (devido ao estresse oxidativo nas hemácias) e suscetíveis a infecções devido à baixa produção ROS, semelhante ao que ocorre em pacientes com DGC<sup>48</sup>.

Abordando as desordens associadas à sinalização de citocinas, podem ser citadas as deficiências relacionadas ao denominado Eixo IL-12/IFN- $\gamma$ , uma alça de alimentação positiva que envolve a ativação de macrófagos produtores de IL-12. Assim, esta citocina auxilia na polarização Th1 de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, células que passam a secretar IFN- $\gamma$  e ativam macrófagos a desempenharem suas funções microbicidas. Dentre os defeitos descritos na literatura, podem ser citados variantes nos genes *IFNGR1* e *IL12RB1*<sup>49,50</sup>, os quais são associados a função dos receptores de interferon- $\gamma$  tipo 1 e da subunidade  $\beta$ 1 do receptor de IL-12, respectivamente. Há, ainda, deficiências em genes associados ao perfil de citocinas Th17 que, juntamente com outras deficiências (como a do gene *IL12RB1*), enquadram-se no espectro clínico de candidíase mucocutânea crônica, tais quais deficiência nos genes *IL-17RA*, *IL-17RF*, *ACT1*<sup>51</sup>.

Ademais, há pacientes que possuem comprometimento da resposta relacionada a linfócitos T e/ou B e/ou NK, que também são caracterizados por elevado grau de suscetibilidade a infecções fúngicas e, na ausência de transplante de medula óssea, podem inclusive ter desfechos fatais; uma das síndromes mais conhecidas é denominada Imunodeficiência Combinada Grave (SCID, do inglês *Severe Combined Immunodeficiency*), sendo que deficiências nos genes

*IL2RG*, *IL7RA*, *JAK3*, *RAG1* e *RAG2*, além de outros já foram descritos na literatura associados a mesma<sup>52</sup>.

Dentre as desordens envolvidas com fatores de transcrição, podem ser citadas variantes patogênicas associadas a *STAT3*, causando a chamada Síndrome do Hiper-IgE, além de variantes no gene que codifica o fator de transcrição denominado AIRE, conhecido por sua função em permear a regulação autoimune – razão pela qual pacientes com deficiência no mesmo apresentam a síndrome autoimune denominada Poliendocrinopatia autoimune tipo 1 (APECED, do inglês *Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*). Além disso, variantes em *STAT1*, *GATA2*, e *STAT4* também resultam na suscetibilidade a infecções fúngicas sistêmicas<sup>42,49,53,54</sup>.

Interessantemente, há ainda inúmeros outros EII que afetam distintas moléculas de sinalização importantes na resposta a fungos. Dentre estas, podem ser destacadas deficiência no gene *CARD9*, que codifica proteína envolvida na sinalização de diversos PRRs<sup>55</sup>; deficiência no gene codificante do receptor de Dectina-1<sup>56</sup>, nos genes *DOCK8* e *TYK2*, responsáveis pela codificação de proteínas de sinalização intracelular, que assim como a deficiência no gene *STAT3*, associam-se à síndrome de Hiper-IgE<sup>57</sup>; além dos genes relacionados a Síndrome do Hiper-IgM, tais quais *NEMO*, *IKBA* e *CD40L*<sup>58</sup>, dentre outros.

Portanto, dado o exposto, e retomando os seguintes fatores: 1) aspectos diversos a serem estudados e caracterizados dos distintos EII; 2) a elevada taxa de exposição a doenças infecciosas, como as fúngicas, que países em desenvolvimento (dentre os quais o Brasil) possuem; 3) repercussões graves e por vezes fatais para pacientes imunodeficientes e acometidos por infecções fúngicas; 4) necessidade de maior conscientização da comunidade médica para suspeitar e estabelecer o diagnóstico e tratamentos criteriosos, vide o subdiagnóstico observado no Brasil; 5) a relevância, no contexto apresentado, de estudos que visem investigação de EII, sendo este um importante, entretanto subestimado, problema de saúde pública. Propusemos, assim, investigar mecanismos imunológicos na resposta a fungos por intermédio de uma análise integrativa realizada com dados públicos de transcriptoma, além de investigar molecular e geneticamente pacientes brasileiros suscetíveis a infecções fúngicas sistêmicas de repetição objetivando a identificação e caracterização de possíveis EII apresentados por estes indivíduos.

**CAPÍTULO 1 – REDE DE INTERAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE INTERFERON E DO RECEPTOR DO TIPO TOLL NA RESPOSTA IMUNE ANTICANDIDA.**

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar mecanismos imunológicos envolvidos na resposta a *Candida* spp. a partir da análise integrativa de dados públicos de transcriptoma humano.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar genes e vias em desregulação após condição de infecção por *Candida* spp.;
- Analisar o padrão do transcriptoma em distintas camadas do sistema imunológico;
- Verificar graus de correlação entre vias desreguladas;
- Correlacionar dados encontrados com EII descritos associados à infecção fúngica.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 Seleção de dados de sequenciamento públicos

A busca de dados públicos (*datasets*) foi realizada nas bases de dados do NCBI GEO e ArrayExpress. Procurou-se *datasets* que dispunham de expressão diferencial de genes após infecção por diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) em células de sangue total (WBCs, do inglês *whole-blood cells*), PBMCs e células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs, do inglês *monocyte-derived Dendritic Cells*). Foram incluídos *datasets* que atendiam aos seguintes critérios (1) WBCs, PBMCs e moDCs infectadas com *Candida* spp.; (2) estudos com pelo menos duas amostras para cada grupo; (3) presença de grupos controles; (4) todas as plataformas de análises foram consideradas; e (5) apenas estudos que dispunham de dados de transcriptoma foram incluídos. Em relação aos critérios de exclusão, foram excluídos do estudo: (1) estudos realizados a partir de amostras de outros organismos que não humanas; (2) amostras que passaram por tratamento antes do sequenciamento e (3) estudos de revisão. Ao final, 8 *datasets* se enquadraram nos critérios e foram incluídos no estudo (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Lista de *datasets* selecionados para a análise integrativa.

| <b>Autores (Ano publicação)</b>        | <b>PMID</b>         | <b>Dataset ID</b> | <b>Tipo celular</b> |
|--|---------------------|-------------------|---------------------|
| Dix e cols. (2015)                     | 25814982            | GSE65088          | WBCs                |
| Sieber & Kämmer e cols.<br>(2018;2020) | 30333805 e 33024045 | GSE114180         | WBCs                |
| Smeeckens e cols. (2013)               | 23299892            | GSE42606          | PBMCs               |
| Bruno e cols. (2020)                   | 32839538            | GSE154911         | PBMCs               |
| De Vries e cols. (2020)                | 32251450            | De Vries e cols.  | PBMCs               |
| Rizzetto e cols. (2010)                | 20228201            | E-MTAB-135        | moDCs               |
| Rizzetto e cols. (2012)                | 22879980            | E-MTAB-751        | moDCs               |
| Dix e cols. (2017)                     | 28280489            | GSE77969          | moDCs               |

\*WBCs: *whole-blood cells*; PBMCs: *human peripheral blood mononuclear cells*; moDCs: *monocyte-derived Dendritic Cells*.

#### 3.2 Análise de expressão diferencial

Para caracterizar e estimar o nível de expressão gênica, os valores brutos (*counts*) das leituras dos *datasets* de *RNAseq* foram normalizados e transformados em  $\log_2$  *count per million*

e o *software* Network Analyst 3.0 Webtool<sup>59</sup> (<https://www.networkanalyst.ca/>) foi utilizado para realizar análise de expressão diferencial, por meio do pacote DESeq2. Em relação aos dados de *microarray*, estes foram analisados por intermédio da ferramenta GEO2R com pacote limma-voom<sup>60</sup> (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>). Quanto aos dados de *single-cell*, o objeto seurat disponível depositado no banco de dados *single-cell eQTLGen Consortium* (<https://eqtlgen.org/candida.html>) foi analisado para obtenção dos genes diferencialmente expressos (DEGs, do inglês *differentially expressed genes*). Seguimos o *pipeline* padrão do Seurat ([https://satijalab.org/seurat/articles/pbmc3k\\_tutorial.html](https://satijalab.org/seurat/articles/pbmc3k_tutorial.html)) conforme descrito anteriormente por Stuart e colaboradores<sup>61</sup> para realizar análise de expressão diferencial e visualização de dados (UMAP, *dotplot* e mapas de calor).

Para selecionar o conjunto de genes regulados para cima e para baixo, utilizamos os valores estatísticos de  $\log_2$  *fold-change* ( $\log_2$ FC) acima de 1 e abaixo de -1, respectivamente. Além disso, o valor de p-ajustado abaixo de 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

### 3.3 Análises de módulos de co-expressão de genes

O *dataset* GSE42606 foi selecionado para que a análise de co-expressão gênica fosse performada a partir do pacote ‘R’ CEMiTool 1.12.2<sup>62</sup> utilizando parâmetros padrão e de acordo com as especificações dos desenvolvedores.

### 3.4 Análise de enriquecimento e visualização de dados de transcriptoma humano

Usamos os DEGs para identificar termos de ontologia genética (GO, do inglês *gene ontology*) enriquecidos. Vias e processos biológicos foram identificados por *over representation analysis* (ORA) e EnrichR<sup>63</sup>, sendo que estas vias imunológicas foram consideradas significativamente enriquecidas a partir do valor de p-ajustado < 0,05.

Para a visualização dos dados e realização de outras análises, diferentes ferramentas de bioinformática *online* e pacotes do software ‘R’ versão 4.0.2 (<https://www.r-project.org/index.html>) foram utilizados. O pacote ClusterProfiler<sup>64</sup> foi usado para gerar *dotplots* de vias enriquecidas associadas a *Candida spp.* juntamente dos pacotes DOSE, richplot e reatomePA. Os gráficos GOplots foram desenvolvidos utilizando os pacotes ‘R’ unkn, circlize e GOplot<sup>65</sup>. Além disso, gráficos estatísticos foram construídos por intermédio das funcionalidades do pacote ggplot2<sup>66</sup>. Os DEGs compartilhados entre diferentes infecções fúngicas (*C. albicans* e *C. auris*) foram representados com mapas de calor circulares usando os pacotes ‘R’ circlize e ComplexHeatmap<sup>67</sup>. Demais mapas de calor foram gerados a partir do

*software* Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>); enquanto os diagramas de Venn e Upset *plots* foram construídos a partir da ferramenta Intervene<sup>68</sup> e do *Bioinformatics & Evolutionary Genomics* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Os códigos de linguagem ‘R’ usados neste trabalho encontram-se disponíveis em [https://github.com/ranieri131/SalgadoRC\\_CANDIDA\\_IMMUNE\\_RESPONSE\\_2021](https://github.com/ranieri131/SalgadoRC_CANDIDA_IMMUNE_RESPONSE_2021).

### 3.5 Análises de correlação

Utilizamos o conjunto de dados GSE42606 para realizar análise de correlação entre genes associados a TLRs e cascatas de sinalização de IFN tipo I e II. As matrizes de correlação foram geradas com a ferramenta web Intervene<sup>68</sup> (<https://intervene.readthedocs.io/en/latest/index.html>) por intermédio do coeficiente de Pearson. Além disso, a análise de correlação canônica (CCA, do inglês *Canonical correlation analysis*)<sup>69</sup> foi aplicada para investigar padrões de associação entre os genes citados, sendo esta realizada no *software* ‘R’ por meio dos pacotes CCA e whitening<sup>69</sup>. Ademais, a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal component analysis*) foi construída usando as funções do ‘R’ `prcomp` e `princomp`, a partir do pacote `factoextra`.

### 3.6 Redes de interação proteína-proteína

As redes de interação proteína-proteína foram desenvolvidas por intermédio do *software* NAViGaTOR<sup>70</sup>, sendo que a cor do nó representa o componente celular do GO, conforme indicado nas legendas das figuras. Os DEGs foram usados como entrada para o *Integrated Interactions Database* (IID, version 2020–05; <http://ophid.utoronto.ca/iid>)<sup>71,72</sup> de modo a identificar interações físicas diretas de proteínas. As redes foram exportadas em formato de arquivo SVG e finalizadas no Adobe Illustrator 2021.

### 3.7 Análise fatorial de vários estudos

A análise fatorial de vários estudos (MFSA, do inglês *Multistudy factor analysis*) é uma versão generalizada da análise fatorial que permite a análise conjunta de vários estudos. MFSA estima fatores compartilhados comuns a todos os estudos, bem como fatores específicos para estudos individuais. A estimativa de parâmetros para o modelo MFSA pode ser calculada usando uma abordagem frequentista ou bayesiana. Comparada com a análise frequentista, a abordagem bayesiana oferece duas grandes vantagens: (1) fornece fatores mais bem definidos e (2) escolhe a dimensão dos fatores comuns e específicos do estudo por meio de uma abordagem prática e útil. Adotamos uma abordagem bayesiana<sup>73</sup> para análise inferencial, de

modo a identificar fatores comuns e específicos do estudo compartilhados por GSE65088 e GSE42606.

### **3.8 Análise de interferoma**

Para execução da análise de interferoma, e assim compreender se estes DEGs são regulados ou possuem associação com IFNs, foi utilizado o software Interferome V2.01 (<http://www.interferome.org/interferome/home.jsp>), seguindo parâmetros de entrada estabelecidos pelo desenvolvedores do *software*<sup>74</sup>.

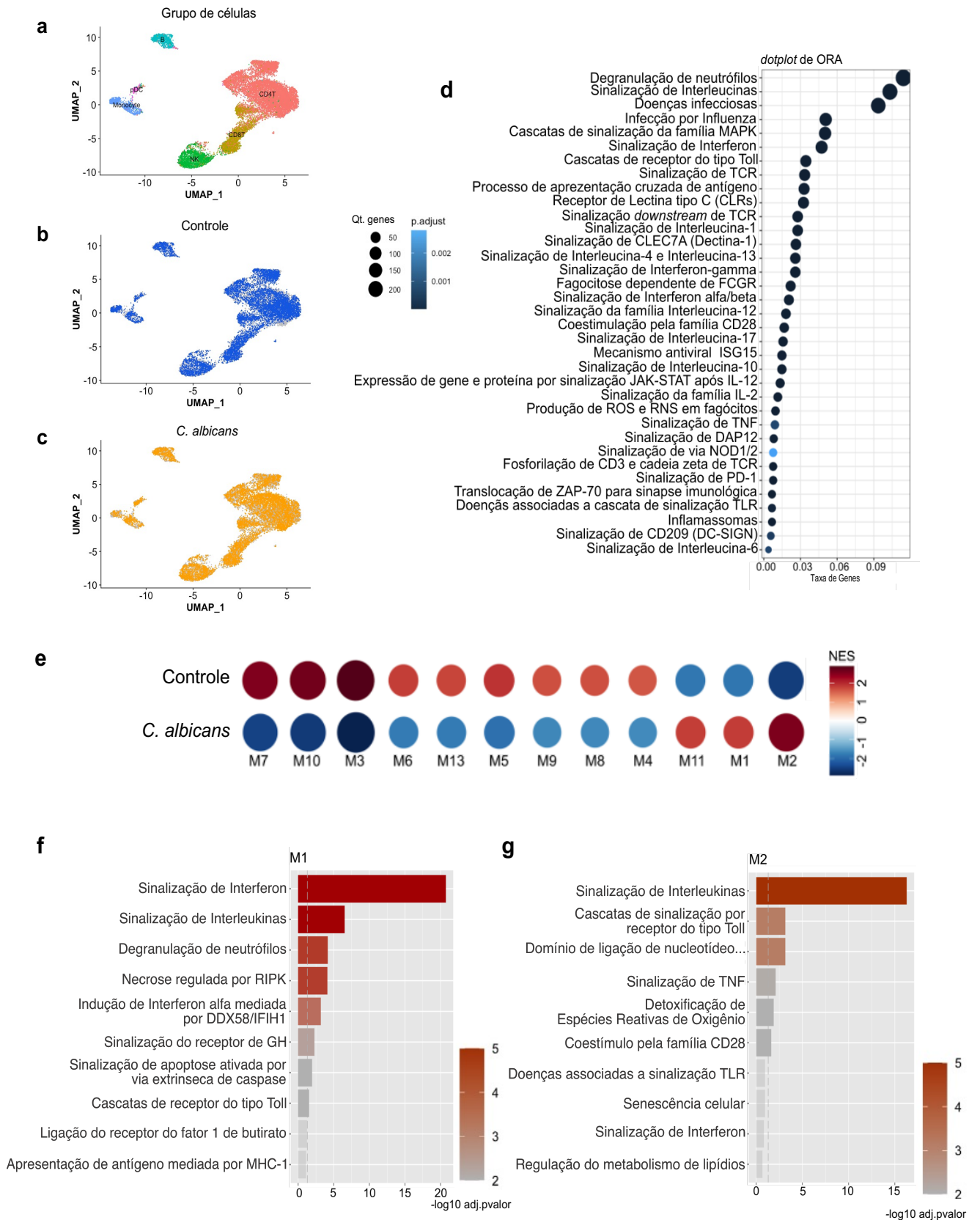


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resposta imune a *C. albicans* é marcada por vias de TLR e IFN em diferentes tipos celulares

De forma a explorar os dados disponibilizados por De Vries e colaboradores<sup>75</sup> de sequenciamento de células únicas (*scRNAseq*, do inglês *single-cell RNA sequencing*), realizou-se análise de ORA, uma análise para avaliação de vias enriquecidas por um conjunto de genes, de cerca de 6722 DEGs entre distintas populações celulares – monócitos, células NK, pDCs e linfócitos T CD4+, T CD8+ e CD19+, caracterizadas pela condição de infecção ou não por *C. albicans*. Os agrupamentos celulares para ambas as condições podem ser observados na **Figura 3a-c**, enquanto os enriquecimentos das vias afetadas na infecção por *C. albicans* são apresentados na **Figura 3d**. Interessantemente, para além das vias clássicas associadas à resposta imune a fungos<sup>3</sup>, tais quais IL-17, Dectina-1, DC-SIGN, vias de produção de ROS e Eixo IL-12/IFN- $\gamma$ , observou-se a presença de genes associados a resposta de interferon do tipo I ( $\alpha/\beta$ ).

Assim, com o objetivo de melhor compreensão dos possíveis módulos de expressão associados, conjunto de genes agrupados de acordo com valores semelhantes de expressão, realizou-se análise de módulos gênicos de co-expressão com os dados provenientes do *dataset* GSE42606<sup>76</sup>, o único disponível que atende ao critério de 15 amostras para cada grupo requerido para a avaliação. A partir deste, foi identificado 13 módulos de genes co-expressos enriquecidos em PBMCs após infecção por *C. albicans* (**Figura 3e**). É válido de nota que, dentre os dois módulos mais enriquecidos, as vias associadas são relacionadas a sinalização por IFN e sinalização de interleucinas com cascatas de sinalização de TLR, como pode ser observado pelo enriquecimento de vias a partir dos genes presentes nos módulos (**Figura 3f-g**).

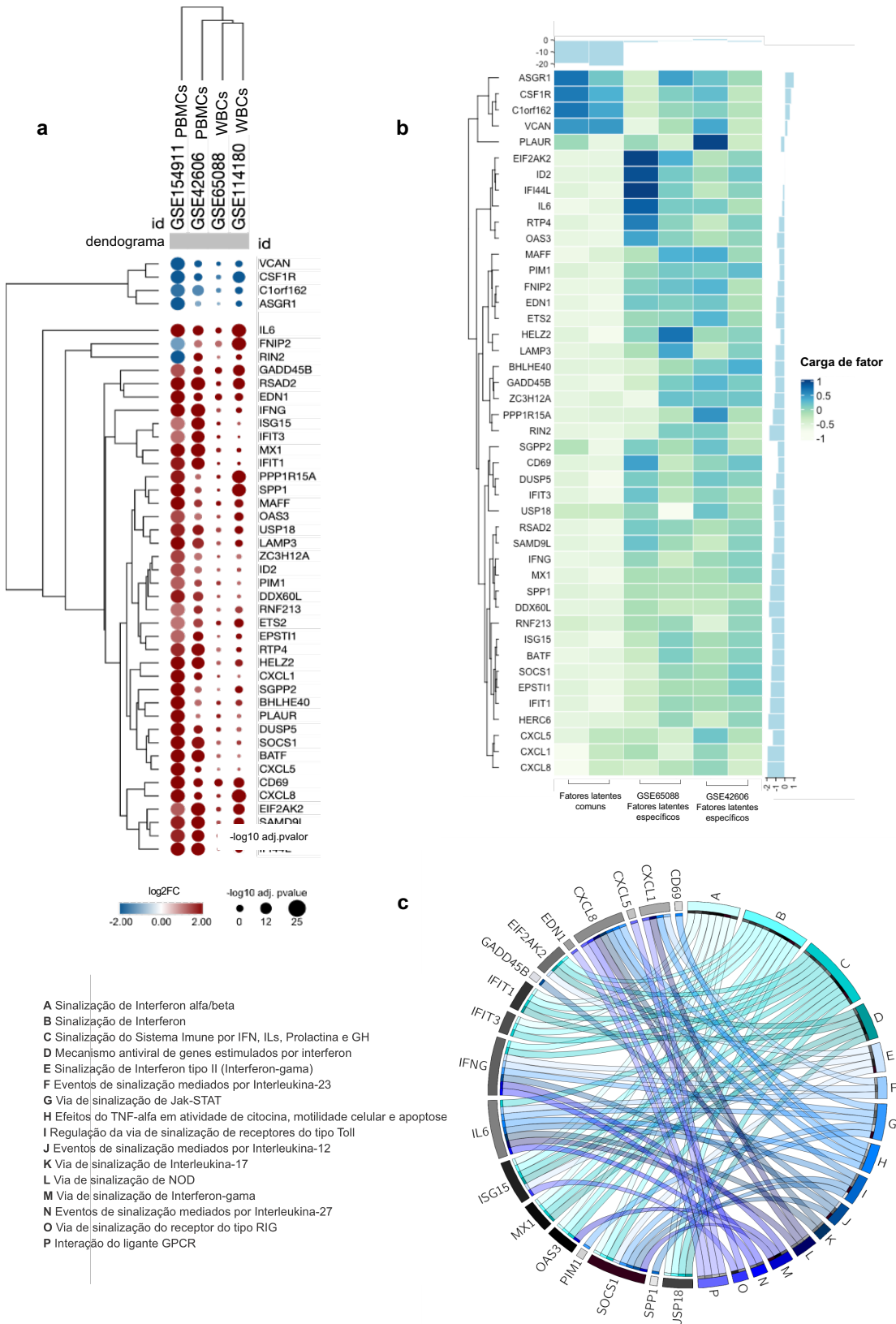


**Figura 3. Indução das vias de sinalização de TLR e IFN em resposta a *C. albicans*.** **a**, Visualização UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) de perfis de *scRNAseq* coloridos de acordo com os grupos de células. **b** e **c**, UMAP de grupos de células controle e ativadas por *C. albicans*. **d**, *Dotplot* mostrando as vias associadas à resposta imune a *C. albicans*. **e**, Módulos de co-expressão significativamente enriquecidos (M1-M11

e M13) em PBMCs. **f e g**, Representação de enriquecimento obtida por co-expressão de genes presentes em M1 e M2 exibindo vias de sinalização significativamente enriquecidas. NES: score de enriquecimento.

#### **4.2 Genes associados a sinalização por TLR e IFN em leucócitos do sangue periférico são ativados por *C. albicans***

Em seguida, investigou-se quais DEGs e vias de sinalização estariam consistentemente ativadas em leucócitos do sangue periférico após indução por *C. albicans*, tanto em *datasets* públicos de PBMCs<sup>76,77</sup> quanto de WBCs<sup>78-80</sup>. A análise conjunta desses dados permitiu a verificação de que há 44 genes desregulados em comum, sendo 40 regulados para cima e 4 regulados para baixo. De acordo com a população celular, os DEGs formam clusters hierárquicos bem definidos, apresentando padrão de expressão próxima entre os *datasets* com o mesmo tipo celular no que se refere à regulação (para cima ou para baixo) e significância (**Figura 4a**). A análise fatorial de múltiplos estudos de conjuntos de *datasets* elegíveis<sup>73</sup> (WBCs: GSE65088<sup>80</sup> e PBMCs: GSE42606<sup>76</sup>); aqueles com o número mínimo de amostras necessárias para esta análise (15 amostras) – identificou dois fatores latentes comuns com altas cargas, enquanto fatores latentes específicos mostraram baixa cargas nesses estudos, fortalecendo a relevância biológica dos 44 genes comuns (**Figura 4b**). O enriquecimento destes 44 DEGs revelou diversas vias afetadas, dentre os quais inclui-se sinalização por TLR e IFNs tipo I/II (**Figura 4c**).



**Figura 4. *C. albicans* ativa genes comuns associados a TLR e IFN em leucócitos do sangue periférico. a,** Agrupamento hierárquico das 44 DEGs comuns demonstrando os níveis de expressão gênica apresentados nos diferentes estudos. O tamanho e a cor dos círculos correspondem ao valor de p-ajustado transformado em  $-\log_{10}$  e  $\log_2FC$ , respectivamente. Azul representa regulação para baixo e vermelho indica DEGs regulados para cima. Linhas e colunas foram agrupadas com base na similaridade entre os valores  $\log_2FC$ . **b,** Mapa de calor de fatores

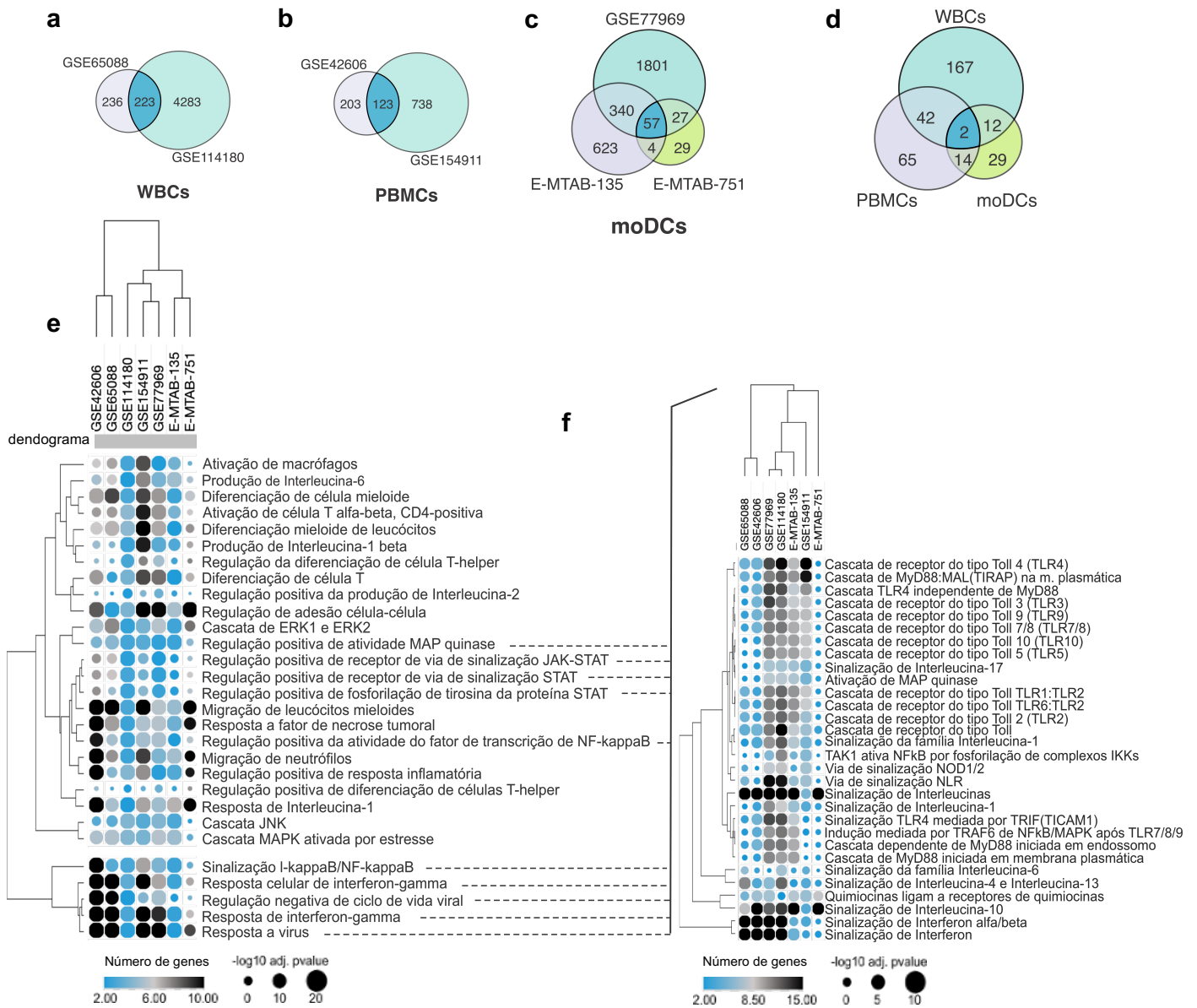
latentes comuns e específicos em todos os estudos, contendo genes que apresentam cargas positivas e negativas que variam de -1 a 1. c, GOplot de vias imunológicas enriquecidas e seus respectivos genes associados.

#### 4.3 *C. albicans* ativa sinalização de TLR e IFN em diferentes camadas do sistema imune

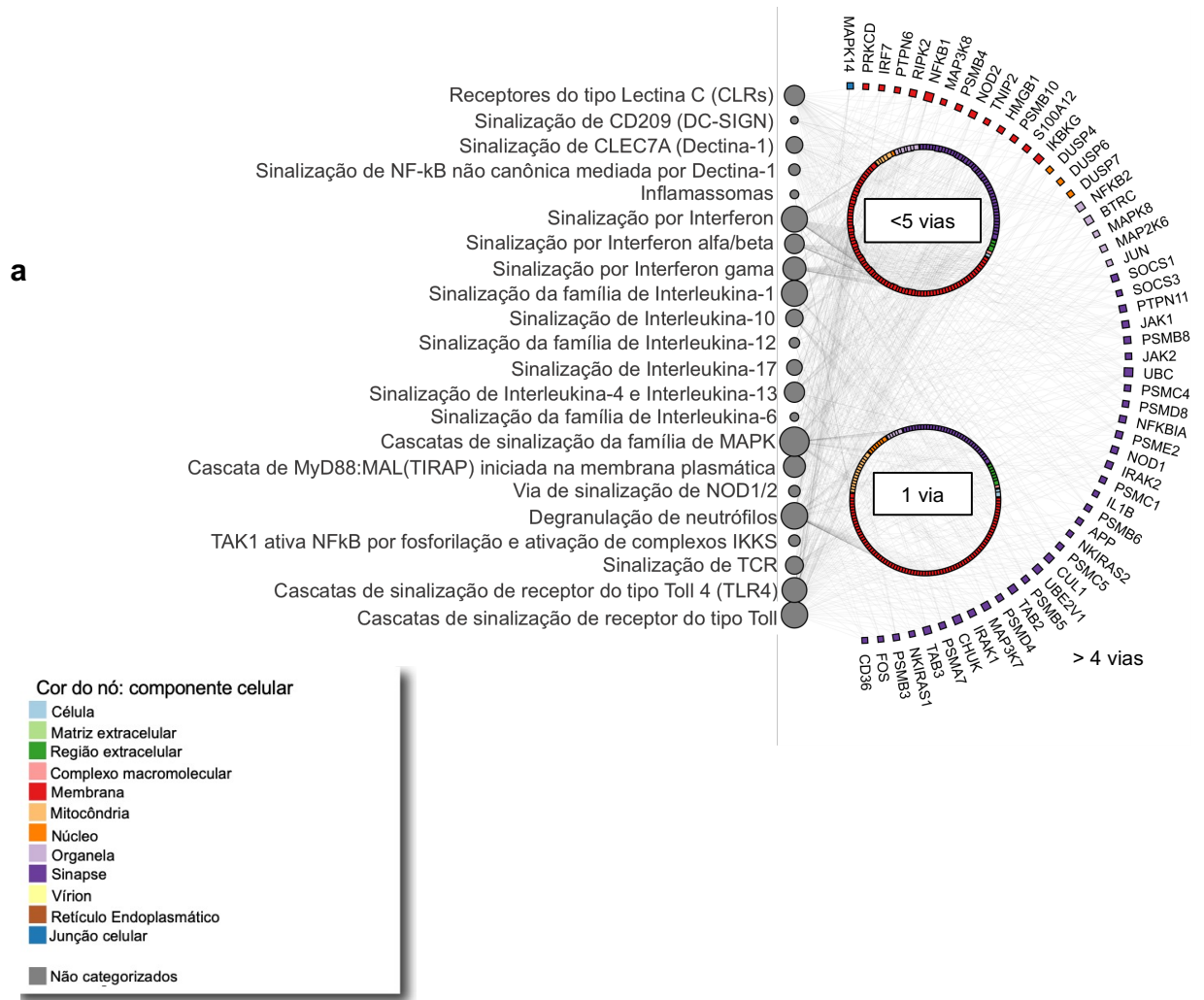
Levando em consideração a importância das DCs no contexto da imunidade a fungos, acrescentamos em nossas análises os *datasets* públicos associados a moDCs GSE77969<sup>81</sup>, E-MTAB-135<sup>82</sup> e E-MTAB-751<sup>83</sup>. A análise de interseção permitiu verificar que cada grupo celular (WBCs, PBMCs e moDCs) partilhava entre si uma quantidade substancial de DEGs: 123, 223 e 57, respectivamente. Entretanto, quando comparados todos os grupos, apenas 2 DEGs (*DUSP5* e *PIMI1*) em comum estavam desregulados posterior à infecção por *C. albicans* (**Figura 5a-d**).

Apesar disso, os grupos de DEGs de cada estudo individualmente enriqueciam uma quantidade substancial de processos biológicos, totalizando 173 processos biológicos enriquecidos (dados não apresentados), dentre os quais diversos processos associados a resposta para *C. albicans* em comum entre os estudos. Entre estes, encontramos várias moléculas/vias essenciais para a resposta imune antifúngica<sup>3</sup>, incluindo um agrupamento de sinalização de IFN- $\gamma$  e NF- $\kappa$ B e uma sobreposição previamente descrita com a resposta imune a vírus<sup>76</sup> (**Figura 5e**). ORA adicionais de DEGs envolvidos neste *cluster* mostraram enriquecimento significativo nas cascatas de sinalização de TLRs únicos (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9, TLR9 e TLR10), heterodímeros de TLR (TLR1/TLR2, TLR2/TLR6, TLR7/8), e moléculas adaptadoras de TLR (MyD88/TIRAP, TRAF6, TRIF), bem como em várias vias de sinalização de interleucinas, como IL-1, IL-4/IL-13, IL-6, IL-10, IL-17 e IFN- $\alpha/\beta$  (**Figura 5f**).

Além disso, a partir dos processos biológicos comuns entre WBCs, PBMCs e moDCs foi possível encontrar 1096 DEGs, utilizados então para verificar o padrão comportamental a nível de interação com vias por estes enriquecidas. A **Figura 6** exibe o interactoma obtido a partir desses 1096 DEGs, bem como das vias de sinalização associadas; nota-se que as vias de sinalização de TLR e IFN estão entre àquelas mais enriquecidas. Ademais, os 1096 DEGs também enriquecem outras vias de sinalização de PRRs e citocinas; como CLRs (dectina-1), NLRs (NOD1/2) e variadas interleucinas com funções diversas (IL-1, IL-4, IL6, IL-10, IL-12, IL-13 e IL-17).



**Figura 5. *C. albicans* ativa as vias comuns de sinalização de TLR e IFN em diferentes populações de leucócitos.** a-c, Diagramas de Venn exibindo o número de DEGs presentes em cada conjunto de dados agrupados por tipo de célula e suas interseções: conjuntos de dados de WBCs (a), PBMCs (b) e moDCs (c). **d**, Gráfico de interseção destaca o número de DEGs comuns em diferentes grupos de células. **e**, Agrupamento hierárquico exibindo vias enriquecidas em processos biológicos comuns em todos os estudos. **f**, Análise adicional de vias associadas a TLR e IFN. Em ambos os mapas de calor, o tamanho dos círculos corresponde ao valor de p-ajustado transformado em  $-\log_{10}$ , e a intensidade da cor indica o número de genes em cada processo biológico e via nos estudos.



**Figura 6. Rede de interação evidencia as interações entre os DEGs associados às vias de TLR e IFN, além de demais vias de sinalização classicamente associadas com as respostas imunes antifúngicas. Os “nós” circulares representam as vias e seu tamanho denota o número de genes que enriquecem estas. Os quadrados coloridos representam a localização celular dos genes.**

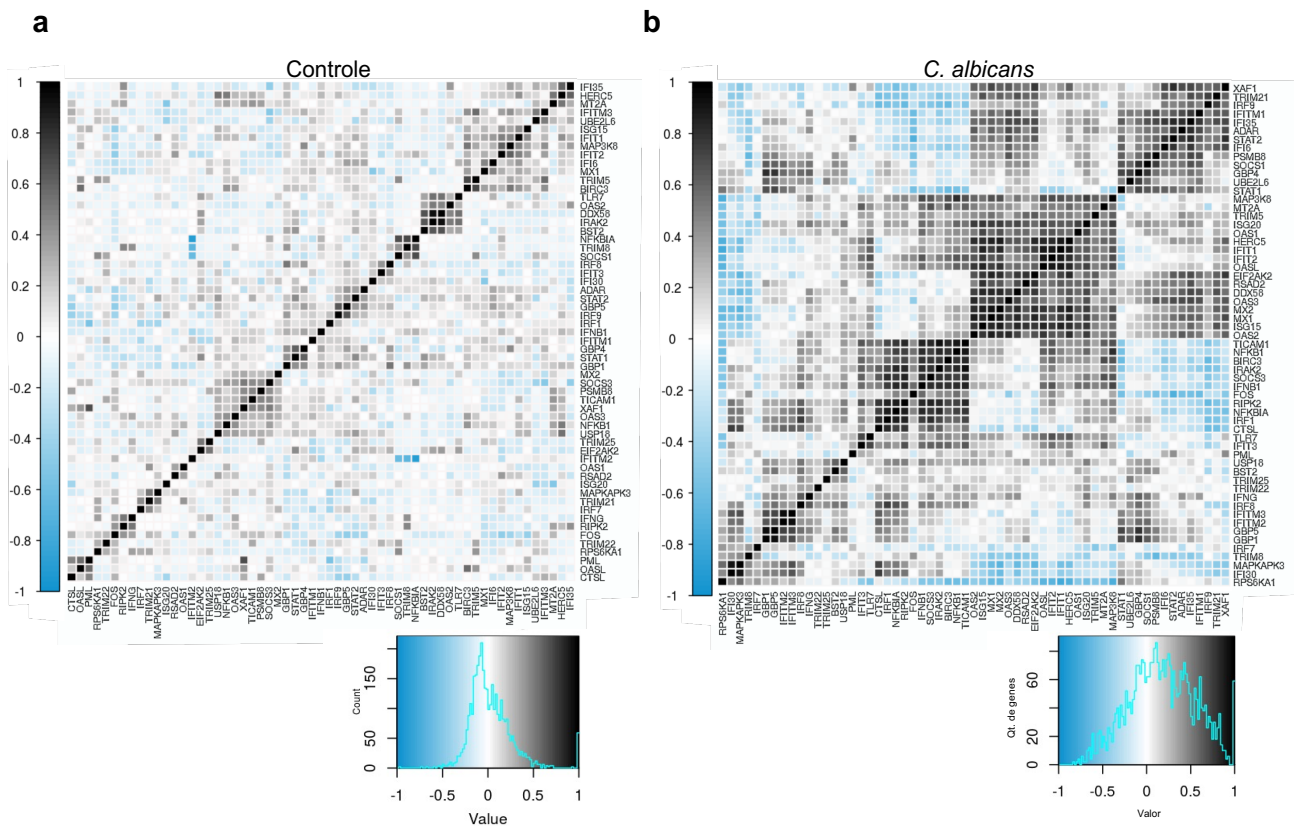
#### 4.4 Infecção por *C. albicans* aumenta o grau de correlação entre os genes associados a vias de TLR e IFN

Após verificar a consistência das cascatas de sinalização de TLR e IFN tipo I e II, avaliamos o grau de associação entre essas duas variáveis durante a resposta imune a *C. albicans*. Devido ao tamanho mínimo de amostra exigido (15 para cada grupo escolhido), selecionamos genes associados a TLR e IFN presentes nos dados do transcriptoma de PBMCs GSE42606<sup>76</sup>. Este conjunto de dados contém 45 e 14 DEGs relacionados a TLR e IFN e modulados por *C. albicans* em comparação com o grupo controle. A infecção por *C. albicans*



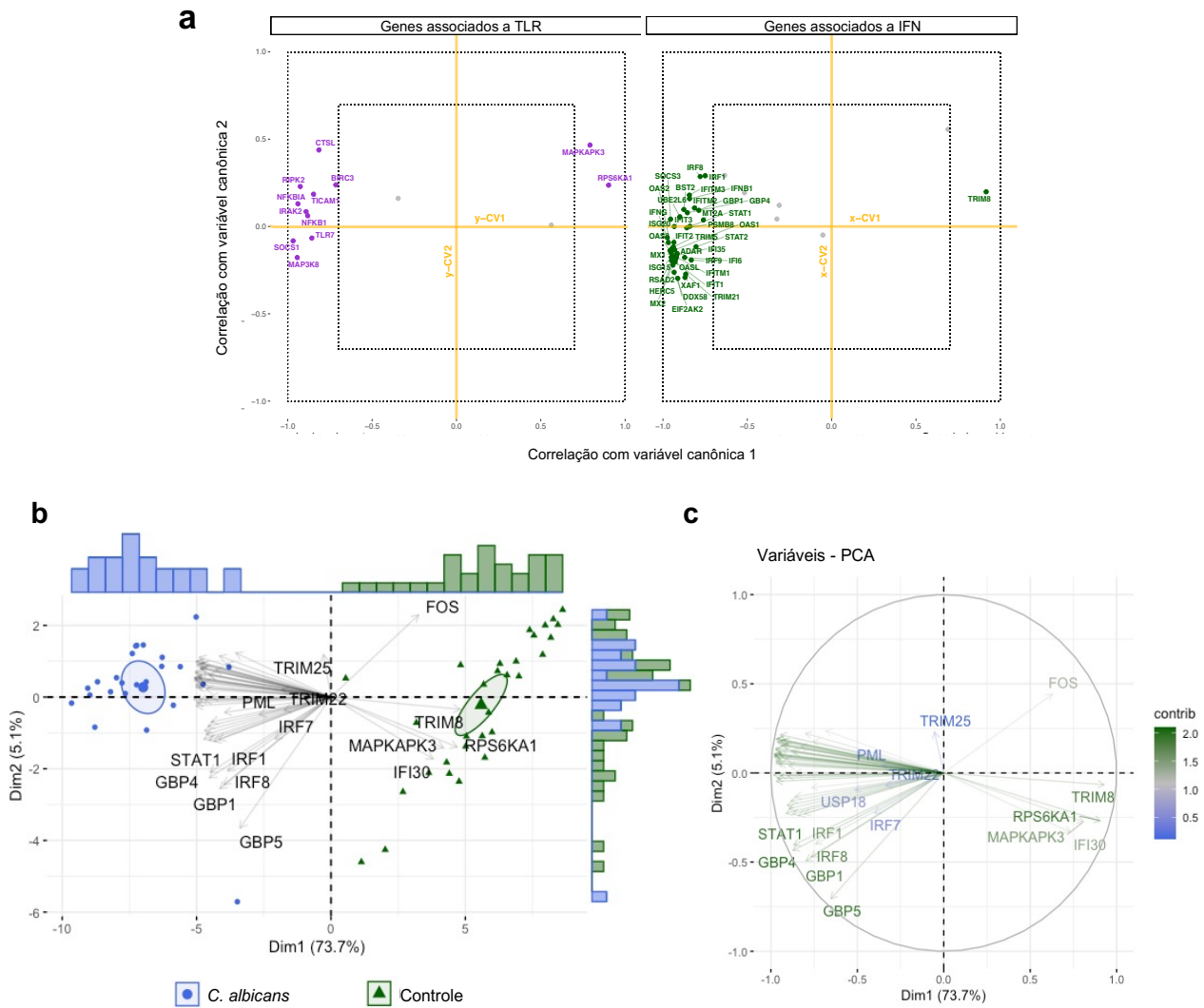
aumentou principalmente as correlações positivas entre os DEGs associados a TLR e IFN (Figura 7a-b).

Além disso, realizamos análise de CCA para avaliar melhor a força da associação entre estes dados. CCA é um modelo paramétrico genérico usado para quantificar relação entre dois grupos de variáveis inter-relacionadas e interdependentes<sup>84</sup>. Esta abordagem revelou um par de variáveis canônicas (x-CV1 e y-CV1), destacando a forte associação entre a maioria dos DEGs associados a TLR e IFN em ambos os PBMCs infectados e não infectados por *C. albicans*, um achado que destaca a forte associação entre a maioria dos DEGs associados a TLR e IFN em PBMCs controle e infectados por *C. albicans* (Figura 8a), bem como a capacidade de estratificar essas condições, evidenciado pela análise de PCA (Figura 8b-c).



**Figura 7. Relação entre moléculas associadas às cascatas de sinalização de TLR e IFN. a e b,** Gráfico de correlação de DEGs associados a cascatas de sinalização de TLR e IFN em PBMCs na **a**, ausência ou **b**, presença de *C. albicans*. Histogramas do coeficiente de correlação de Pearson, contendo correlação negativa e positiva de 1 a -1, respectivamente.

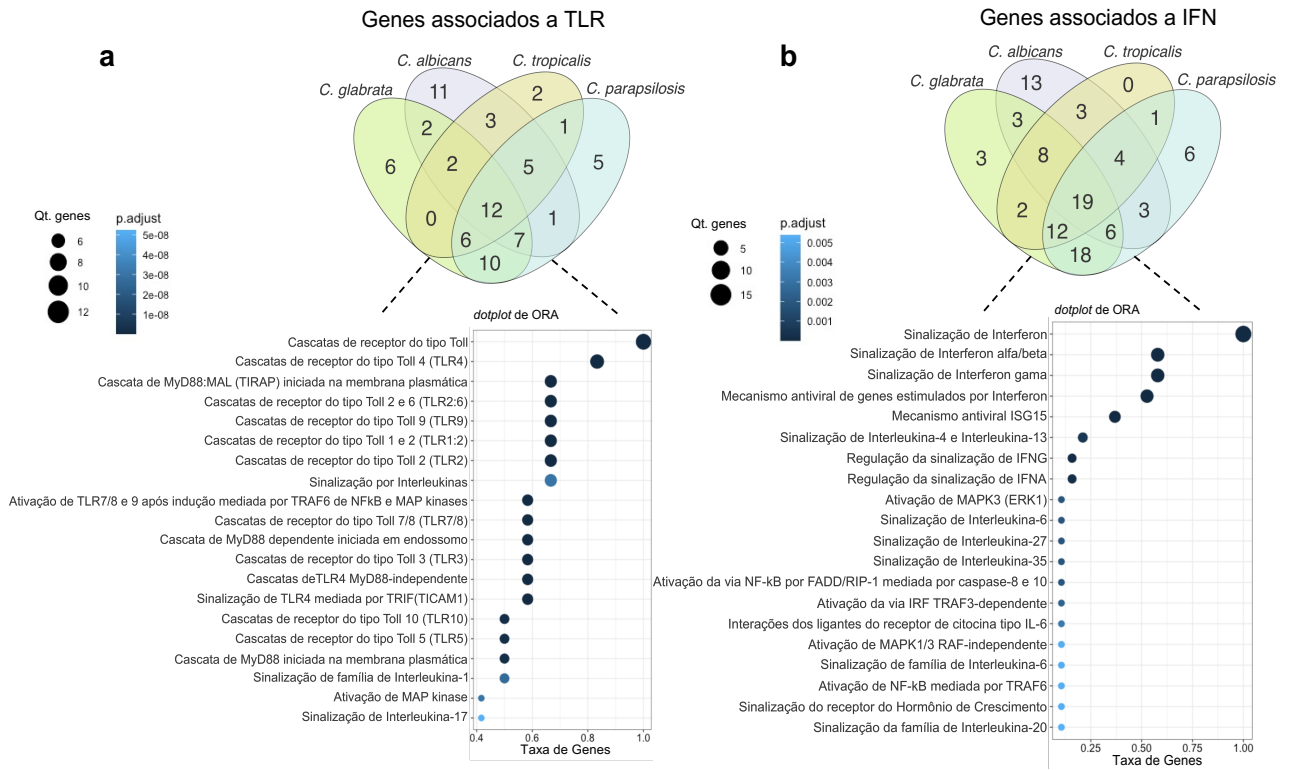




#### 4.5 Interação entre as vias de sinalização de TLR e IFN é conservada em resposta a espécies de *Candida* não-*albicans*

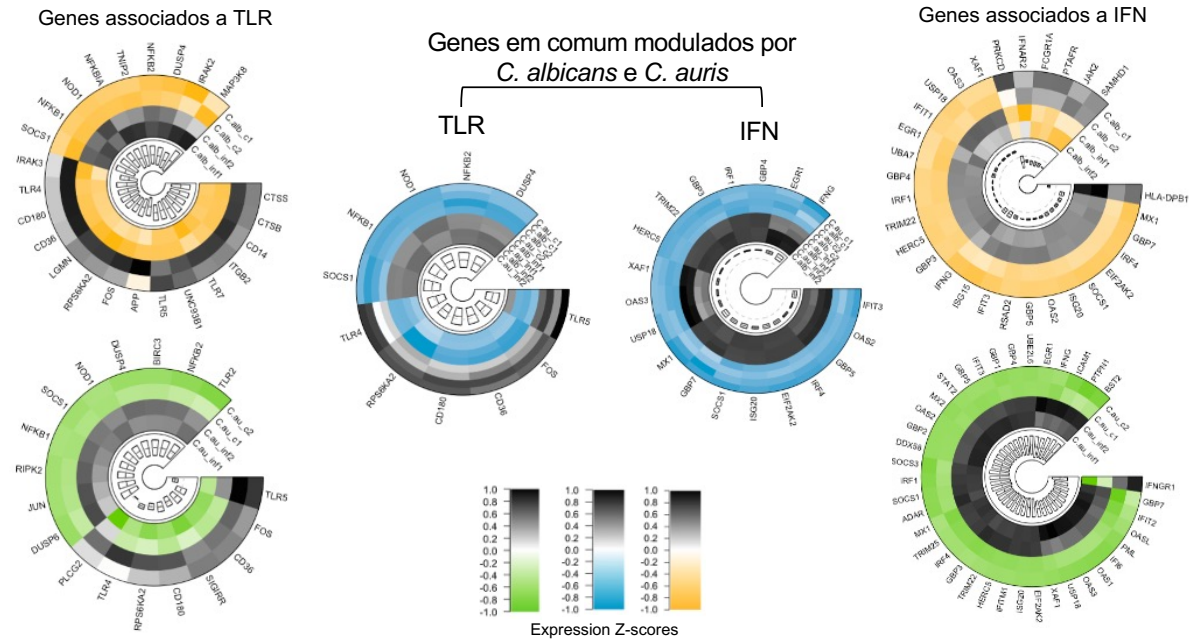
Verificamos se outras espécies de *Candida* não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, bem como a espécie multiresistente *C. auris*, também induziam expressão genes relacionados a TLR e IFN<sup>77</sup>. A partir dos dados públicos GSE114180<sup>78,79</sup>, realizamos análises de interseção que mostraram 12 e 19 DEGs em comum entre as vias de TLR e IFN, genes estes ativados após infecção por diferentes espécies de *Candida*. Tais DEGs estão envolvidos em várias vias relacionadas às vias de sinalização de TLR e IFN (**Figura 9a-b**).

Para determinar se essa interação entre as vias de sinalização de TLR e IFN está também presente na resposta à *C. auris*, exploramos o único *dataset* disponível analisando a resposta imune a *C. auris* e *C. albicans* (GSE154911<sup>77</sup>). *C. albicans* e *C. auris* modularam de forma semelhante os níveis de DEGs envolvidos na sinalização de TLR, incluindo *NFKB1*, *NFKB2*, *JUN* e *DUSP4*, e na sinalização de IFN, como IRFs, GBPs, *SOCS1*, *ISG20*, *TRIM* e *IFIT3* (**Figura 10a**). Em relação à *C. auris*, quando comparamos os DEGs induzidos por esta espécie com os 1096 genes provenientes dos conjuntos de dados induzidos por *C. albicans*, identificamos 237 genes em comum (**Figura 10b**). A análise de enriquecimento desses genes indica que a interação entre as cascatas de sinalização de TLR e IFN é uma característica imunológica consistente em resposta a essas duas espécies de *Candida* (**Figura 10c**).

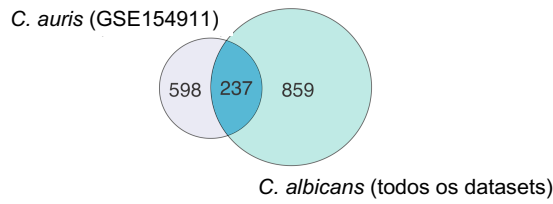


**Figura 9. DEGs em comum associadas a TLR e IFN e respectivas vias enriquecidas após estímulo com outras espécies de *Candida*.** Diagrama de Venn mostrando a sobreposição transcricional entre os DEGs associados a TLR (a) e IFN (b), bem como as vias de sinalização enriquecidas em resposta a espécies de *Candida* não-albicans (*C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) em comparação com *C. albicans*.

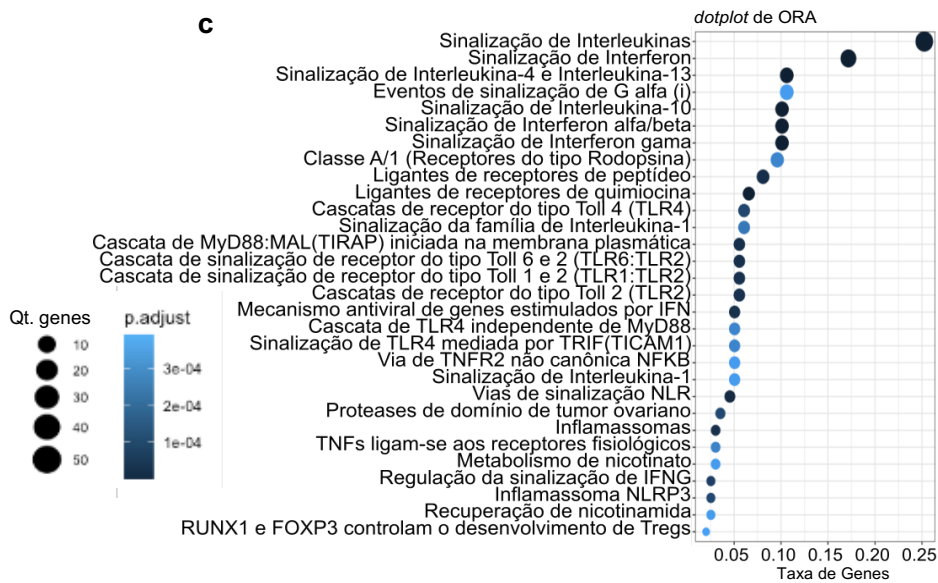
a



b



c



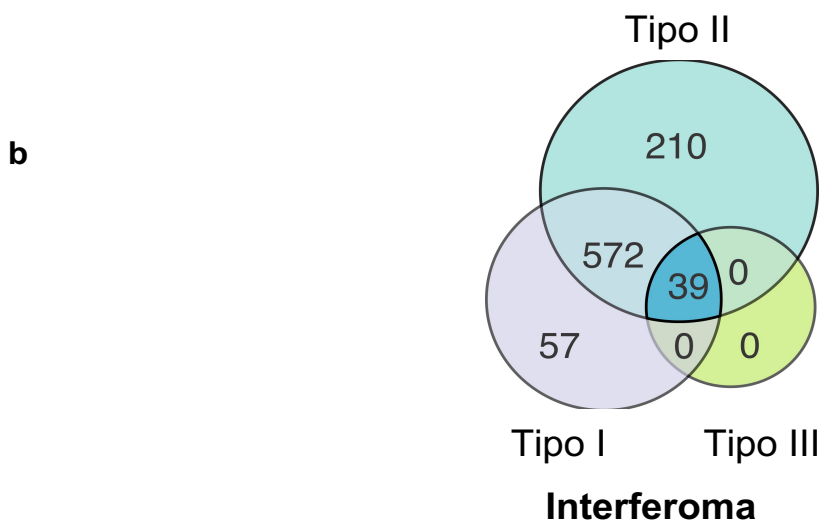
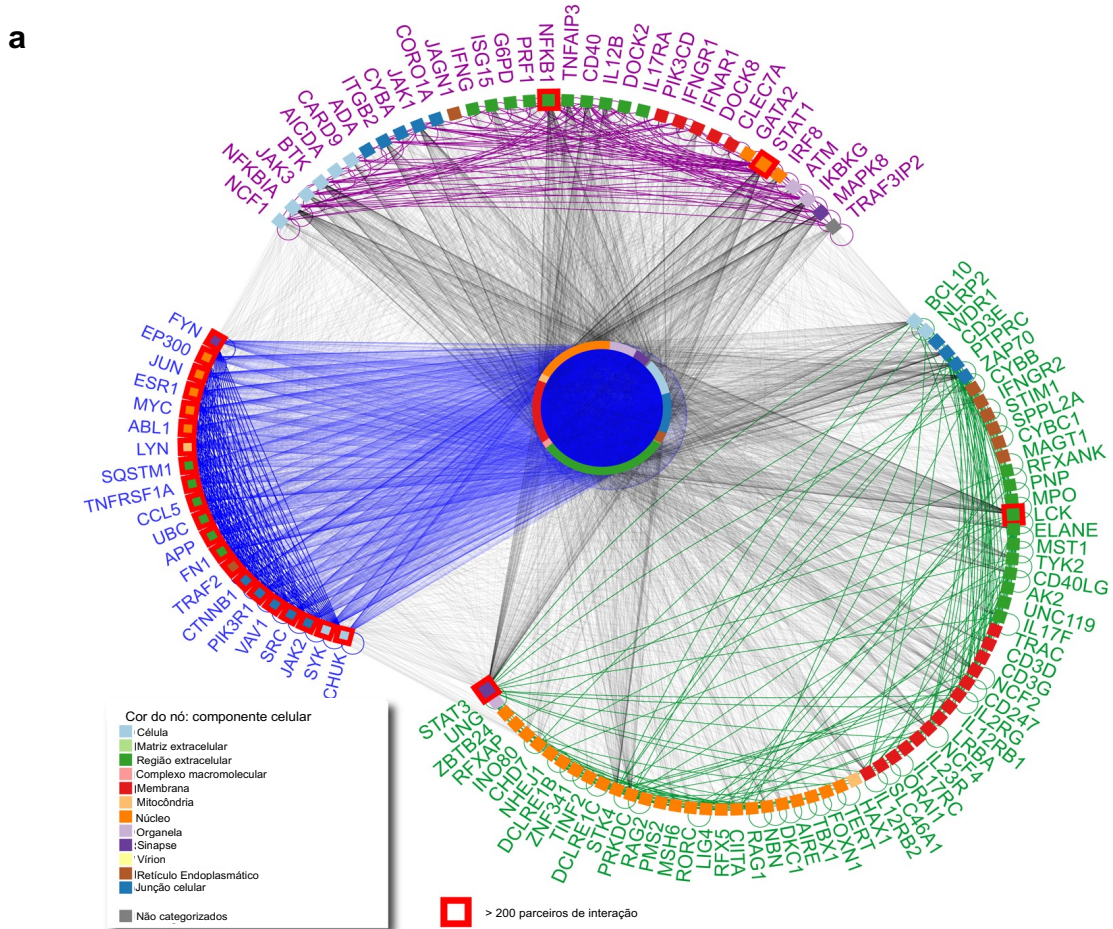
**Figura 10. Padrão de expressão e sobreposição entre DEGs induzidas por *C. albicans* e fungo multiresistente *C. auris*.** **a**, mapas de calor circulares com valores de expressão de DEGs transformados em log2. Compara-se a expressão de DEGs associados às vias de sinalização de TLR (painéis esquerdos) e IFN (painéis direitos) induzidas por *C. albicans* (mapas de calor verde/cinza) ou *C. auris* (mapas de calor amarelo/cinza) todos do *dataset* GSE154911. Pequenos mapas de calor circulares (azul/cinza) demonstram DEGs comuns modulados por *C. albicans* e *C. auris*. **b**, diagrama de Venn mostrando a sobreposição transcricional (uma intersecção contendo 237 DEGs compartilhados) induzida por *C. auris* e *C. albicans*. **c**, *Dotplot* de vias de sinalização enriquecidas pelos 237 DEGs compartilhados.

#### 4.6 Erros inatos de imunidade corroboram a interação entre as cascatas de sinalização de TLR e IFN

Com objetivo de avaliar a relevância clínica dos genes associados a TLR e IFN e vias moleculares consistentemente moduladas por espécies de *Candida* spp., pesquisamos por genes associados a EII relacionados a suscetibilidade humana à candidíase e candidíase mucocutânea, conforme descrito por Tangye e colaboradores<sup>30</sup>. Para esta análise, incluímos apenas mutações, mas não polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*).

De acordo com a literatura, encontrou-se 100 genes cujas variantes atendem ao critério descrito. O **Anexo A** consta a lista destes genes bem como os artigos de referência para tal associação. Tais genes foram, então, comparados com os 1096 genes que enriqueceram os processos biológicos comuns ativados por *C. albicans* e, assim, utilizados para formar uma rede de interação proteína-proteína altamente interconectada (**Figura 11a**). É importante notar que dentro deste conjunto de 1096 DEGs, 34 dos genes levantados na literatura e associados a EII também estão em comum; embora os 66 genes restantes relacionados a EII não tenham sido identificados nos *datasets*, ainda sim encontram-se altamente conectados com os DEGs nesta rede, demonstrando que, mesmo na ausência de interseção, há interações significativas.

Além disso, segundo análises de interferoma, 878 genes dos 1096 já foram descritos associados à sinalização em vias de interferon, principalmente tipo I e II (**Figura 11b**), exibindo a relevância desta via na interação com os genes encontrados.



**Figura 11. Interactoma das vias de sinalização de enriquecimento de DEGs envolvidas na resposta imune anti-*Candida* e sua associação com EII. a,** Relações (linhas) entre os 1096 DEGs (nós) encontrados em todos os estudos. Sub-redes (semicírculos) representam genes com número interação acima de 200 pares entre os 1096 (coloridos em azul), além genes associados com EII causando aumento da suscetibilidade à candidíase, sendo 34 genes de nós roxos compartilhados com o grupo de 1096 DEGs, enquanto os 66 nós verdes representam aqueles não encontrados nos conjuntos de dados de *Candida*. Quadrados e círculos coloridos representam a localização

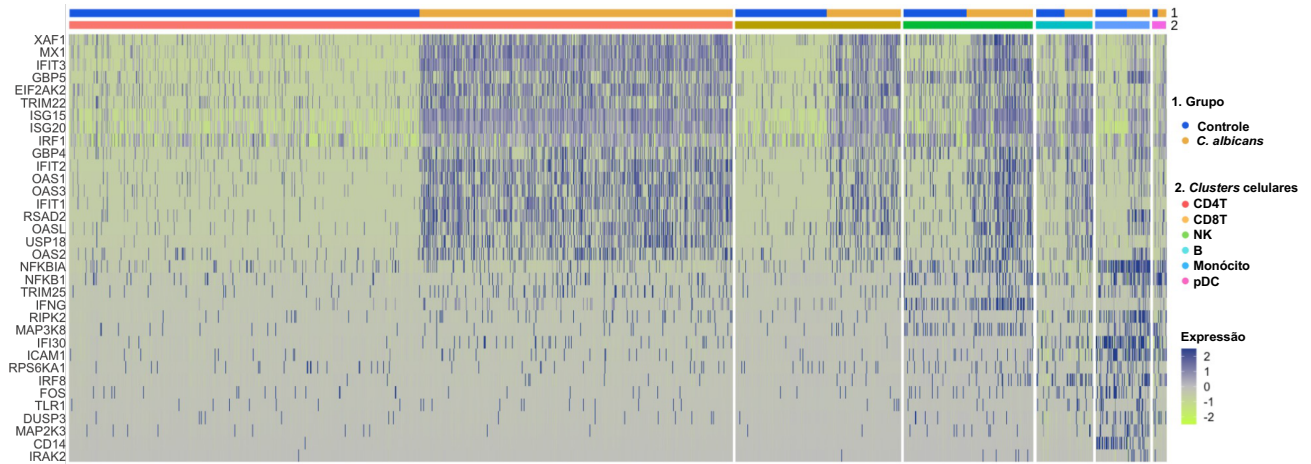
celular dos genes. **b**, Diagrama de Venn de tipos de interferon associados ao grupo de 1096 DEGs. A análise do interferoma revelou 878 genes regulados por IFN modulados tanto pelo IFN tipo I, II e III.

#### **4.7 DEGs associados a vias de sinalização TLR e IFN presentes entre *datasets* de *microarray*, *RNAseq* e sequenciamento de células únicas**

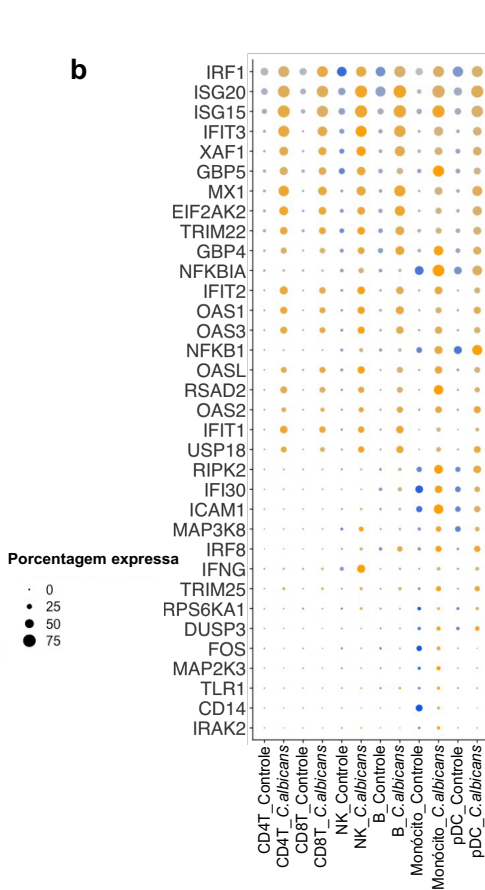
Finalmente, revisitamos os dados de *scRNAseq* e encontramos 11 DEGs associados a TLR e 23 relacionadas a IFN presentes entre os DEGs de WBCs, PBMCs e/ou moDCs identificados por *datasets* de *microarray* e *RNAseq*. Assim, a desregulação gênica associada a TLR e IFN não é uma característica particular de uma população de células leucocitárias específica, pois *C. albicans* ativou essa rede em diferentes células inatas (monócitos, NK e pDCs) e adaptativas (linfócitos CD4 +, CD8 + e CD19 +) identificadas pelo conjunto de dados *scRNAseq*. A **Figura 12a-b** ilustra esses 34 genes presentes nas subpopulações de leucócitos e aqueles que constam nos *datasets* de WBCs, PBMCs e moDCs. Em geral, o agrupamento hierárquico de vias enriquecidas comuns nas subpopulações de células identificadas por *scRNAseq* revelou um padrão similar de regulação positiva de vias de sinalização associadas a TLR e IFN, formando agrupamentos (**Figura 12c**), conforme demonstrado anteriormente por *microarray* e *RNAseq*.



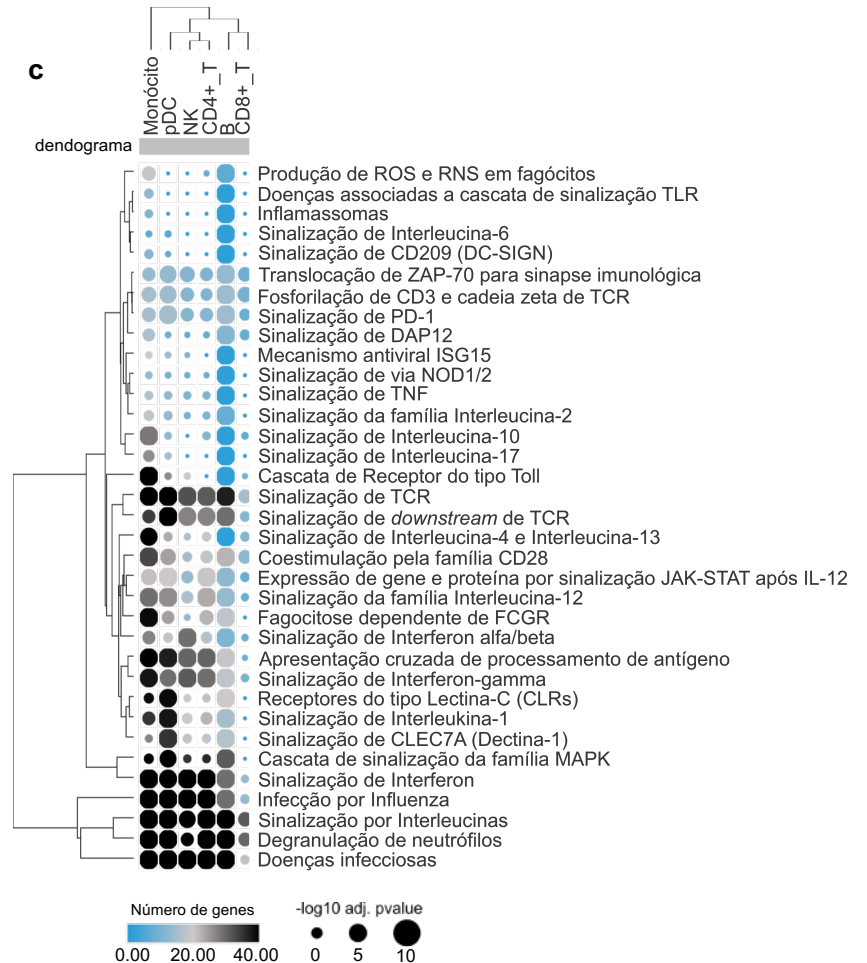
**a**



**b**



**c**



**Figura 12. DEGs associados a vias de sinalização TLR e IFN presentes entre datasets de microarray, RNAseq e scRNAseq. a,** Mapa de calor usando valores de expressão de DEGs oriundos de scRNAseq e também presentes em estudos de microarray e RNAseq; a condição da célula e o grupo são indicados por cores diferentes. **b,** Agrupamento hierárquico de expressão média comparando células controles e infectadas por *C. albicans*. **c,** agrupamento hierárquico mostrando vias comuns selecionadas da Figura 3d entre os grupos de células; o tamanho dos círculos corresponde ao valor de p-ajustado transformado em  $-\log_{10}$ , e a intensidade da cor indica o número de genes em cada via entre os grupos de células.



“If you have committed all things to impacting a life at a time, or impacting a community or society, then welcome to a life of significance.”  
Sunday Adelaja.

**CAPÍTULO 2 – INVESTIGAÇÃO DE PACIENTES COM SUSCETIBILIDADE A  
INFECÇÕES FÚNGICAS SISTÊMICAS.**

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral**

Investigar pacientes brasileiros acometidos por micoses recorrentes de aspecto sistêmico, visando caracterização laboratorial e genética desses pacientes.

### **5.2 Objetivos específicos**

A partir de amostra de sangue venoso periférico coletada de pacientes com suspeita de erros inatos da imunidade e de acordo com a suspeita diagnóstica:

- Avaliar a resposta do Eixo IL-12/IFN- $\gamma$ ;
- Verificar o *burst* oxidativo realizado por fagócitos;
- Investigar variantes patogênicas associadas a susceptibilidade a infecções fúngicas.

## 6 REFERÊNCIAS

1. Pathakumari, B., Liang, G. & Liu, W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **130**, 110550 (2020).
2. JP, L., A, B. & G, C. The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence. *Annu Rev Microbiol* **71**, 99–116 (2017).
3. Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology* **4**, 11–24 (2004).
4. Drummond, R. A., Gaffen, S. L., Hise, A. G. & Brown, G. D. Innate Defense against Fungal Pathogens. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **5**, 1–19 (2015).
5. R, H., JA, W. & GD, B. PAMPs of the Fungal Cell Wall and Mammalian PRRs. *Curr Top Microbiol Immunol* **425**, 187–223 (2020).
6. TC, S. & SC, C. Fungal-derived immune modulating molecules. *Adv Exp Med Biol* **666**, 108–120 (2009).
7. Uribe-Querol, E. & Rosales, C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Frontiers in Immunology* **0**, 1066 (2020).
8. A, S.-M. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* **233**, 6425–6440 (2018).
9. Hardison, S. E. *et al.* Protective Immunity against Pulmonary Cryptococcosis Is Associated with STAT1-Mediated Classical Macrophage Activation. *The Journal of Immunology* **189**, 4060–4068 (2012).
10. Italiani, P. & Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology* **0**, 514 (2014).
11. Urban, C. F. & Nett, J. E. Neutrophil extracellular traps in fungal infection. *Semin Cell Dev Biol* **89**, 47 (2019).
12. V, P. & A, Z. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* **30**, 513–521 (2009).
13. Branzk, N. *et al.* Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* **15**, 1017 (2014).
14. Schmidt, S., Tramsen, L. & Lehrnbecher, T. Natural Killer Cells in Antifungal Immunity. *Frontiers in Immunology* **0**, 1623 (2017).
15. Campbell, K. S. & Hasegawa, J. Natural killer cell biology: An update and future directions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **132**, 536–544 (2013).
16. J, V. *et al.* Human natural killer cells acting as phagocytes against *Candida albicans* and mounting an inflammatory response that modulates neutrophil antifungal activity. *J Infect Dis* **209**, 616–626 (2014).
17. ZG, R.-O. *et al.* A nonredundant role for plasmacytoid dendritic cells in host defense against the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Cell Host Microbe* **9**, 415–424 (2011).
18. Damsker, J. M., Hansen, A. M. & Caspi, R. R. Th1 and Th17 cells: Adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci* **1183**, 211 (2010).
19. A, M. *et al.* Endogenous interleukin 4 is required for development of protective CD4+ T helper type 1 cell responses to *Candida albicans*. *J Exp Med* **187**, 307–317 (1998).
20. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**, 723 (2011).

21. Grahmert, A. *et al.* IL-4 Receptor-Alpha-Dependent Control of *Cryptococcus neoformans* in the Early Phase of Pulmonary Infection. *PLOS ONE* **9**, e87341 (2014).
22. C, S. *et al.* Human TH9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity. *Sci Transl Med* **6**, (2014).
23. A, D. L. *et al.* IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol* **3**, 361–373 (2010).
24. L, R. & P, P. Controlling pathogenic inflammation to fungi. *Expert Rev Anti Infect Ther* **5**, 1007–1017 (2007).
25. P, P. *et al.* CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. *Immunity* **34**, 422–434 (2011).
26. Wüthrich, M., George S. Deepe, Jr. & Klein, B. Adaptive Immunity to Fungi. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074958> **30**, 115–148 (2012).
27. Kim, T.-S. & Shin, E.-C. The activation of bystander CD8+ T cells and their roles in viral infection. *Experimental & Molecular Medicine* **2019 51:12** **51**, 1–9 (2019).
28. Andersen, M. H., Schrama, D., Straten, P. thor & Becker, J. C. Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology* **126**, 32–41 (2006).
29. Kumaresan, P. R., da Silva, T. A. & Kontoyiannis, D. P. Methods of Controlling Invasive Fungal Infections Using CD8+ T Cells. *Frontiers in Immunology* **0**, 1939 (2018).
30. Tangye, S. G. *et al.* Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *Journal of Clinical Immunology* **2020 40:1** **40**, 24–64 (2020).
31. A, B. *et al.* Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *J Clin Immunol* **40**, 66–81 (2020).
32. WT, S. & A, F. The last 80 years in primary immunodeficiency: how far have we come, how far need we go? *J Allergy Clin Immunol* **117**, 748–752 (2006).
33. C, P. *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).
34. Meyts, I. *et al.* Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **138**, 957–969 (2016).
35. Chapel, H. *et al.* Primary Immune Deficiencies – Principles of Care. *Frontiers in Immunology* **0**, 627 (2014).
36. Brazilian Group for Immunodeficiency. Available at [www.bragid.org.br](http://www.bragid.org.br).
37. Rosario-Filho, N. A. *et al.* Pediatric allergy and immunology in Brazil. *Pediatric Allergy and Immunology* **24**, 402–409 (2013).
38. Bougarn, S., Boughorbel, S., Chaussabel, D. & Marr, N. A curated transcriptome dataset collection to investigate inborn errors of immunity. *F1000Res* **8**, (2019).
39. HJF, S. *et al.* Diagnosis and Management of Systemic Endemic Mycoses Causing Pulmonary Disease. *Respiration* **96**, 283–301 (2018).
40. M, R.-S., CM, L., RC, S., BM, T. & S, C. Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clin Dermatol* **30**, 616–627 (2012).
41. A, B., D, V.-G. & AM, P.-O. Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. *J Dtsch Dermatol Ges* **9**, 705–715 (2011).
42. Lanternier, F. *et al.* Primary immunodeficiencies underlying fungal infections. *Curr Opin Pediatr* **25**, 736 (2013).

43. MS, L., MG, N. & SM, H. Mendelian genetics of human susceptibility to fungal infection. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**, (2014).
44. AL, C., A, T., A, R., F, Q.-T. & M, N. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol* **49**, 785–798 (2011).
45. J, S.-O., DE, C.-L. & LA, P.-L. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep* **6**, 23–34 (2012).
46. HH, Y., YH, Y. & BL, C. Chronic Granulomatous Disease: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* **61**, 101–113 (2021).
47. Domingues-Ferreira, M., Levy, A., Barros, N. C., Bertolini, D. L. & Vasconcelos, D. de M. Case report of myeloperoxidase deficiency associated with disseminated paracoccidioidomycosis and peritoneal tuberculosis. *Rev Soc Bras Med Trop* **50**, 568–570 (2017).
48. Gafter-Gvili, A. G6PD deficiency and fungal infections in patients with acute myeloid leukemia: less enzyme more fungus. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1330478> **58**, 2519–2520 (2017).
49. CD, O., BE, M., JN, G. & SM, H. Risk Factors for Disseminated Coccidioidomycosis, United States. *Emerg Infect Dis* **23**, 308–311 (2017).
50. Dd, M.-V. *et al.* Paracoccidioides brasiliensis disseminated disease in a patient with inherited deficiency in the beta1 subunit of the interleukin (IL)-12/IL-23 receptor. *Clin Infect Dis* **41**, (2005).
51. Okada, S., Puel, A., Casanova, J.-L. & Kobayashi, M. Chronic mucocutaneous candidiasis disease associated with inborn errors of IL-17 immunity. *Clinical & Translational Immunology* **5**, e114 (2016).
52. E, C. *et al.* Severe combined immunodeficiency--an update. *Ann N Y Acad Sci* **1356**, 90–106 (2015).
53. JP, L. *et al.* Persistent nodal histoplasmosis in nuclear factor kappa B essential modulator deficiency: Report of a case and review of infection in primary immunodeficiencies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **138**, 903–905 (2016).
54. LF, S. *et al.* Paracoccidioidomycosis Associated With a Heterozygous STAT4 Mutation and Impaired IFN- $\gamma$  Immunity. *J Infect Dis* **216**, 1623–1634 (2017).
55. Drummond, R. A., Franco, L. M. & Lionakis, M. S. Human CARD9: A Critical Molecule of Fungal Immune Surveillance. *Frontiers in Immunology* **0**, 1836 (2018).
56. B, F. *et al.* Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med* **361**, 1760–1767 (2009).
57. Frede, N. *et al.* Genetic Analysis of a Cohort of 275 Patients with Hyper-IgE Syndromes and/or Chronic Mucocutaneous Candidiasis. *Journal of Clinical Immunology* **2021** **34**, 1–35 (2021).
58. A, E. & HD, O. The hyper IgM syndrome--an evolving story. *Pediatr Res* **56**, 519–525 (2004).
59. G, Z. *et al.* NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res* **47**, W234–W241 (2019).
60. Law, C. W., Chen, Y., Shi, W. & Smyth, G. K. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology* **15**, R29 (2014).
61. Stuart, T. *et al.* Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* **177**, 1888–1902.e21 (2019).

62. Russo, P. S. T. *et al.* CEMiTool: A Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses. *BMC Bioinformatics* **19**, 1–13 (2018).
63. Kuleshov, M. v. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research* **44**, W90 (2016).
64. Yu, G., Wang, L. G., Han, Y. & He, Q. Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* **16**, 284–287 (2012).
65. Walter, W., Sánchez-Cabo, F. & Ricote, M. GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics* **31**, 2912–2914 (2015).
66. Wickham, H. Getting Started with ggplot2. 11–31 (2016) doi:10.1007/978-3-319-24277-4\_2.
67. Gu, Z., Eils, R. & Schlesner, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* **32**, 2847–2849 (2016).
68. Khan, A. & Mathelier, A. Intervene: a tool for intersection and visualization of multiple gene or genomic region sets. *BMC Bioinformatics* **18**, (2017).
69. Jendoubi, T. & Strimmer, K. A whitening approach to probabilistic canonical correlation analysis for omics data integration. *BMC Bioinformatics* **20**, (2019).
70. Brown, K. R. *et al.* NAViGaTOR: Network Analysis, Visualization and Graphing Toronto. *Bioinformatics* **25**, 3327–3329 (2009).
71. Pastrello, C., Kotlyar, M. & Jurisica, I. Informed Use of Protein–Protein Interaction Data: A Focus on the Integrated Interactions Database (IID). *Methods in Molecular Biology* **2074**, 125–134 (2020).
72. Kotlyar, M., Pastrello, C., Malik, Z. & Jurisica, I. IID 2018 update: context-specific physical protein–protein interactions in human, model organisms and domesticated species. *Nucleic Acids Research* **47**, D581–D589 (2019).
73. R, D. V., R, B., L, T. & G, P. Multi-study factor analysis. *Biometrics* **75**, 337–346 (2019).
74. Rusinova, I. *et al.* INTERFEROME v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Research* **41**, D1040–D1046 (2013).
75. Vries, D. H. de *et al.* Integrating GWAS with bulk and single-cell RNA-sequencing reveals a role for LY86 in the anti-Candida host response. *PLOS Pathogens* **16**, e1008408 (2020).
76. SP, S. *et al.* Functional genomics identifies type I interferon pathway as central for host defense against *Candida albicans*. *Nat Commun* **4**, (2013).
77. M, B. *et al.* Transcriptional and functional insights into the host immune response against the emerging fungal pathogen *Candida auris*. *Nat Microbiol* **5**, 1516–1531 (2020).
78. P, K. *et al.* Survival Strategies of Pathogenic *Candida* Species in Human Blood Show Independent and Specific Adaptations. *mBio* **11**, 1–21 (2020).
79. Sieber, P. *et al.* Comparative Study on Alternative Splicing in Human Fungal Pathogens Suggests Its Involvement During Host Invasion. *Frontiers in Microbiology* **9**, 2313 (2018).
80. A, D. *et al.* Biomarker-based classification of bacterial and fungal whole-blood infections in a genome-wide expression study. *Front Microbiol* **6**, (2015).
81. Dix, A. *et al.* Specific and Novel microRNAs Are Regulated as Response to Fungal Infection in Human Dendritic Cells. *Frontiers in Microbiology* **0**, 270 (2017).
82. Rizzetto, L. *et al.* Differential IL-17 Production and Mannan Recognition Contribute to Fungal Pathogenicity and Commensalism. *The Journal of Immunology* **184**, 4258–4268 (2010).

83. Rizzetto, L. *et al.* The Modular Nature of Dendritic Cell Responses to Commensal and Pathogenic Fungi. *PLOS ONE* **7**, e42430 (2012).
84. Rickman, J. M., Wang, Y., Rollett, A. D., Harmer, M. P. & Compson, C. Data analytics using canonical correlation analysis and Monte Carlo simulation. *npj Computational Materials* **2017 3:1 3**, 1–6 (2017).
85. Schwarz, M. G. A. *et al.* Mycobacterium tuberculosis and M. bovis BCG Moreau Fumarate Reductase Operons Produce Different Polypeptides That May Be Related to Non-canonical Functions. *Frontiers in Microbiology* **0**, 3511 (2021).
86. Chen, Y. *et al.* Mutation of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Chinese Han children in eastern Fujian. *Medicine* **97**, (2018).
87. U, S. *et al.* Severe glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency leads to susceptibility to infection and absent NETosis. *J Allergy Clin Immunol* **139**, 212-219.e3 (2017).
88. J, W. *et al.* The first case of a class I glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, G6PD Santiago de Cuba (1339 G > A), in a Chinese population as found in a survey for G6PD deficiency in northeastern and central China. *Acta Med Okayama* **64**, 49–54 (2010).
89. Hirschfeld, J., White, P. C., Milward, M. R., Cooper, P. R. & Chapple, I. L. C. Modulation of Neutrophil Extracellular Trap and Reactive Oxygen Species Release by Periodontal Bacteria. *Infection and Immunity* **85**, (2017).
90. CH, R., DE, P. & DB, A. DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Res* **46**, W350–W355 (2018).
91. Geng, C., Xue, L. C., Roel-Touris, J. & Bonvin, A. M. J. J. Finding the  $\Delta\Delta G$  spot: Are predictors of binding affinity changes upon mutations in protein–protein interactions ready for it? *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **9**, e1410 (2019).
92. Qiao, Y. *et al.* Synergistic activation of inflammatory cytokine genes by interferon- $\gamma$ -induced chromatin remodeling and toll-like receptor signaling. *Immunity* **39**, 454–469 (2013).
93. Muñoz, J. F. *et al.* Coordinated host-pathogen transcriptional dynamics revealed using sorted subpopulations and single macrophages infected with *Candida albicans*. *Nature Communications* **10**, (2019).
94. C, B. *et al.* Conventional dendritic cells mount a type I IFN response against *Candida* spp. requiring novel phagosomal TLR7-mediated IFN- $\beta$  signaling. *J Immunol* **186**, 3104–3112 (2011).
95. Donini, M., Zenaro, E., Tamassia, N. & Dusi, S. NADPH oxidase of human dendritic cells: Role in *Candida albicans* killing and regulation by interferons, dectin-1 and CD206. *European Journal of Immunology* **37**, 1194–1203 (2007).
96. Riedelberger, M. *et al.* Type I Interferon Response Dysregulates Host Iron Homeostasis and Enhances *Candida glabrata* Infection. *Cell Host and Microbe* **27**, 454-466.e8 (2020).
97. Patin, E. C. *et al.* IL-27 Induced by Select *Candida* spp. via TLR7/NOD2 Signaling and IFN- $\beta$  Production Inhibits Fungal Clearance . *The Journal of Immunology* **197**, 208–221 (2016).
98. delFresno, C. *et al.* Interferon- $\beta$  Production via Dectin-1-Syk-IRF5 Signaling in Dendritic Cells Is Crucial for Immunity to *C.albicans*. *Immunity* **38**, 1176–1186 (2013).



99. Cardone, M. *et al.* Interleukin-1 and Interferon- $\gamma$  Orchestrate  $\beta$ -Glucan-Activated Human Dendritic Cell Programming via I $\kappa$ B- $\zeta$  Modulation. *PLOS ONE* **9**, e114516 (2014).
100. Biondo, C. *et al.* Recognition of yeast nucleic acids triggers a host-protective type I interferon response. *European Journal of Immunology* **41**, 1969–1979 (2011).
101. Hu, X., Chen, J., Wang, L. & Ivashkiv, L. B. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology* **82**, 237–243 (2007).
102. Bohnenkamp, H. R., Papazisis, K. T., Burchell, J. M. & Taylor-Papadimitriou, J. Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type I responses. *Cellular Immunology* **247**, 72–84 (2007).
103. Mäkelä, S. M., Strengell, M., Pietilä, T. E., Österlund, P. & Julkunen, I. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* **85**, 664–672 (2009).
104. Tong, Y. *et al.* Enhanced TLR-induced NF- $\kappa$ B signaling and type I interferon responses in NLRC5 deficient mice. *Cell Research* **22**, 822–835 (2012).
105. Bosisio, D. *et al.* Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon- $\gamma$ : a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* **99**, 3427–3431 (2002).
106. Schroder, K. *et al.* PU.1 and ICSBP control constitutive and IFN- $\gamma$ -regulated Tlr9 gene expression in mouse macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* **81**, 1577–1590 (2007).
107. Kajita, A. *et al.* Interferon-Gamma Enhances TLR3 Expression and Anti-Viral Activity in Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **135**, 2005–2011 (2015).
108. Mita, Y. *et al.* Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4. *Immunology Letters* **81**, 71–75 (2002).
109. Li, T., Niu, X., Zhang, X., Wang, S. & Liu, Z. Recombinant Human IFN $\alpha$ -2b Response Promotes Vaginal Epithelial Cells Defense against *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology* **0**, 697 (2017).
110. T, L., Z, L., X, Z., X, C. & S, W. Therapeutic effectiveness of type I interferon in vulvovaginal candidiasis. *Microb Pathog* **134**, (2019).
111. Pekmezovic, M. *et al.* *Candida* pathogens induce protective mitochondria-associated type I interferon signalling and a damage-driven response in vaginal epithelial cells. *Nature Microbiology* **2021 6:5 6**, 643–657 (2021).
112. Majer, O. *et al.* Type I Interferons Promote Fatal Immunopathology by Regulating Inflammatory Monocytes and Neutrophils during *Candida* Infections. *PLOS Pathogens* **8**, e1002811 (2012).
113. TJ, B. *et al.* Aberrant type 1 immunity drives susceptibility to mucosal fungal infections. *Science* **371**, (2021).
114. M, S. *et al.* Pathogenic Effects of IFIT2 and Interferon- $\beta$  during Fatal Systemic *Candida albicans* Infection. *mBio* **9**, (2018).
115. S, O. *et al.* Human STAT1 Gain-of-Function Heterozygous Mutations: Chronic Mucocutaneous Candidiasis and Type I Interferonopathy. *J Clin Immunol* **40**, 1065–1081 (2020).

116. JL, C. & L, A. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol* **4**, 55–66 (2004).
117. Casanova, J. L. & Abel, L. Lethal Infectious Diseases as Inborn Errors of Immunity: Toward a Synthesis of the Germ and Genetic Theories. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-031920-101429> **16**, 23–50 (2021).
118. LD, N., R, B., JL, C. & HC, S. Human inborn errors of immunity: An expanding universe. *Sci Immunol* **5**, (2020).
119. Khalilzadeh, S. *et al.* Primary Immunodeficiency in Children: Report of Seven Years Study. *Tanaffos* **10**, 38 (2011).
120. Elsink, K. *et al.* Implementation of Early Next-Generation Sequencing for Inborn Errors of Immunity: A Prospective Observational Cohort Study of Diagnostic Yield and Clinical Implications in Dutch Genome Diagnostic Centers. *Frontiers in Immunology* **12**, 5480 (2021).
121. Tripathi, P., Agarwal, S. & Muthuswamy, S. Prevalence and Genetic Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Anemic Subjects from Uttar Pradesh, India. *Journal of Pediatric Genetics* **8**, 47 (2019).
122. Pereira, L. L. M. D. *et al.* Prevalência da deficiência de G6PD e caracterização molecular dos polimorfismos G202A, A376G e C563T em neonatos no Sudeste do Brasil. *Einstein (São Paulo)* **17**, eAO4436 (2019).
123. Rosa-Borges, A. *et al.* Deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase com infecções de repetição: relato de caso. *Jornal de Pediatria* **77**, 331–336 (2001).
124. SW, A., S, G., VM, L. & MJ, A. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure* **8**, 293–303 (2000).
125. Bogaert, D. J. A. *et al.* Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet* **53**, 575–590 (2016).
126. Yazdani, R. *et al.* Common Variable Immunodeficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Classification, and Management. *J Investig Allergol Clin Immunol* **30**, 14–34 (2020).
127. Rodrigues, M. L. & Nosanchuk, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **14**, (2020).

## ANEXOS

## ANEXO A - Genes descritos associados a suscetibilidade a candidíase

| Genes descritos associados à suscetibilidade a candidíase |                           |                                    |
|---|---------------------------|------------------------------------|
| Lista de genes  | Autores                   | Digital Object Identifier (DOI)    |
| ADA   | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |
| AICDA   | Leven et al. (2016)       | 10.1007/s10875-016-0291-4          |
| ATM   | Schroeder & Zielen (2014) | 10.1002/ppul.22817                 |
| BTK   | Xu et al. (2016)          | 10.21037/jtd.2016.10.12            |
| CARD9   | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |
| CD25  | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |
| CD40  | Marques et al. (2012)     | 10.1016/j.jaci.2011.10.026         |
| CLEC7A  | Ferwerda et al. (2009)    | 10.1056/nejmoa0901053              |
| CORO1A  | Notarangelo (2014)        | 10.1016/b978-0-12-800100-4.00004-0 |
| CYBA  | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |
| DOCK2   | Alosaimi et al. (2019)    | 10.1016/j.jaci.2019.02.020         |
| DOCK8   | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |
| G6PD  | Sanna et al. (2017)       | 10.4084/mjhj.2017.047              |
| GATA2   | Spinner et al. (2014)     | 10.1182/blood-2013-07-515528       |
| IFNG  | Döffinger et al. (2004)   | 10.1086/380453                     |
| IFNGR1  | Bustamante et al. (2014)  | 10.1016/j.smim.2014.09.008         |
| IKBA  | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |
| IL12B   | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |
| IL17RA  | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |
| IL7RA   | Lev et al. (2019)         | 10.3389/fimmu.2019.01672           |
| IRF8  | Bustamante et al. (2014)  | 10.1016/j.smim.2014.09.008         |
| ISG15   | Kalvakolanu et al. (2017) | 10.1016/b978-0-12-801238-3.96116-6 |
| ITGB2   | Parvaneh et al. (2010)    | 10.1007/s10875-010-9433-2          |
| JAGN1   | Khandagale1 et al. (2018) | 10.1002/jlb.4a0118-030rr           |
| JAK1  | Eletto et al. (2016)      | 10.1038/ncomms13992                |
| JAK3  | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |
| MAPK8   | Li et al. (2019)          | 10.1126/sciimmunol.aax7965         |
| NCF1  | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |
| NEMO  | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |
| NFKB1   | Lorenzini et al. (2020)   | 10.1016/j.jaci.2019.11.051         |
| PIK3CD  | Rodriguez et al. (2019)   | 10.1084/jem.20190678               |
| PRF1  | D. Capalbo et al. (2012)  | 10.3275/8055                       |
| STAT1   | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |
| TRAF3IP2  | Bhattad et al. (2019)     | 10.1007/s10875-019-00664-x         |
| CYBB  | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031       |

|         |                                  |                                  |
|---------|----------------------------------|----------------------------------|
| RFXANK  | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |
| RFXAP   | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |
| AIRE    | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |
| AK2     | Hoening et al. (2017)            | 10.1182/blood-2016-11-745638     |
| BCL10   | Tangye & Al-Herz et al. (2020)   | 10.1007/s10875-019-00737-x       |
| CD3D    | Saint-Basile et al. (2004)       | 10.1172/jci22588                 |
| CD3E    | Saint-Basile et al. (2004)       | 10.1172/jci22588                 |
| CD3G    | Lee et al. (2019)                | 10.3389/fimmu.2019.02833         |
| CD3Z    | Christopoulos et al. (2015)      | 10.4049/jimmunol.1402805         |
| CD40LG  | Marques et al. (2012)            | 10.1016/j.jaci.2011.10.026       |
| CHD7    | Wong et al. (2015)               | 10.1038/ejhg.2015.7              |
| CIITA   | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |
| CYBC1   | Arnadottir et al. (2018)         | 10.1038/s41467-018-06964-x       |
| DCLRE1B | Caba, Gug & Gorduja (2020)       | 10.3892/etm.2020.9517            |
| DCLRE1C | Felgentreff et al. (2015)        | 10.1016/j.jaci.2015.03.005       |
| DKC1    | Cossu et al. (2002)              | 10.1046/j.1365-2141.2002.03822.x |
| ELA2    | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |
| EPG5    | Tangye & Al-Herz et al. (2020)   | 10.1007/s10875-019-00737-x       |
| HAX1    | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |
| IFNGR2  | Bandari et al. (2019)            | 10.3389/fimmu.2019.01964         |
| IL12RB1 | de Beaucoudrey et al. (2010)     | 10.1097/md.0b013e3181fdd832      |
| IL17F   | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |
| IL17RC  | Ling et al. (2017)               | 10.1084/jem.20141065             |
| IL2RG   | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |
| INO80   | De La Morena (2016)              | 10.1016/j.jaip.2016.09.013       |
| LCK     | Ballas et al. (1998)             | 10.1172/jci3205                  |
| LIG4    | Boone et al. (2019)              | 10.3389/fped.2018.00426          |
| LRBA    | Gámez-Díaz et al. (2016)         | 10.1016/j.jaci.2015.09.025       |
| MAGT1   | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |
| MPO     | Lehrer & Cline et al. (1969)     | 10.1172/jci106114                |
| MSH6    | De La Morena (2016)              | 10.1016/j.jaip.2016.09.013       |
| MST1    | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |
| NBS1    | De La Morena (2016)              | 10.1016/j.jaip.2016.09.013       |
| NCF2    | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |
| NCF4    | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |
| NHEJ1   | De La Morena (2016)              | 10.1016/j.jaip.2016.09.013       |
| ORAI1   | Feske, Picard & Fischer (2010)   | 10.1016/j.clim.2010.01.011       |
| PMS2    | Tesch et al. (2018)              | 10.3389/fimmu.2018.01506         |
| PNP     | Madkaikar et al. (2011)          | 10.1136/bcr.09.2011.4804         |
| PRKDC   | Mathieu et al. (2015)            | 10.1016/j.jaci.2015.01.040       |
| PTPRC   | Lionakis, Netea & Holland (2014) | 10.1101/cshperspect.a019638      |
| RAG1    | Lanternier et al. (2013)         | 10.1097/mop.0000000000000031     |

|         |   |                                |
|---------|---|--------------------------------|
| RAG2    | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031   |
| RFX5    | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031   |
| RMRP    | Makitie, Pukkala & Kaitila<br>(2001)                              | 10.1136/adc.84.1.65            |
| RORC    | Constantine (2020)  | 10.12688/f1000research.22036.1 |
| SLC37A4 | Lee et al. (2016)   | 10.5223/pghn.2016.19.1.71      |
| SPPL2A  | Bustamante (2020)   | 10.1007/s00439-020-02120-y     |
| STAT3   | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031   |
| STIM1   | Kahlfuss et al. (2020)  | 10.15252/emmm.201911592        |
| STK4    | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031   |
| TBX1    | Graham Davies (2013)  | 10.3389/fimmu.2013.00322       |
| TCRA    | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031   |
| TERT    | Davidson & Connor (1988)  | 10.1136/jmg.25.12.843          |
| TINF2   | Caba, Gug & Gorduza (2020)<br>Lionakis, Netea & Holland<br>(2014) | 10.3892/etm.2020.9517          |
| TYK2    |   | 10.1101/cshperspect.a019638    |
| UNC119  | Lanternier et al. (2013)  | 10.1097/mop.0000000000000031   |
| UNG     | De La Morena (2016)   | 10.1016/j.jaip.2016.09.013     |
| WDR1    | Pfajfer et al. (2018)   | 10.1016/j.jaci.2018.04.023     |
| WHN     | Bosticardo et al. (2019)  | 10.1016/j.ajhg.2019.07.014     |
| ZAP70   | Gavino et al. (2017)  | 10.1016/j.jaci.2017.02.002     |
| ZBTB24  | Nitta et al. (2013)   | 10.1038/jhg.2013.56            |
| ZNF341  | Tangye & Al-Herz et al. (2020)                                    | 10.1007/s10875-019-00737-x     |
| IL12RB2 | Smeeckens et al. (2011)   | 10.1371/journal.pone.0029248   |
| IL23R   | Smeeckens et al. (2011)   | 10.1371/journal.pone.0029249   |





OPEN

# The network interplay of interferon and Toll-like receptor signaling pathways in the anti-*Candida* immune response

Ranieri Coelho Salgado<sup>1,✉</sup>, Dennyson Leandro M. Fonseca<sup>2</sup>, Alexandre H. C. Marques<sup>2</sup>, Sarah Maria da Silva Napoleão<sup>1</sup>, Tábata Takahashi França<sup>1</sup>, Karen Tiemi Akashi<sup>2</sup>, Caroline Aliane de Souza Prado<sup>2</sup>, Gabriela Crispim Baiocchi<sup>2</sup>, Desirée Rodrigues Praça<sup>2</sup>, Gabriel Jansen-Marques<sup>3</sup>, Igor Salerno Filgueiras<sup>1</sup>, Roberta De Vito<sup>4</sup>, Paula Paccielli Freire<sup>1</sup>, Gustavo Cabral de Miranda<sup>1</sup>, Niels Olsen Saraiva Camara<sup>1</sup>, Vera Lúcia Garcia Calich<sup>1</sup>, Hans D. Ochs<sup>5</sup>, Lena F. Schimke<sup>1</sup>, Igor Jurisica<sup>6,7</sup>, Antonio Condino-Neto<sup>1</sup> & Otavio Cabral-Marques<sup>1,2,8,✉</sup>

Fungal infections represent a major global health problem affecting over a billion people that kills more than 1.5 million annually. In this study, we employed an integrative approach to reveal the landscape of the human immune responses to *Candida* spp. through meta-analysis of microarray, bulk, and single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data for the blood transcriptome. We identified across these different studies a consistent interconnected network interplay of signaling molecules involved in both Toll-like receptor (TLR) and interferon (IFN) signaling cascades that is activated in response to different *Candida* species (*C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis*). Among these molecules are several types I IFN, indicating an overlap with antiviral immune responses. scRNA-seq data confirmed that genes commonly identified by the three transcriptomic methods show cell type-specific expression patterns in various innate and adaptive immune cells. These findings shed new light on the anti-*Candida* immune response, providing putative molecular pathways for therapeutic intervention.

Fungal infections, including the emergence of new fungal pathogens highly resistant to antifungal drugs, represent a major global health issue<sup>1–5</sup>. Indeed, fungal infections affect over a billion individuals worldwide and kill more than 1.5 million annually. Among these diseases, invasive candidiasis (IC) is the most common, affecting approximately 250,000 people annually and causing more than 50,000 deaths<sup>6,7</sup>. Overall, an increasing number of patients with malignancies, inborn errors of immunity (IEIs), autoimmune diseases (involving immunosuppressive treatment), and hematopoietic stem cell or organ transplantation is contributing to the high frequency of individuals susceptible to life-threatening fungal pathogens<sup>8,9</sup>. Thus, a better understanding of molecular pathways that can be explored to develop new therapies to reduce the morbidity and mortality caused by *Candida* infections is needed<sup>10,11</sup>.

Linear and mechanistic approaches have elegantly demonstrated that the antifungal immune response involves appropriate recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by different pattern recognition

<sup>1</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. <sup>3</sup>Information Systems, School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>4</sup>Department of Biostatistics and the Data Science Initiative at, Brown University, Providence, RI, USA. <sup>5</sup>Department of Pediatrics, University of Washington School of Medicine, and Seattle Children's Research Institute, Seattle, WA, USA. <sup>6</sup>Osteoarthritis Research Program, Division of Orthopedic Surgery, Schroeder Arthritis Institute, UHN; Data Science Discovery Centre, Krembil Research Institute, UHN; Departments of Medical Biophysics and Computer Science, University of Toronto, Toronto, Canada. <sup>7</sup>Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia. <sup>8</sup>Network of Immunity in Infection, Malignancy, and Autoimmunity (NIIMA), Universal Scientific Education and Research Network (USERN), São Paulo, SP, Brazil. ✉email: ranierics@usp.br; otavio.cmarques@usp.br

# The relationship between cytokine and neutrophil gene network distinguishes SARS-CoV-2-infected patients by sex and age

Paula P. Freire,<sup>1</sup> Alexandre H.C. Marques,<sup>1</sup> Gabriela C. Baiocchi,<sup>1</sup> Lena F. Schimke,<sup>1</sup> Dennyson L.M. Fonseca,<sup>1</sup> Ranieri C. Salgado,<sup>1</sup> Igor S. Filgueiras,<sup>1</sup> Sarah M.S. Napoleao,<sup>1</sup> Desirée R. Praça,<sup>2</sup> Karen T. Akashi,<sup>2</sup> Thiago Dominguez Crespo Hirata,<sup>2</sup> Nadia El Khawanky,<sup>3</sup> Lasse M. Giil,<sup>4</sup> Gustavo Cabral-Miranda,<sup>1</sup> Robson F. Carvalho,<sup>5</sup> Luis Carlos S. Ferreira,<sup>6</sup> Antonio Condino-Neto,<sup>1</sup> Helder I. Nakaya,<sup>2</sup> Igor Jurisica,<sup>7</sup> Hans D. Ochs,<sup>8</sup> Niels Olsen Saraiva Camara,<sup>1</sup> Vera Lúcia G. Calich,<sup>1</sup> and Otavio Cabral-Marques<sup>1,2,9</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, and <sup>2</sup>Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>3</sup>Department of Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany. <sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Haraldsplass Deaconess Hospital, Bergen, Norway. <sup>5</sup>Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo. <sup>6</sup>Vaccine Development Laboratory, Institute of Biomedical Sciences, Department of Microbiology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>7</sup>Krembil Research Institute, University Health Network, and Departments of Medical Biophysics and Computer Science, University of Toronto, Toronto, Canada. <sup>8</sup>Department of Pediatrics, University of Washington School of Medicine, and Seattle Children's Research Institute, Seattle, Washington. <sup>9</sup>Network of Immunity in Infection, Malignancy, and Autoimmunity, Universal Scientific Education and Research Network, São Paulo, Brazil.

The fact that the COVID-19 fatality rate varies by sex and age is poorly understood. Notably, the outcome of SARS-CoV-2 infections mostly depends on the control of cytokine storm and the increasingly recognized pathological role of uncontrolled neutrophil activation. Here, we used an integrative approach with publicly available RNA-Seq data sets of nasopharyngeal swabs and peripheral blood leukocytes from patients with SARS-CoV-2, according to sex and age. Female and young patients infected by SARS-CoV-2 exhibited a larger number of differentially expressed genes (DEGs) compared with male and elderly patients, indicating a stronger immune modulation. Among them, we found an association between upregulated cytokine/chemokine- and downregulated neutrophil-related DEGs. This was correlated with a closer relationship between female and young subjects, while the relationship between male and elderly patients was closer still. The association between these cytokine/chemokines and neutrophil DEGs is marked by a strongly correlated interferome network. Here, female patients exhibited reduced transcriptional levels of key proinflammatory/neutrophil-related genes, such as CXCL8 receptors (*CXCR1* and *CXCR2*), *IL-1 $\beta$* , *S100A9*, *ITGAM*, and *DBNL*, compared with male patients. These genes are well known to be protective against inflammatory damage. Therefore, our work suggests specific immune-regulatory pathways associated with sex and age of patients infected with SARS-CoV-2 and provides a possible association between inverse modulation of cytokine/chemokine and neutrophil transcriptional signatures.

**Authorship note:** PPF and AHCM contributed equally to this work.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Copyright:** © 2021, Freire et al. This is an open access article published under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

**Submitted:** January 7, 2021

**Accepted:** April 7, 2021

**Published:** May 24, 2021

**Reference information:** *JCI Insight*. 2021;6(10):e147535. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.147535>.

## Introduction

More than 15 months after the outbreak of the novel COVID-19 in Wuhan, China (1–3), approximately 122 million confirmed cases of COVID-19 and more than 2.7 million deaths have been reported worldwide (4). The clinical spectrum of COVID-19 ranges from asymptomatic to severe pulmonary disease, leading to acute respiratory distress syndrome (5, 6). Enhanced expression of the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), the SARS-CoV-2 entry receptor (7), and dysregulation of the immune response likely contribute



# CD40L modulates transcriptional signatures of neutrophils in the bone marrow associated with development and trafficking

Tábata Takahashi França,<sup>1</sup> Ashraf Al-Sbiei,<sup>2</sup> Ghada Bashir,<sup>2</sup> Yassir Awad Mohamed,<sup>2</sup> Ranieri Coelho Salgado,<sup>1</sup> Lucila Akune Barreiros,<sup>1</sup> Sarah Maria da Silva Napoleão,<sup>1</sup> Cristina Worm Weber,<sup>3</sup> Janaíra Fernandes Severo Ferreira,<sup>4</sup> Carolina Sanchez Aranda,<sup>5</sup> Carolina Prando,<sup>6,7</sup> Mayra B. de Barros Dorna,<sup>8</sup> Igor Jurisica,<sup>9,10</sup> Maria J. Fernandez-Cabezudo,<sup>11</sup> Hans D. Ochs,<sup>12</sup> Antonio Condino-Neto,<sup>1</sup> Basel K. Al-Ramadi,<sup>2,13</sup> and Otavio Cabral-Marques<sup>1,14,15</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, College of Medicine and Health Sciences, United Arab Emirates (UAE) University, Al Ain, Abu Dhabi, United Arab Emirates. <sup>3</sup>Pediatric Allergy & Immunology Clinic, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>4</sup>Albert Sabin Hospital, Fortaleza, Ceará, Brazil. <sup>5</sup>Division of Allergy, Immunology, and Rheumatology, Department of Pediatrics, Federal University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>6</sup>Faculdades Pequeno Príncipe, Pelé Pequeno Príncipe Research Institute, Curitiba, Paraná, Brazil. <sup>7</sup>Hospital Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brazil.

<sup>8</sup>Division of Allergy and Immunology, Department of Pediatrics, Children's Institute, Hospital das Clínicas, São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>9</sup>Osteoarthritis Research Program, Division of Orthopedic Surgery, Schroeder Arthritis Institute, University Health Network, Krembil Research Institute, University Health Network, Departments of Medical Biophysics and Computer Science, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

<sup>10</sup>Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia. <sup>11</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine and Health Sciences, UAE University, Al Ain, Abu Dhabi, United Arab Emirates.

<sup>12</sup>Department of Pediatrics, University of Washington School of Medicine, and Seattle Children's Research Institute, Seattle, Washington, USA. <sup>13</sup>Zayed Center for Health Sciences, UAE University, Al Ain, Abu Dhabi, United Arab Emirates.

<sup>14</sup>Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>15</sup>Network of Immunity in Infection, Malignancy, and Autoimmunity (NIIMA), Universal Scientific Education and Research Network (USERN), São Paulo, São Paulo, Brazil.

Neutrophils are produced in the BM in a process called granulopoiesis, in which progenitor cells sequentially develop into mature neutrophils. During the developmental process, which is finely regulated by distinct transcription factors, neutrophils acquire the ability to exit the BM, properly distribute throughout the body, and migrate to infection sites. Previous studies have demonstrated that CD40 ligand (CD40L) influences hematopoiesis and granulopoiesis. Here, we investigate the effect of CD40L on neutrophil development and trafficking by performing functional and transcriptome analyses. We found that CD40L signaling plays an essential role in the early stages of neutrophil generation and development in the BM. Moreover, CD40L modulates transcriptional signatures, indicating that this molecule enables neutrophils to traffic throughout the body and to migrate in response to inflammatory signals. Thus, our study provides insights into the complex relationships between CD40L signaling and granulopoiesis, and it suggests a potentially novel and nonredundant role of CD40L signaling in neutrophil development and function.

**Authorship note:** ACN, BKAR, and OCM contributed equally to this work.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Copyright:** © 2021, França et al. This is an open access article published under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

**Reference information:** *JCI Insight*. 2021;6(16):e148652. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.148652>.

## Introduction

Neutrophils are myeloid cells representing the most abundant subset of leukocytes in the human blood (1). They are powerful innate immune effector cells, destroying pathogens by phagocytosis, degranulation, reactive oxygen species (ROS) production, and neutrophil extracellular trap (NET) release (2, 3). In steady-state conditions, approximately  $0.5 \times 10^{11}$  to  $1 \times 10^{11}$  neutrophils are generated daily in



## CD40 Ligand Deficiency in Latin America: Clinical, Immunological, and Genetic Characteristics

Tábata Takahashi França<sup>1</sup> · Lucila Akune Barreiros<sup>1</sup> · Ranieri Coelho Salgado<sup>1</sup> · Sarah Maria da Silva Napoleão<sup>1</sup> · Lillian Nunes Gomes<sup>1</sup> · Janáira Fernandes Severo Ferreira<sup>2</sup> · Carolina Prando<sup>3,4,5</sup> · Cristina Worm Weber<sup>6</sup> · Regina Sumiko Watanabe Di Gesu<sup>7</sup> · Cecília Montenegro<sup>8</sup> · Carolina Sanchez Aranda<sup>9,10</sup> · Gisele Kuntze<sup>3</sup> · Aidé Tamara Staines-Boone<sup>11</sup> · Edna Venegas-Montoya<sup>11</sup> · Juan Carlos Aldave Becerra<sup>12</sup> · Liliana Bezrodnik<sup>13</sup> · Daniela Di Giovanni<sup>13</sup> · Ileana Moreira<sup>13</sup> · Gisela Analia Seminario<sup>13</sup> · Andrea Cecilia Gómez Raccio<sup>13</sup> · Mayra de Barros Dorna<sup>14</sup> · Nelson Augusto Rosário-Filho<sup>15</sup> · Herberto Jose Chong-Neto<sup>15</sup> · Elisa de Carvalho<sup>16</sup> · Milena Baptistella Grotta<sup>17</sup> · Julio Cesar Orellana<sup>18</sup> · Miguel Garcia Dominguez<sup>19</sup> · Oscar Porras<sup>20</sup> · Laura Sasía<sup>21</sup> · Karina Salvucci<sup>21</sup> · Emilio Garip<sup>21</sup> · Luiz Fernando Bacarini Leite<sup>22</sup> · Wilma Carvalho Neves Forte<sup>23</sup> · Fernanda Pinto-Mariz<sup>24</sup> · Ekaterini Goudouris<sup>24</sup> · María Enriqueta Nuñez Nuñez<sup>25</sup> · Magdalena Schelotto<sup>8</sup> · Laura Berrón Ruiz<sup>26</sup> · Diana Inés Liberatore<sup>27</sup> · Hans D. Ochs<sup>28</sup> · Otavio Cabral-Marques<sup>1,29,30</sup> · Antonio Condino-Neto<sup>1,10</sup>

Received: 27 August 2021 / Accepted: 16 November 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

### Abstract

CD40 ligand (CD40L) deficiency is a rare inborn error of immunity presenting with heterogeneous clinical manifestations. While a detailed characterization of patients affected by CD40L deficiency is essential to an accurate diagnosis and management, information about this disorder in Latin American patients is limited. We retrospectively analyzed data from 50 patients collected by the Latin American Society for Immunodeficiencies registry or provided by affiliated physicians to characterize the clinical, laboratory, and molecular features of Latin American patients with CD40L deficiency. The median age at disease onset and diagnosis was 7 months and 17 months, respectively, with a median diagnosis delay of 1 year. Forty-seven patients were genetically characterized revealing 6 novel mutations in the *CD40LG* gene. Pneumonia was the most common first symptom reported (66%). Initial immunoglobulin levels were variable among patients. Pneumonia (86%), upper respiratory tract infections (70%), neutropenia (70%), and gastrointestinal manifestations (60%) were the most prevalent clinical symptoms throughout life. Thirty-five infectious agents were reported, five of which were not previously described in CD40L deficient patients, representing the largest number of pathogens reported to date in a cohort of CD40L deficient patients. The characterization of the largest cohort of Latin American patients with CD40L deficiency adds novel insights to the recognition of this disorder, helping to fulfill unmet needs and gaps in the diagnosis and management of patients with CD40L deficiency.

**Keywords** CD40 ligand · CD40L deficiency · X-HIGM · Inborn error of immunity · Primary immunodeficiency · Latin American Society for Immunodeficiencies registry

### Introduction

CD40 ligand (CD40L) deficiency, also known as X-linked hyper IgM (X-HIGM) syndrome (OMIM#308,230), is a rare inborn error of immunity (IEI) with an estimated incidence of approximately 1/1,000,000 live births [1]. Patients affected by this syndrome present early in life with

✉ Tábata Takahashi França  
 tabata.t.franca@gmail.com

✉ Antonio Condino-Neto  
 antoniocondino@gmail.com

Extended author information available on the last page of the article

## Article

# Severe COVID-19 Shares a Common Neutrophil Activation Signature with Other Acute Inflammatory States

Lena F. Schimke <sup>1,\*</sup>, Alexandre H. C. Marques <sup>1</sup>, Gabriela Crispim Baiocchi <sup>1</sup>, Caroline Aliane de Souza Prado <sup>2</sup>, Dennyson Leandro M. Fonseca <sup>2</sup>, Paula Paccielli Freire <sup>1</sup>, Desirée Rodrigues Plaça <sup>2</sup>, Igor Salerno Filgueiras <sup>1</sup>, Ranieri Coelho Salgado <sup>1</sup>, Gabriel Jansen-Marques <sup>3</sup>, Antonio Edson Rocha Oliveira <sup>2</sup>, Jean Pierre Schatzmann Peron <sup>1</sup>, Gustavo Cabral-Miranda <sup>1</sup>, José Alexandre Marzagão Barbuto <sup>1,4</sup>, Niels Olsen Saraiva Camara <sup>1</sup>, Vera Lúcia Garcia Calich <sup>1</sup>, Hans D. Ochs <sup>5</sup>, Antonio Condino-Neto <sup>1</sup>, Katherine A. Overmyer <sup>6,7</sup>, Joshua J. Coon <sup>6,7,8,9</sup>, Joseph Balnis <sup>10,11</sup>, Ariel Jaitovich <sup>10,11</sup>, Jonas Schulte-Schrepping <sup>12,13</sup>, Thomas Ulas <sup>13,14</sup>, Joachim L. Schultze <sup>12,13,14</sup>, Helder I. Nakaya <sup>2,15,16</sup>, Igor Jurisica <sup>17,18,19</sup> and Otávio Cabral-Marques <sup>1,2,20,\*</sup>



**Citation:** Schimke, L.F.; Marques, A.H.C.; Baiocchi, G.C.; de Souza Prado, C.A.; Fonseca, D.L.M.; Freire, P.P.; Rodrigues Plaça, D.; Salerno Filgueiras, I.; Coelho Salgado, R.; Jansen-Marques, G.; et al. Severe COVID-19 Shares a Common Neutrophil Activation Signature with Other Acute Inflammatory States. *Cells* **2022**, *11*, 847. <https://doi.org/10.3390/cells11050847>

Academic Editor: Isabella Quinti

Received: 10 February 2022

Accepted: 25 February 2022

Published: 1 March 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; marquesufcg@gmail.com (A.H.C.M.); gabrielacbaiocchi@gmail.com (G.C.B.); freirepp2@gmail.com (P.P.F.); igor.filgueiras@usp.br (I.S.F.); ranieri\_twd@hotmail.com (R.C.S.); jeanpierre@usp.br (J.P.S.P.); gcabral.miranda@usp.br (G.C.-M.); jbarbuto@icb.usp.br (J.A.M.B.); niels@icb.usp.br (N.O.S.C.); vcalich@icb.usp.br (V.L.G.C.); antonioccondino@gmail.com (A.C.-N.)
- <sup>2</sup> Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; carolinealianeprado@gmail.com (C.A.d.S.P.); dennyleandro@gmail.com (D.L.M.F.); desiree.placa@gmail.com (D.R.P.); antedrocoi@gmail.com (A.E.R.O.); hnakaya@usp.br (H.I.N.)
- <sup>3</sup> Information Systems, School of Arts, Sciences and Humanities, University of Sao Paulo, São Paulo 03828-000, Brazil; gabrieljansenm2000@gmail.com
- <sup>4</sup> Laboratory of Medical Investigation in Pathogenesis, Targeted Therapy in Onco-Immuno-Hematology (LIM-31), Department of Hematology, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo 05403-000, Brazil
- <sup>5</sup> Department of Pediatrics, Seattle Children's Research Institute, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA 98101, USA; hans.ochs@seattlechildrens.org
- <sup>6</sup> National Center for Quantitative Biology of Complex Systems, Madison, WI 53562, USA; kovermyer@morgridge.org (K.A.O.); jcoon@chem.wisc.edu (J.J.C.)
- <sup>7</sup> Morgridge Institute for Research, Madison, WI 53562, USA
- <sup>8</sup> Department of Biomolecular Chemistry, University of Wisconsin, Madison, WI 53506, USA
- <sup>9</sup> Department of Chemistry, University of Wisconsin, Madison, WI 53506, USA
- <sup>10</sup> Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Albany Medical Center, Albany, NY 12208, USA; balnisj@amc.edu (J.B.); jaitova@amc.edu (A.J.)
- <sup>11</sup> Department of Molecular and Cellular Physiology, Albany Medical College, Albany, NY 12208, USA
- <sup>12</sup> Life and Medical Sciences (LIMES) Institute, University of Bonn, 53115 Bonn, Germany; jschrepping@uni-bonn.de (J.S.-S.); jschultze@uni-bonn.de (J.L.S.)
- <sup>13</sup> Systems Medicine, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), University of Bonn, 53127 Bonn, Germany; thomas.ulas@dzne.de
- <sup>14</sup> German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), PRECISE Platform for Genomics and Epigenomics at DZNE, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany
- <sup>15</sup> Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo 05652-900, Brazil
- <sup>16</sup> Scientific Platform Pasteur, University of São Paulo, São Paulo 05508-020, Brazil
- <sup>17</sup> Osteoarthritis Research Program, Division of Orthopedic Surgery, Schroeder Arthritis Institute and Data Science Discovery Centre for Chronic Diseases, Krembil Research Institute, University Health Network, Toronto, ON M5T 0S8, Canada; juris@ai.utoronto.ca
- <sup>18</sup> Departments of Medical Biophysics and Computer Science, Faculty of Dentistry, University of Toronto, Toronto, ON M5G 1L7, Canada
- <sup>19</sup> Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, 845 10 Bratislava, Slovakia
- <sup>20</sup> Network of Immunity in Infection, Malignancy, Autoimmunity (NIIMA), Universal Scientific Education and Research Network (USERN), São Paulo 05508-000, Brazil
- \* Correspondence: lenaschimke@hotmail.com (L.F.S.); otavio.cmarques@gmail.com (O.C.-M.); Tel.: +55-11-943661555 (L.F.S.); +55-11-974642022 (O.C.-M.)