

Biomarcadores genéticos de la Aspergilosis Invasiva: análisis masivo de polimorfismos en genes del sistema inmune.



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Programa Oficial de Doctorado en Medicina Preventiva y Salud Pública

Carmen Belén Lupiáñez Muñoz

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Carmen Belén Lupiáñez Muñoz
ISBN: 978-84-9163-222-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/46758>

La doctoranda Carmen Belén Lupiáñez Muñoz y los directores de tesis: Dr. Juan Sainz Pérez, Dr. Manuel Jurado Chacón y Dr. José Juan Jiménez Moleón.

Garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 7 de Marzo del 2017

Director/es de la tesis;

Doctoranda;

Fdo: Dr. Juan Sainz Pérez

Fdo: Carmen Belén Lupiáñez Muñoz

Fdo: Dr. Manuel Jurado Chacón

Fdo: Dr. José Juan Jiménez Moleón

A mis padres

No puedo dejar pasar este momento en el que finaliza una etapa que ha marcado mi vida investigadora y personal para deciros desde el corazón: Gracias.

Especialmente:

A mis directores de tesis: Dr Juan Sainz Pérez, Dr Manuel Jurado Chacón Y Dr Juan José Jiménez Moleón, ha sido un privilegio contar con vuestra guía y ayuda.

A Juan Sainz, muy especialmente, por tu implicación, por las muchas horas dedicadas y por tu apoyo. Gracias de corazón por haber confiado en mí desde el primer día, por haberme transmitido tu pasión por la ciencia, tan necesaria en los peores momentos.

A mis padres, a quienes les dedico esta tesis, por ser el pilar fundamental de todo lo que soy. Porque sois los principales promotores de mis sueños, por confiar y creer en mis expectativas cada día. Gracias por cuidarme y quererme, a pesar de ser una protestona sin remedio...

A Ale mi API personal, con esas iniciales imposible no tenerte aquí... Gracias por tu paciencia, por hacerme la vida más fácil, más divertida y por hacerme sentir afortunada de tenerte a mi lado. Y sobre todo gracias por aguantarme a mí, a mis gafones y a mi bata rosa estos últimos meses.

Gracias al resto de mi familia, amigos y a “mis melocotones” que han recorrido junto a mí este camino, a mis hermanos Sonia y Carlos y a sus 3 “pequeñas grandes revoluciones” Carlos, Carmen y Paula, quienes con sus curiosidades, sus preguntas y sus locuras, consiguen que yo olvide la mía propia.

A mis niñas del Licinio con las que comencé esta aventura, y han seguido de cerca la evolución de este trabajo. En Especial a M Carmen y Virgi, por vuestro apoyo incondicional.

A mis compañeros de Genyo: Almudena, Javi, Silvia Carlos, Mariadel, Juan Carlos, Angélica, Victoria, Javi, Antonio, Rosario, Diego, Inma, Patri, Juandi, Alba, Pili, Tamara, Xio, Rosi, Lourdes, Joan, Vero R., Vero A., Manuel, Gabi, Carmen, Lucia, M^a Jose, Nieves, Judit, Marina, Oscar, Suyi, M^a Jose M., Tania, Victor, Carmen, Esmeralda, Luisa, Jorge, Fernando, Miguel Angel, Miki, Mar y a mis genómicos (Luisja, Belén, Antonio, Ana, Alba y Gema). Tengo claro que será difícil volver a tener unos compañeros-amigos como vosotros que sin duda habéis hecho que todo sea más fácil. Especialmente a mi sala de “naranjas güachintonas” con las que ha sido un placer compartir esta última etapa, os voy a echar mucho de menos.

Y por último pero sin duda no menos importante a mi grupo: Juani, Luz, Jose y Emanuela. Quienes son parte de todo el trabajo realizado en este proyecto, y no solo les pertenece un trocito de esta tesis, sino también un trocito de mi corazón. Mil gracias.

Resumen

La Aspergilosis Invasiva (AI) es una infección causada principalmente por *Aspergillus*, un hongo saprófito y filamentoso presente en el ambiente que afecta fundamentalmente a pacientes diagnosticados con leucemia aguda (con tratamiento quimioterápico de altas dosis), pacientes sometidos a trasplante de médula ósea o de órgano sólido y pacientes con terapias inmunomoduladoras. La AI es una infección fúngica extraordinariamente difícil de prevenir y diagnosticar y, aunque suele percibirse como una complicación clínica poco frecuente, estudios recientes (LIFE initiative) han estimado que alrededor de 30 millones de pacientes en el mundo pueden verse afectados por esta infección cada año, de los cuales aproximadamente 300.000 finalmente desarrollarán la infección. Además, es importante destacar que, a pesar de que el manejo de este tipo de pacientes ha mejorado notablemente con el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento y prevención, la mortalidad debido a esta infección sigue siendo aún muy elevada (30-60%). Estudios epidemiológicos recientes han demostrado que el grado de susceptibilidad varía enormemente entre pacientes con idéntica patología de base y similares condiciones clínico-biológicas, lo que sugiere la existencia de una predisposición genética a desarrollar la infección.

Este hecho unido a la dificultad para diagnosticar la AI en sus primeros estadios, nos ha hecho plantearnos la identificación de posibles biomarcadores genéticos asociados con el riesgo a desarrollar esta severa complicación clínica. En esta tesis doctoral nos hemos centrado en el análisis de variantes genéticas localizadas en genes que codifican moléculas involucradas tanto en el reconocimiento del patógeno fúngico como en la modulación de la respuesta inmune frente al hongo. Además, evaluamos el papel funcional de las variantes genéticas consideradas de interés profundizando así en el conocimiento de las bases moleculares que determinan la aparición de la infección.

Consideramos que esta estrategia nos acerca a la implementación a nivel clínico de protocolos profilácticos y terapéuticos más individualizados y adaptados al riesgo de cada paciente que limitarán el empleo generalizado de profilaxis anti-fúngica reduciendo así la toxicidad asociada a este tipo de fármacos.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS..... | 9 |
| INTRODUCCIÓN | 15 |
| 1. Historia | 17 |
| 1.1. Descubrimiento | 17 |
| 1.2. Eventos Relevantes | 17 |
| 2. Descripción micológica..... | 17 |
| 2.1. Clasificación taxonómica | 17 |
| 2.2. Especies de interés | 18 |
| 2.3. Morfología..... | 18 |
| 2.4. Ecología..... | 20 |
| 2.5. Propagación..... | 20 |
| 2.6. Reproducción | 20 |
| 3. Aspergilosis..... | 22 |
| 3.1. Epidemiología | 22 |
| 3.2. Manifestaciones clínicas..... | 23 |
| 3.2.1 Aspergilosis Pulmonares Invasivas | 24 |
| • Traqueobronquitis (TBA)..... | 24 |
| • Aspergilosis Invasiva (AI)..... | 24 |
| • Aspergilosis Necrotizante Crónica | 25 |
| 3.3. Factores de riesgo de la Aspergilosis Invasiva..... | 25 |
| 3.4. Tratamiento de la Aspergilosis Invasiva | 27 |
| 3.4.1. Profilaxis..... | 27 |
| 3.4.2. Tratamiento..... | 28 |
| 3.5. Diagnóstico y técnicas diagnósticas de la Aspergilosis Invasiva | 30 |
| 3.5.1. Diagnóstico de la AI..... | 30 |
| 3.5.2. Técnicas diagnósticas de la AI | 32 |
| • Examen microscópico | 32 |
| • Cultivos para Aspergilosis..... | 32 |
| • Radiología..... | 33 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| • | Detección de anticuerpos | 33 |
| • | Detección del 1-3 β -D-Glucano y del Galactomanano | 33 |
| • | PCR | 35 |
| 4. | Inmunidad de la Aspergilosis Invasiva | 36 |
| 4.1. | Primera línea de defensa del hospedador | 37 |
| 4.2. | Reconocimiento molecular de <i>Aspergillus fumigatus</i> | 39 |
| 4.2.1. | Receptores solubles..... | 40 |
| 4.2.1.1 | Pentaxatrininas | 40 |
| 4.2.1.2 | Sistema complemento | 40 |
| 4.2.1.3 | Colectinas..... | 41 |
| 4.2.1.4 | Ficolinas | 42 |
| 4.2.2. | Receptores de superficie | 42 |
| 4.2.2.1. | Dectina-1 | 42 |
| 4.2.2.2 | Dectina-2..... | 43 |
| 4.2.2.3 | Toll like receptors (TLRs)..... | 43 |
| 4.3. | Respuesta celular..... | 49 |
| 4.3.1 | Macrófagos | 49 |
| 4.3.2 | Células Dendríticas | 49 |
| 4.3.3 | Neutrófilos | 50 |
| 4.3.4 | NK..... | 51 |
| 4.3.5 | Monocitos | 51 |
| 4.3.6 | Plaquetas | 52 |
| 4.4. | Respuesta inmune adaptativa | 52 |
| 5 | Variabilidad genética y polimorfismos | 55 |
| 5.1 | Polimorfismos en citoquinas, quemoquinas y receptores..... | 55 |
| 5.2 | Polimorfismos en receptores de superficie..... | 57 |
| 5.3 | Polimorfismos en receptores solubles | 58 |
| 5.4 | Otros genes..... | 59 |
| | ANEXO PUBLICACIONES..... | 69 |
| | ARTÍCULO PRIMERO..... | 71 |

| | |
|--|------------|
| ARTÍCULO SEGUNDO | 91 |
| ARTÍCULO TERCERO | 117 |
| RESULTADOS | 169 |
| 1. Artículo Primero..... | 171 |
| 1.1. Justificación del diseño y breve descripción de los resultados..... | 171 |
| 1.1.1. Población del estudio y diagnóstico clínico de AI..... | 171 |
| 1.1.2. Metodología empleada | 171 |
| • Detección del antígeno GM..... | 171 |
| • Selección de SNPs y genotipado | 172 |
| • Análisis estadísticos | 172 |
| • Predicción de la funcionalidad de los SNPs de interés..... | 173 |
| • Extracción de RNA, retrotranscripción y qPCR..... | 173 |
| • Análisis de interacción SNP-SNP | 174 |
| 1.2. Resultados | 174 |
| 2. Artículo segundo..... | 175 |
| 2.1 Justificación del diseño y breve descripción de los resultados..... | 175 |
| 2.1.1 Diseño y población de estudio..... | 175 |
| 2.1.2 Metodología empleada | 176 |
| • Aislamiento y diferenciación celular..... | 176 |
| • Ensayos de actividad fungicida | 177 |
| • Ensayos de estimulación de IL12p70 e IFN γ | 177 |
| • Análisis de expresión de RNAm de IL4R e IFN γ | 177 |
| • Análisis de expresión por citometría de flujo de IL4R en linfocitos B y T..... | 178 |
| • Modelo predictivo | 178 |
| 2.2 Resultados | 179 |
| 3. Artículo Tercero..... | 183 |
| 3.1 Justificación del diseño y breve descripción de los resultados..... | 183 |
| 3.1.1. Diseño y población de estudio..... | 183 |
| 3.1.2. Metodología aplicada | 183 |

| | |
|--|------------|
| • Selección de SNPs y genotipado..... | 183 |
| • Análisis estadístico..... | 184 |
| • LD y análisis de haplotipos..... | 184 |
| • Análisis eQTL..... | 184 |
| • Análisis de interacción SNP-SNP..... | 185 |
| 3.2. Resultados..... | 185 |
| 4. Artículo Cuarto..... | 187 |
| 4.1 Justificación del diseño y breve descripción de los resultados..... | 187 |
| 4.1.1 Diseño y población de estudio..... | 187 |
| 4.1.2 Metodología aplicada..... | 187 |
| • Genotipado..... | 187 |
| • Aislamiento y diferenciación celular..... | 189 |
| • Ensayos de actividad fungicida..... | 189 |
| • Ensayos de estimulación <i>in vitro</i> de PBMCs..... | 190 |
| 4.2 Resultados..... | 191 |
| DISCUSIÓN..... | 193 |
| 1. Impacto de los polimorfismos genéticos de la vía Th17 en la predisposición a AI..... | 195 |
| 2. Papel de los polimorfismos genéticos de la vía Th1 y Th2 en la determinación del riesgo a desarrollar AI..... | 198 |
| 3. Implicación de las variantes genéticas de la vía NFκB en la predisposición a AI..... | 201 |
| 4. Impacto de los polimorfismos analizados en el Immunochip® de Illumina sobre el riesgo a desarrollar AI..... | 203 |
| CONCLUSIONES..... | 207 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 211 |

ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AI: Aspergilosis invasiva
- ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero
- AUC: Área bajo la curva (AUC, area under the curve)
- CD: Células dendríticas
- CD: Cluster of differentiation
- cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario (Complementary Deoxyribonucleic Acid)
- CE: Células epiteliales
- CVC: Cross validation consistency
- DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
- Dectina-1: Lectina de la superfamilia del tipo C, también denominada CLEC7A (C-type lectin domain family 7 member A)
- Dectina-2: Lectina de la superfamilia del tipo C, también denominada CLEC6A (C-type lectin domain family 6 member A)
- DHN: Dihidroxinaftaleno
- ECIL: The European Conference on Infections in Leukemia
- EDTA: Ácido etilendiaminotetracético (EDTA, Ethylenediaminetetraacetic Acid)
- EICH: Enfermedad de injerto contra huésped
- EORTC: La organización europea para la investigación y tratamiento contra el cáncer (EORTC, European Organisation for Research and Treatment of Cancer)
- eQTL: Expression quantitative trait loci
- G-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF, Granulocyte colony stimulating factor)
- GM: galactomanano
- GM-CSF: Factor estimulador de colonias de Granulocitos-Macrófagos
- GWAS: Genome Wide Association Study
- IDSA: The Infectious Disease Society of America
- IFI: Infecciones fúngicas invasivas
- IFN: Interferón
- Ig: Inmunoglobulina, siglas seguidas de una letra que indica el tipo
- IKBs: Inhibidores KB
- IKK: IKB quinasa
- IL: Interleuquina, siglas seguidas de un número que indica el tipo, una letra griega que indica el subtipo y “R” en caso de tratarse del receptor de la IL.
- IRF-3: Factor regulador de IFN-3
- IRF-3: Interferon Regulatory Factor 3

- ITS: Internal Transcribed Spacer
- LAL: Leucemia Aguda Linfoide
- LAM: Leucemia Aguda Mieloide
- LBA: Lavado broncoalveolar
- LPS: Lipopolisacárido
- LT- α : Linfotoxina α
- MA: Macrófagos alveolares
- MAPSs: MBL asociadas a proteasas de serina
- MBL: Lectina de unión a manosa (MBL, mannan binding lectins)
- M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos
- MDM: Monocitos derivados de macrófagos
- MDR: Multifactor dimensionality reduction
- MFI: Intensidad media de fluorescencia (MFI, Intensidad media de fluorescencia)
- MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein-1 α
- MIP-1 β : Macrophage inflammatory protein-1 β
- MSG: El grupo de estudio de micosis americano (MSG, the Mycoses Study Group)
- MYD88: Myeloid differentiation primary response gene 88
- NCCN: The National Comprehensive Cancer Network
- NEMO: Modulador esencial NF κ B
- NETS: Trampas extracelulares de neutrófilos, del inglés neutrophil extracellular traps.
- NF κ B: Factor nuclear kappa B (NF κ B, nuclear factor-kappa B)
- NOD2: Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
- PAMPs: Patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs, pathogen associated molecular patterns).
- PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)
- PBS: Solución salina tamponada con fosfato (PBS, phosphate buffered saline)
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Quantitative Polymerase Chain Reaction)
- PHA: Fitohemaglutinina
- PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa
- PMP: Proteínas microbidas de plaquetas
- PRRs: Receptores de superficie reconocedores de patrones (PRRs, Surface pattern recognition receptors)
- PTX3: Pentaxatrina 3
- qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. (qPCR, Quantitative Polymerase Chain Reaction)

- RAGE: Receptores de compuestos de glicosilación avanzada (RAGE, receptor for advanced glycation end products)
- RHA: Receptor de hidrocarburos de arilo
- RII FC γ : Receptor II FC γ
- RLCs: Receptores de lectinas tipo-C
- ROC: Receiver operating characteristic (ROC)
- S100B: Proteínas del grupo S100 que fijan calcio (S100B, S100 calcium-binding protein B)
- SEIMC: Sociedad Española de enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
- SMD: Síndrome mielodisplásico
- TAC: Tomografía axial computerizada
- TACAR: Tomografía axial computerizada de alta resolución
- TASPE: Trasplante autólogo de sangre periférica
- TBA: Traqueobronquitis
- Th1: T helper tipo 1
- Th2: T helper tipo 2
- TIR: Toll/interleukin-1 receptor
- TIRAP: Proteína del adaptador que contiene el dominio del receptor de interleuquina 1 (TIRAP, Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein)
- TLRs: Toll like receptors
- TNFR1: TNF α receptor 1
- TNFR2: TNF α receptor 2
- TNF α : Factor- α de necrosis tumoral (TNF α , Tumor Necrosis factor α)
- TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos
- TPH-Alo: Trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico
- TRAM: Molécula adaptadora de TRIF (TRAM, TRIF-related adapter molecule)
- TRIF: Proteína que contiene el dominio TIR que induce el interferón beta (TRIF, Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing IFN β)
- VEB (Virus Epstein-Barr)
- VNTR: Variable number of tandem repeats
- WT: Wild type

INTRODUCCIÓN

1. Historia

1.1. Descubrimiento

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli, quien marcó el punto de partida de la micología como ciencia con su obra “*Nova plantarum genera*”. La denominación del género se debe a la similitud de la cabeza conidial de este hongo con un aspergillum (instrumento utilizado para dispersar agua bendita)¹.

1.2. Eventos Relevantes

En 1815, Meyer y Emmert realizaron la primera descripción de una patología provocada por *Aspergillus* en el grajo. Pero no fue hasta 1847 cuando Sluyter informó sobre la primera aspergilosis pulmonar humana. Fresenius en 1850 describió la infección en un ave y la denominó Aspergilosis y es Virchow, quien en 1856 reporta cuatro casos de Aspergilosis broncopulmonar humana, realizando un amplio estudio anatomopatológico de la enfermedad así como una detallada descripción microscópica del género.

Desde entonces se han descrito numerosas especies de *Aspergillus* y en la actualidad se reconoce a *Aspergillus fumigatus* (AF) (Figura 1) como la especie que con más frecuencia causa la aspergilosis en pacientes inmunocomprometidos.

Figura1. *Aspergillus fumigatus*



2. Descripción micológica

2.1. Clasificación taxonómica

La mayoría de los hongos patógenos pertenecen al género *Ascomycota*, tanto los hongos levaduriformes como los hongos filamentosos. *Aspergillus*, es un hongo filamentosos, caracterizado por la formación de hifas, que son estructuras

filamentosas formadas por una sucesión de células intercomunicadas que en su conjunto constituyen el micelio². Por lo tanto, *Aspergillus* pertenece al género *Ascomycota*, clase *plectomycetos*, orden *Eurotiales*, familia *Trichocomonaceae*, donde se sitúa junto con otros géneros tan conocidos como *Penicillium*, *Trichoderma*, *Microsporium* y *Coccidioides*.

2.2. Especies de interés

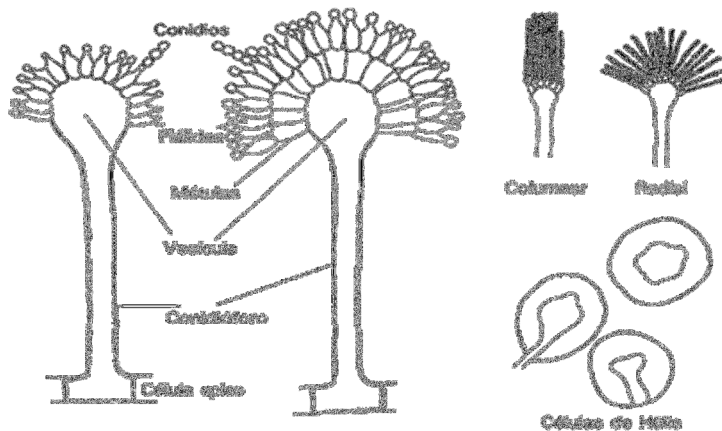
Se conocen unas 900 especies de *Aspergillus*, que Rapper y Fennell clasificaron en 18 grupos^{3,4}. De estas diferentes especies 33 se asocian con enfermedad en el ser humano⁵ y a 20 de ellas se les atribuyen enfermedades oportunistas. Las especies de mayor interés clínico son²: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. Ustus*, *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes*. *AF* es la especie más común aislada en el entorno humano⁶.

La mayoría de las formas invasivas son debidas a *AF* seguido por *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*. Además, como consecuencia del incremento de tratamientos inmunosupresivos y pacientes inmunodeprimidos, el número de especies patógenas identificadas se ha visto incrementado, incluyendo *A. sydowii*, *A. alliaceus*, *A. avenaceus* y *A. calidoustus* entre otros⁷.

2.3. Morfología

Aspergillus es un hongo mitospórico, capaz de producir hifas especializadas llamadas conidióforos (Figura 2). En esta estructura unicelular se diferencian tres partes: vesícula (la parte hinchada en la zona apical), estipe (la zona cilíndrica justo debajo de la vesícula) y célula pie (que une el conidióforo con el micelio).

Figura 2. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus*



(Imagen obtenida de Minter et al. Descriptive terminology of the conidiogenous structures in *Aspergillus* y Klich y Samson. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs)

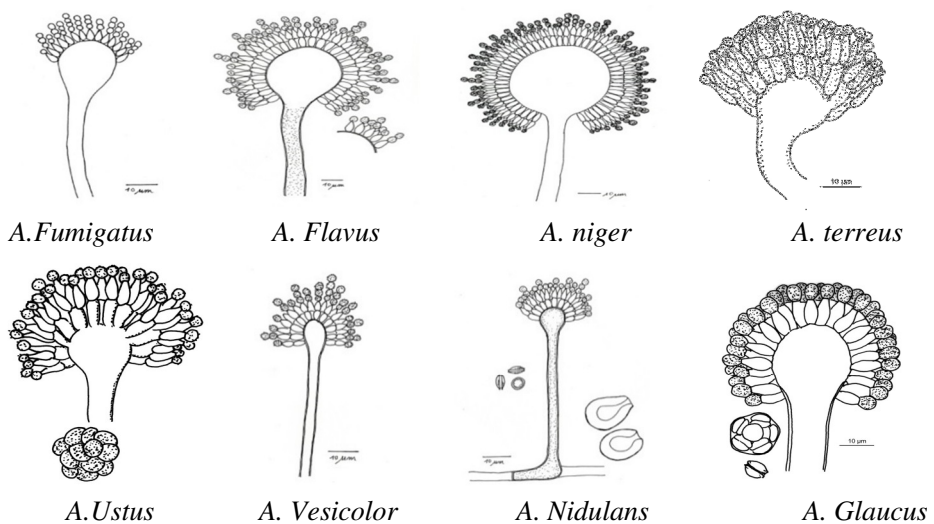
En la vesícula se encuentran las células conidiógenas o fiálides. En ocasiones podremos visualizar otras células entre la vesícula y la fiálide, denominadas métulas. Las cabezas conidiales son biseriadas (cuando presentan fiálides y métulas) o uniseriadas (cuando solo presentan fiálides)⁸. En algunas especies fúngicas encontraremos también las células Hülle, que son estructuras especializadas con paredes gruesas que se disponen de forma terminal o intercalar en la hifa y que presentan formas variadas (globosa, subglobosa, elongada o arremolinada).

Las especies de *Aspergillus* se clasifican basándose en las siguientes características morfológicas del hongo:

- Características macroscópicas
 - Diámetro de las colonias
 - Coloración de la colonias
 - Presencia de esclerocios (agrupaciones de hifas, de consistencia muy dura y función desconocida)
 - Textura de las colonias
- Características microscópicas
 - Tamaño y forma de las cabezas conidiales
 - Morfología de los conidióforos, fiálides y métulas
 - Presencia de células de Hülle y de esclerocios.

A continuación podemos observar las principales características morfológicas de las especies de *Aspergillus* que afectan a la especie humana⁹ (Figura 3)

Figura 3



(Imágenes obtenidas de la web plantasyhongos.es)

En la actualidad, esta clasificación basada en características fenotípicas se ha completado con el uso de técnicas moleculares, centradas principalmente en la amplificación de regiones *Internal Transcribed Spacer* (ITS) incrementado así el número de especies y subespecies conocidas.

2.4. Ecología

Aspergillus es un hongo saprófito cosmopolita, que se ha aislado prácticamente en cualquier tipo de sustrato, especialmente del suelo y materia orgánica en descomposición. Es un hongo termófilo capaz de crecer en un intervalo de temperaturas de 12 a 50°C y en atmósferas con un 100% de Nitrógeno o atmósferas capnófilas *in vitro* (10% de CO₂). Requiere una alta demanda de carbono debido a su proceso respiratorio y suele obtenerlo de fuentes como la celulosa o el azúcar. Por esa razón, el nicho ecológico principal de *Aspergillus* es la materia orgánica en descomposición^{10,11}.

2.5. Propagación

Aspergillus libera grandes cantidades de esporas (conidios) en el aire y, debido a su pequeño tamaño, a la rugosidad superficial y a su alta viabilidad en ambientes secos, dichas esporas permanecen en el aire durante periodos prolongados, con una velocidad de sedimentación de 0.03 cm/s (aproximadamente 1m/h)¹². Por esa razón, las esporas pueden encontrarse con facilidad en el aire, depositándose gradualmente y contaminando todo a su paso. Las concentraciones medias de esporas en el aire varían entre unos estudios y otros de 0.2 a 15.0 esporas por metro cúbico¹³⁻¹⁵. En cambio en lugares húmedos, las esporas germinan dando lugar al crecimiento del micelio y la posterior esporulación de sus conidióforos, produciendo una media de 50.000 conidios.

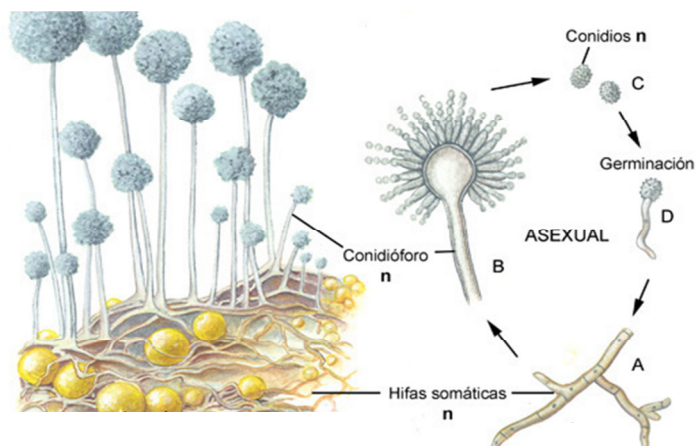
2.6. Reproducción

La reproducción asexual es la forma de reproducción más conocida del género *Aspergillus* (Figura 4) y se lleva a cabo por conidios o esporas asexuales producidas por grupos de fiálides localizados en un ensanchamiento o vesícula terminal del conidióforo.

Los conidióforos se originan a partir de la ramificación de una célula hifal y forman una cabeza bulbosa o vesicular donde se localizan las fiálides, las cuales originan los conidios y pueden estar sostenidas por una capa de células denominadas métulas (vesícula uniseriada o biseriada). Los conidios se forman dentro del ápice de las fiálides donde un núcleo se queda aislado por la aparición de un septo, el protoplasma segrega una pared y se forma un conidio. La estructura restante constituye un segundo conidio que se forma por debajo empujando hacia fuera a la espora anterior y finalmente se forma una cadena de esporas o conidios. Las esporas

asexuales o conidios se desprenden de la hifa, y cuando germinan se convierten en un individuo idéntico al parental.

Figura 4. Reproducción asexual de *Aspergillus*



(Imagen obtenida de Miguel Ulloa. "El reino de los hongos" de Miguel Ulloa).

Aspergillus ha sido considerado tradicionalmente como un organismo asexual. Sin embargo, en los últimos años, ha tenido lugar el descubrimiento de evidencias que llevaban a sugerir la existencia de un ciclo sexual. Entre ellas destacamos la expresión de genes de tipo sexual (MAT1-1 y MAT1-2), un gen que codifica para un precursor de una feromona y sus receptores durante el cultivo de sus cepas en el laboratorio^{16,17}. No obstante, la demostración definitiva de su reproducción sexual lo constituyó el descubrimiento de una fase sexual para esta especie anamorfa, a la cual se ha denominado *Neosartorya fumigata* que reproducida en el laboratorio por O'Gorman y colaboradores en 2009¹⁸. Este ciclo sexual parece requerir un tiempo prolongado (6 meses) y, además, solo se observó la producción de cleistotecios en los cruces realizados en agar harina de avena e incubados a 30°C en condiciones de oscuridad.

La reproducción sexual produce la forma pleomórfica, originada por dos hifas de sexo diferente, que producirán las ascas, que contienen ascosporas. Tanto las ascas, como las ascosporas se encuentran contenidas en un cuerpo denominado cleistotecio o peritecio (denominado así, debido a que puede tener forma de pera). Las esporas sexuales fusionan núcleos e intercambian material genético de tal manera que la célula hija tendrá características de ambas cepas parentales¹⁹

3. Aspergilosis

La aspergilosis es una infección oportunista que básicamente se adquiere por inhalación de los conidios del hongo. Los agentes del género *Aspergillus* son hongos de distribución universal, por lo que la inhalación de conidios será un fenómeno habitual. Las esporas o conidios que se encuentran diseminadas por el aire por lo que el hongo suele asentarse fundamentalmente en los senos paranasales y los pulmones. El concepto aspergilosis incluye un amplio rango de infecciones con muy diferentes manifestaciones clínicas que van desde la aspergilosis broncopulmonar alérgica hasta la aspergilosis diseminada²⁰. En individuos inmunocompetentes, la aspergilosis puede actuar como una potente reacción alérgica mientras que, en individuos inmunocomprometidos, la enfermedad suele ser invasiva, diseminada, grave y en muchas ocasiones fatal. La relevancia clínica de la aspergilosis ha incrementado de manera significativa en las últimas décadas debido al aumento de pacientes inmunodeprimidos, incluyendo pacientes de VIH, trasplantados, pacientes con tumores hematológicos o sólidos e incluso pacientes tratados con fármacos inmunomoduladores²¹⁻²⁴.

3.1. Epidemiología

Las características de las infecciones fúngicas invasivas en pacientes oncohematológicos están en continua evolución. En los años ochenta la candidiasis invasiva era la micosis más prevalente. La generalización del uso del fluconazol profiláctico a principios de los noventa dio lugar a un espectacular descenso de las infecciones fúngicas invasivas (IFI) por levaduras. Sin embargo, las IFI por hongos filamentosos en general, y la Aspergilosis invasiva (AI) en particular, siguieron siendo un importante problema médico.

La AI es una infección nosocomial grave que sucede casi exclusivamente en pacientes inmunodeprimidos y su incidencia depende de diversos factores (enfermedad de base, tratamiento oncológico y profilaxis antimicrobiana) por lo que oscila entre un 5-15%^{25,26}. La mayoría de los enfermos con AI son: pacientes con leucemia mieloblástica aguda y linfoma (~29%), receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos (~25% en el trasplante alogénico (TPH-Alo), pacientes sometidos a trasplante autólogo (~7%), pacientes de trasplante de pulmón (~10%), pacientes de trasplante de otros órganos sólidos (~10%), pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA, ~8%) y pacientes críticos ingresados en unidades de cuidados intensivos (< 0.5%)²⁷⁻³⁰.

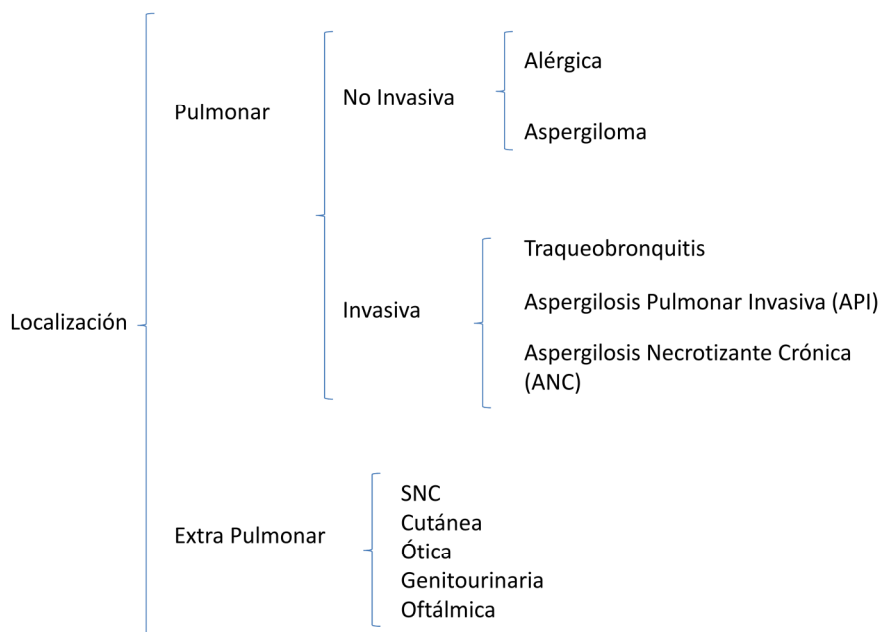
La AI es la mayor causa de morbilidad y mortalidad producida por hongos filamentosos ubicuos en pacientes inmunocomprometidos³¹. A pesar de la notable mejora de tanto su diagnóstico como su tratamiento en los últimos años, la AI sigue siendo una infección con difícil solución y se encuentra asociada a un rango de

mortalidad que oscila entre el 40 y 90%^{20,32,33}. La AI alcanza una especial gravedad en pacientes con neoplasias hematológicas y particularmente en los pacientes que son sometidos a TPH-Alo^{24,34}, donde alcanza una mortalidad de entre el 70 y el 90%^{35,36}. La mortalidad de AI dependerá de la enfermedad de base y de los órganos afectados siendo aproximadamente del 60% en aspergilosis pulmonar invasora y del 80% o incluso el 90% en la aspergilosis diseminada y cerebral respectivamente. La elevada mortalidad de la AI está condicionada en gran parte por la dificultad de realizar un diagnóstico precoz. Buena prueba de ello lo constituye el estudio realizado en 1.017 autopsias de pacientes con hemopatías malignas del MD Anderson Cancer Center donde más de la mitad de los casos, entre el 50% y el 80% de las aspergilosis confirmadas en la necropsia, no llegaron a sospecharse durante la vida del enfermo^{37,38}.

3.2. Manifestaciones clínicas

Desde el punto de vista clínico, el término aspergilosis incluye una amplia diversidad de cuadros clínicos (Figura 5) que dan lugar a: procesos pulmonares (inmunoalérgicos, saprofitismo y formas invasivas) y procesos extra pulmonares.

Figura 5. Clasificación de los principales cuadros clínicos de *Aspergillus spp.*



En esta tesis nos centraremos en describir las aspergilosis invasivas que son las más frecuentes en pacientes onco-hematológicos.

3.2.1 Aspergilosis Pulmonares Invasivas

- Traqueobronquitis (TBA)

La TBA constituye la forma clínica más frecuente en pacientes con trasplante de pulmón y SIDA. Los síntomas son: tos, disnea y expectoración de moldes mucosos. La radiografía de tórax y tomografía axial computerizada (TAC) pueden ser normales o mostrar engrosamiento de la vía aérea, infiltrados parcheados o nódulos centro lobulares.

Presenta diferentes grados de invasión de la mucosa y estructuras contiguas. El espectro clínico de la TBA se puede dividir en cinco clases: colonización, bronquitis, TBA obstructiva (se asocia con la producción de tapones mucosos debido al crecimiento de las hifas en la vía aérea), TBA pseudomembranosa (se caracteriza por una extensa inflamación e invasión del árbol traqueobronquial) y TBA ulcerativa (desarrolla una infección focal de la mucosa traqueobronquial y/o cartílago por hifas).

La TBA puede progresar a AI o puede diseminarse más allá del tracto respiratorio afectando a otros órganos por invasión de vasos sanguíneos sin afección pulmonar.

- Aspergilosis Invasiva (AI)

La forma clínica más frecuente de la aspergilosis invasiva es a nivel pulmonar y en los senos paranasales.

La aspergilosis pulmonar puede cursar con una sintomatología inespecífica (fiebre, tos productiva, dolor pleurítico y hemoptisis) por lo que cualquier paciente con factores de riesgo tales como neutropenia, déficits cualitativos en la función fagocítica y defectos en la inmunidad celular³⁹, junto a la presencia de nódulos o infiltrados pulmonares, pueden hacer sospechar de la existencia de una aspergilosis pulmonar. La radiografía de tórax, no es específica pero el TAC puede mostrar lesiones focales características. La aspergilosis pulmonar suele presentar uno o múltiples nódulos, con o sin cavitación, con consolidación segmentaria o infiltrado peribronquial o derrame pleural. El signo del halo, aunque no es patognomónico, es un hallazgo temprano de AI, y consiste en un macronódulo rodeado por una zona de opacidad que se traduce fisiopatológicamente como infarto y necrosis coagulativa producida por angioinvasión rodeada de hemorragia alveolar. También puede encontrarse más tardíamente el signo de aire creciente, el cual se presenta como una zona curviforme y radiotransparente que rodea la porción superior de la masa como una media luna de aire. Al igual que las manifestaciones clínicas, los hallazgos radiológicos dependen también de las características del huésped.

La infección puede diseminarse vía hematógica hacia el cerebro (sitio más frecuente) produciendo convulsiones, infartos cerebrales, hemorragia intracraneal, meningitis y abscesos epidurales. Además, puede diseminarse hacia la piel, el riñón, la pleura, el corazón, el esófago o el hígado aunque con menos frecuencia.

- Aspergilosis Necrotizante Crónica

La aspergilosis necrotizante crónica es un proceso infeccioso cavitario del parénquima pulmonar secundario a la invasión local de *Aspergillus* y se conoce también como aspergilosis pulmonar subaguda. Se presenta en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas y/o compromiso inmunitario leve o moderado, por lo que es bastante característico que presenten en suero precipitinas positivas frente a *Aspergillus spp.* Los principales síntomas de este tipo de aspergilosis son la fiebre, la pérdida de peso, la fatiga, la tos productiva y la hemoptisis aunque, ocasionalmente, puede ser asintomática. En la radiografía de tórax se aprecia una consolidación de los lóbulos superiores y engrosamiento pleural con cavitación. La aspergilosis necrotizante crónica tiene una progresión más lenta que AI que va de semanas hasta meses y es inusual la angioinvasión o la diseminación hacia otros órganos.

3.3. Factores de riesgo de la Aspergilosis Invasiva

Los pacientes con mayor riesgo a desarrollar una IFI suelen ser los pacientes inmunodeprimidos por tratamientos quimioterápicos de altas dosis, pacientes que reciben TPH-alo o de órgano sólido, pacientes que reciben altas y prolongadas dosis de corticoides o inmunosupresores, pacientes con SIDA en situación avanzada y sin tratamiento antirretroviral y los intervenidos de cirugía mayor gastrointestinal o incluso aquellos que presentan enfermedades inflamatorias crónicas autoinmunes con tratamientos biológicos (anti-TNF, anti-CD20, etc...). Además, las IFIs suelen afectar a los niños prematuros y pacientes de edad avanzada^{20,40,41}

En un reciente estudio multicéntrico que incluía 23 hospitales se observó que la distribución de las IFI causadas por *Aspergillus spp* se ve influenciada por el tipo de unidad de hospitalización y la enfermedad de base de los pacientes (Tabla 1). Este estudio mostró que las infecciones más frecuentes por *Aspergillus spp* se produjeron en unidades de hematología (33,8%) y unidades de trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) (50,7%)⁴².

Tabla 1: Distribución de de las infecciones por *Aspergillus spp* según la unidad de hospitalización o las condiciones previas del paciente.

| Patógeno | % según la unidad de hospitalización o enfermedad de base | | | | | | | | Total |
|--------------------|---|---------|-------|-------|---------|-------|----------|---------|---------|
| | Med G | Hema | TPH | VIH | UCI Neo | TOS | Neoplas | Cirugía | |
| | (3,640) | (1,010) | (377) | (263) | (54) | (886) | ia (863) | (1,906) | (6,031) |
| <i>Aspergillus</i> | 8,3 | 33,8 | 50,7 | 4,9 | 1,9 | 26 | 4,9 | 3,4 | 12,3 |

Med G: medicina general, **Hema:** hematología, **TPH:** receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos, **VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana, **UCI Neo:** unidad de cuidado intensivos neonatales, **TOS:** trasplante de órgano sólido. (Adaptado de J.Pemán, M.Salavert/ Enferm Infecc Microbiol clin.)

Así pues, los pacientes con neoplasias hematológicas constituyen uno de los principales grupos riesgo para el desarrollo de Aspergilosis. Este grupo de pacientes presentan con frecuencia factores de alto riesgo para desarrollar aspergilosis (Tabla 2). Además, los pacientes con previos episodios de infección por *Aspergillus* tienen incrementado el riesgo de recurrir en una AI durante un posterior episodio de neutropenia o inmunosupresión⁴³. Esta observación implica que existe un defecto en los mecanismos efectores del sistema inmune innato y adaptativo y que son el mayor factor que predispone a padecer AI⁴³⁻⁴⁸. En los últimos años se han identificado nuevos factores de riesgo relacionados con la comorbilidad, el tratamiento inmunosupresor, el grado de contaminación ambiental y cierta predisposición genética. Con respecto a esta última, se han puesto de manifiesto la importancia de diferentes polimorfismos genéticos en genes como el Mannose binding lectin (MBL), los Toll-like receptor (TLR), la dectina-1, el plasminógeno, la interleuquina-10 (IL-10) y el surfactante pulmonar entre otros⁴⁹⁻⁵².

Los genes que participan en la respuesta inmunitaria del huésped frente a las infecciones fúngicas son múltiples y afectan a diferentes niveles de acción⁵³. La mayoría de los genes identificados corresponden a proteínas básicas para la formación de citoquinas. Por ello, muchas de las variantes genéticas descritas se han asociado con un aumento del riesgo a padecer Aspergilosis invasiva en determinados tipos de pacientes (oncohematológicos, trasplantados con progenitores hematopoyéticos). Estas variaciones genéticas consistirán en polimorfismos de un solo nucleótido de genes ya conocidos, habiendo llegado a determinar en algunas de ellas el cambio de aminoácidos subyacente y el mecanismo más probable.

Tabla 2. Factores de riesgo para el desarrollo de Aspergilosis.

Edad > 40 años
Mal estado general (ECOG/OMS)
Neutropenia profunda (RAN < 500) y duradera (> 12 días)
LMA con uso de altas dosis de ara-C
Linfocitopenía (CD4+ < 200)
TPH- Alo
Donante no emparentado en el TPH-Alo
Mismatch HLA, no idéntico, parcialmente compatible
Depleción de linfocitos T
EICH grados II-IV y tratamiento con inmunosupresores
Trasplante autólogo si CD34 < 2 x 10⁶/kg
Tratamiento con análogos de purinas
Tratamiento con Alemtuzumab (anti-CD52)
Dosis altas de esteroides (> 1 mg/kg/día, > 2 semanas)
Uso de terapias biológicas anti-TNF α (infliximab)
Fallo de injerto

Ara-C: arabinósido de citosina, **EICH:** enfermedad de injerto contra Huésped, **LMA:** leucemia mieloide aguda, **RAN:** recuento absoluto de neutrófilos, **TPH:** trasplante de progenitores hematopoyéticos

3.4. Tratamiento de la Aspergilosis Invasiva

La estrategia frente a la AI en el paciente hematológico incluye la profilaxis (farmacológica y no farmacológica) y el tratamiento anti-fúngico. Este último comprende tres tipos: el tratamiento empírico, el anticipado y el dirigido.

3.4.1. Profilaxis

El principal objetivo de la profilaxis será la prevención de infección por *Aspergillus spp* en pacientes de alto riesgo.

- Profilaxis no farmacológica

La profilaxis no farmacológica se basa en la optimización de medidas encaminadas a prevenir micosis invasoras como una estricta higiene y el control del aire o del “medio ambiente” donde se desenvuelven los pacientes.

- Profilaxis farmacológica

Casi todos los fármacos anti-fúngicos conocidos hasta el momento se han utilizado como terapia profiláctica, y ninguno ha obtenido el suficiente respaldo científico para su uso generalizado. El único anti-fúngico que ha alcanzado un nivel de consenso suficiente es el Fluconazol que suele utilizarse en pacientes trasplantados. Sin embargo, este tratamiento presenta inconvenientes ya que no es efectivo frente a hongos del género *Aspergillus*.

La profilaxis de IFI se lleva a cabo con polienos, candinas y triazoles de amplio espectro. La anfotericina B liposomal intravenosa e inhalada ha demostrado utilidad en la prevención de AI pero en los estudios publicados hasta el momento no hay

evidencias suficientes como para considerarlo el fármaco de elección en profilaxis primaria⁵⁴⁻⁵⁷. En cuanto a las candidiasis, tampoco existen evidencias suficientes para su uso sistemático como profilaxis de AI en enfermos hematológicos⁵⁸. En cambio el itraconazol ha mostrado ser eficaz en la prevención de AI, pero debido a sus reacciones adversas, principalmente gastrointestinales, su uso es limitado^{59,60}. Otro triazol de amplio espectro es el voriconazol, el cual ha demostrado ser eficaz en la prevención de AI en pacientes con TPH-Alo. La posibilidad de administrar el fármaco vía intravenosa así como su buena disponibilidad oral, lo convierten en un fármaco con un gran interés en la prevención de AI en el paciente hematológico⁶¹. No obstante, la llegada del posaconazol ha supuesto un paso más en la prevención profiláctica de AI. Este fármaco ha demostrado una alta eficacia y un excelente perfil de seguridad en el tratamiento profiláctico de pacientes hematológicos de alto riesgo. La NCNN (the National Comprehensive Cancer Network), IDSA (the Infectious Disease Society of America) y ECIL (the European Conference on Infections in Leukaemia) recomiendan la prevención profiláctica con posaconazol en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (SMD) y en TPH-Alo con enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (Tabla 3)^{32,62,63}. En España, el uso del posaconazol está aprobado para el tratamiento profiláctico de pacientes con leucemias agudas o SMD que reciben tratamiento quimioterápico de inducción o remisión y en pacientes receptores de trasplante en tratamiento con altas dosis de inmunosupresores⁶⁴.

Tabla 3. Antifúngicos con indicación en ficha técnica española

| | |
|---------------------------|---|
| * Fluconazol (oral, i.v.) | En pacientes con cáncer |
| * Itraconazol | Neutropénicos y TPH |
| * Posaconazol | LMA/SMD TPH alogénico con EICH |
| * Micafungina | TPH alogénico o pacientes cuya neutropenia se espera que sea igual o superior a 10 días Profilaxis aprobada para infecciones por <i>Cándida</i> , no para <i>Aspergillus</i> |

EICH: enfermedad de injerto contra huésped, **LMA:** leucemia mieloide aguda, **SMD:** síndrome mielodisplásico, **TPH:** trasplante de progenitores hematopoyéticos

3.4.2. Tratamiento

Este incluye tres estrategias:

- Tratamiento empírico del paciente neutropénico febril:

El tratamiento empírico se aconseja en pacientes hematológicos con riesgo de IFI que presentan fiebre prolongada sin foco aparente, a pesar de contar con tratamiento antibiótico de amplio espectro. Este tratamiento se basa en dos estudios con antibióticos de los años ochenta en los que se redujo la incidencia y mortalidad de IFI^{65,66}.

- Tratamiento anticipado:

Basado en pruebas radiológicas y de laboratorio de diagnóstico precoz. Este tratamiento consiste en administración de anti-fúngicos en pacientes con positividad de galactomanano o presencia de una imagen compatible con IFI. Esta estrategia surgió en el 2005 con la intención de disminuir el número de pacientes que recibían tratamiento empírico.

- Tratamiento dirigido de la AI probada o probable de primera línea:

Este tratamiento consiste en el empleo de anti-fúngicos cuando existen pruebas de infección fúngica invasiva.

Según las guías de recomendación de IDSA, ECIL y SEIMC (Sociedad Española de enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) el principio activo de primera elección para la AI en pacientes hematológicos es el voriconazol debido a que presenta una ratio de respuesta mayor del 50%. De acuerdo a los resultados de estudios recientes⁶⁷⁻⁶⁹, el voriconazol debe ser administrado de forma intravenosa en pacientes con AI durante al menos 7 días pudiendo pasarse a una administración oral tras dicho periodo para permitir un tratamiento prolongado y ambulatorio. Como fármaco de segunda elección, se ha establecido la anfotericina B liposomal ya que también presenta una ratio de respuesta del 50% que la convierte en una buena alternativa terapéutica.

El tratamiento anti-fúngico empírico en los pacientes con neutropenia tiene como objetivo principal mejorar el mal pronóstico de los pacientes con infección fúngica invasora, mediante el tratamiento precoz de la misma. La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas recomienda iniciar el tratamiento anti-fúngico empírico en los pacientes con fiebre después de 5-7 días de tratamiento anti-bacteriano y en los que la resolución de la neutropenia no es inminente. Sin embargo, el tratamiento anti-fúngico empírico no ha demostrado mayor eficacia que el placebo ya que no obtiene mejores resultados que el tratamiento anti-fúngico dirigido y su efectividad es reducida⁷⁰⁻⁷⁴.

Por todas estas razones y considerando la importancia de reducir gastos innecesarios en anti-fúngicos empíricos, algunos centros clínicos consideran como principal estrategia de actuación el tratamiento anticipado. En pacientes neutropénicos con AI diagnosticada y tratada durante al menos 10 días tras la aparición del primer signo clínico y radiológico, la mortalidad era del 90% mientras que descendía a un 40% cuando el tratamiento era instaurado de manera temprana. A pesar de que resulta una buena estrategia terapéutica esta opción también presenta numerosas limitaciones entre las que se incluyen el tiempo en el que el clínico recibe los resultados de las pruebas diagnósticas, la falta de especificidad de

las pruebas diagnósticas de imagen y los problemas de especificidad de la detección del antígeno galactomanano.

3.5. Diagnóstico y técnicas diagnósticas de la Aspergilosis Invasiva

3.5.1. Diagnóstico de la AI

El diagnóstico de la AI es muy complicado debido a la falta de especificidad y sensibilidad de las técnicas diagnósticas utilizadas y al riesgo de contaminación y colonización de las muestras respiratorias, especialmente el esputo. La organización europea para la investigación y tratamiento contra el cáncer (EORTC) y el grupo de estudio de micosis americano (MSG) desarrollaron una serie de recomendaciones diagnósticas para la infección fúngica invasiva⁷⁵. Estas recomendaciones establecen tres categorías diagnósticas diferentes (probada, probable y posible) que se obtuvieron tras analizar los requerimientos necesarios en los pacientes y que se pueden englobar en tres grandes grupos:

- **Patología de base del paciente:**

Episodio reciente de neutropenia (<500/mm³) durante más de 10 días.

Trasplante alogénico de médula ósea.

Uso prolongado de esteroides a dosis medias > 0,3 mg/kg/día equivalente a prednisona durante más de tres semanas.

Tratamiento con inmunosupresores de células T (como ciclosporina o tacrólimus), bloqueantes del factor de necrosis tumoral α (TNF α , Tumor Necrosis factor α) anticuerpos monoclonales específicos (como alentuzumab) o análogos de nucleósidos durante los últimos 90 días.

Inmunodeficiencia severa innata (como enfermedad granulomatosa crónica o inmunodeficiencia severa combinada).

- **Criterios clínicos y radiológicos:**

Infección del tracto respiratorio inferior con presencia de uno de los siguientes signos:

- Lesiones densas, bien delimitadas (con o sin signo del halo)
- Signo de atrapamiento aéreo
- Cavitación
- Traqueobronquitis (úlceras, nódulo, pseudomembrana, placa o erosión en estudio broncoscópico)

Infección senos paranasales, en asociación a uno de los siguientes signos:

- Dolor agudo localizado
- Úlcera nasal con escara negra
- Rotura de barrera ósea, incluyendo órbita

Infección del sistema nervioso central, con presencia de uno de los siguientes signos:

- Lesión focal en las pruebas de imagen
- Engrosamiento meníngeo (tomografía computarizada o resonancia magnética)

- Criterios microbiológicos:

Análisis directos (citología, microscopía directa o cultivo)

Hongo filamentoso en esputo, lavado broncoalveolar, cepillado bronquial o aspirado de senos paranasales, indicado por:

Presencia de hifas

Cultivo de hongo filamentoso (p. ej. *Aspergillus* spp., *Fusarium*, *Zygomycetes* o *Scedosporium* species)

Análisis indirectos (detección de antígenos)

Aspergilosis: galactomanano en suero, plasma, lavado broncoalveolar o líquido cefalorraquídeo

Infección fúngica invasiva (no criptocócica o mucoral): β -D-glucano en suero.

Las categorías establecidas, según estas recomendaciones son:

- **AI Probada:** donde debe existir confirmación por histología o por cultivo de tejido estéril.
- **AI Probable:** al menos debe cumplir un factor de cada grupo de las características del paciente, descritas anteriormente (a: patología base del paciente, b: criterios clínicos y radiológicos y c: criterios microbiológicos)
- **AI Posible:** debe cumplir al menos un factor del grupo a: patología de base del paciente y un factor del grupo b: criterios clínicos y radiológicos.

En esta última revisión de los criterios diagnósticos realizado por la EORTC y el MSG en el 2008, se consideró que la categoría de AI Posible no era adecuada en el caso de micosis endémicas, ya que los criterios del paciente y los criterios clínicos son demasiado inespecíficos y, además, estos casos de AI Posible son de valor muy

limitado en ensayos clínicos, estudios epidemiológicos o en evaluaciones de técnicas diagnósticas.

3.5.2. Técnicas diagnósticas de la AI

Las técnicas usadas para el diagnóstico de infección fúngica por *Aspergillus* son:

- Examen microscópico

El examen microscópico tiene importantes limitaciones entre las que se encuentra su baja sensibilidad. La visión de estructuras fúngicas es mayor cuando el hongo es muy abundante en el tejido, lo cual ocurrirá en estadios muy avanzados de la infección. Por lo tanto, no puede ser considerada como una técnica de diagnóstico precoz por lo que resulta de poca utilidad a la hora de iniciar un tratamiento antifúngico específico⁷⁶. Debido a su baja sensibilidad y especificidad, el examen microscópico requiere de otra técnica que confirme el diagnóstico, que se puede obtener a través del cultivo.

- Cultivos para Aspergilosis

El aislamiento de *Aspergillus* por cultivo es un método sensible para detectar la infección y permite la identificación de la especie infectante y la realización de pruebas de sensibilidad *in vitro* a los anti-fúngicos. *Aspergillus spp* no es exigente en sus requerimientos nutritivos y cuando se sospecha de una infección por este género no debe utilizarse la cicloheximida en los medios de cultivo, porque inhibe su crecimiento. Aunque generalmente las especies patógenas humanas son capaces de crecer por encima de 37°C, los medios de cultivo deben ser incubados a 25-37°C durante cuatro semanas y, a ser posible, utilizando tubos en lugar de placas ya que la deshidratación de los mismos después de cuatro semanas es menor⁷⁷. El medio de cultivo más utilizado para diferenciar las distintas especies es el agar Czapeck-Dox⁷⁸.

El cultivo de esputo es una de las técnicas más utilizadas pero de escaso valor diagnóstico debido a que *Aspergillus* es uno de los contaminantes ambientales más habituales y, por lo tanto, no resulta fácil diferenciar entre el crecimiento por la infección o por contaminación ambiental. Una alternativa al cultivo de esputo lo constituye el lavado broncoalveolar que es una técnica sencilla, rápida y con mayor sensibilidad aunque su uso está limitado por la necesidad de tener una función respiratoria adecuada, lo que no suele ser muy habitual en pacientes con infecciones fúngicas pulmonares^{79,80}.

- Radiología

La radiografía de tórax puede ser normal en estadios iniciales de la AI por lo que es una técnica insuficiente para realizar diagnóstico precoz de la infección fúngica por *Aspergillus* en la mayor parte de pacientes hematológicos de alto riesgo. Se han descrito múltiples signos radiológicos asociados con AI, tales como la consolidación, los nódulos y el signo de halo o signo de halo creciente^{26,81}. En un contexto clínico compatible, la presencia de una o varias opacidades nodulares, debe hacernos sospechar de AI.

La tomografía axial computarizada de alta resolución (TACAR) mejora el diagnóstico de esta enfermedad. Se ha demostrado que permite anticipar 4.7 días la sospecha diagnóstica de AI en comparación con la radiografía de tórax⁸². En pacientes inmunodeprimidos han descrito incluso que el diagnóstico se puede establecer antes con la TACAR que con la detección del antígeno galactomanano (GM)⁸³. El uso de TACAR al inicio de la enfermedad resulta en mayores tasas de supervivencia ya que es una técnica bastante más sensible que permite detectar lesiones de forma muy temprana⁸⁴.

- Detección de anticuerpos

Aunque la detección de anticuerpos mediante distintas técnicas es útil para el diagnóstico de aspergiloma y de aspergilosis alérgica, su utilidad es muy limitada para el diagnóstico de AI debido fundamentalmente a su baja sensibilidad. Sin embargo, estudios recientes utilizando pruebas de ELISA han puesto de manifiesto que aproximadamente un tercio de los pacientes con AI presenta títulos de anticuerpos de utilidad diagnóstica^{85,86}.

- Detección del 1-3 β -D-Glucano y del Galactomanano

AF tiene más de 100 componentes antigénicos y entre los de mayor utilidad diagnóstica para la AI se encuentran el GM y el (1-3)- β -D-glucano⁷⁸, componentes de la pared del hongo. La detección del (1-3)- β -D-glucano se realiza mediante colorimetría y se basa en la activación del sistema proteolítico de la coagulación del cangrejo de herradura. Es una técnica muy sensible que permite detectar mínimas cantidades del (1-3)- β -D-glucano⁸⁷. La detección de (1-3)- β -glucano presenta una sensibilidad en torno al 90%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 59%, valor predictivo negativo del 97% y una eficacia global del 85%. Los falsos positivos son frecuentes y se asocian a pacientes de hemodiálisis con aparatos con membranas de celulosa en tratamiento con albúmina, inmunoglobulinas, sulfamidas y anticancerosos⁸⁸. Su utilización es, por tanto, limitada y debe ser analizada más en detalle mediante nuevos estudios prospectivos.

El GM es un componente de la pared celular del género *Aspergillus*⁸⁹ que es el principal exoantígeno liberado durante la invasión tisular. En enfermos con AI, el GM puede ser detectado en suero, orina, líquido cefalorraquídeo y líquido pericárdico. Aunque también está presente en el lavado broncoalveolar todavía no ha sido posible definir el punto de corte que permita diferenciar entre infección y colonización⁹⁰. Para la detección de GM se han desarrollado dos métodos comerciales. El primero de ellos está basado en una aglutinación con partículas de látex recubiertas de un anticuerpo monoclonal que reacciona con el galactomanano (Pastorex *Aspergillus*, Sanofi Diagnostics Pasteur, Francia). Esta técnica tiene un límite de detección de 15 ng/ml de GM, por lo que es poco sensible y ya no se utiliza. Actualmente se utiliza un ELISA (Platelia®*Aspergillus*, Bio-Rad, Francia) que emplea el mismo anticuerpo monoclonal que el Pastorex *Aspergillus*, pero es mucho más sensible, presentando un límite de detección de 0,5-1 ng/ml de GM⁷⁸. Además de su sensibilidad, la prueba es muy reproducible cuando se comparan los resultados obtenidos entre distintos laboratorios⁹¹. Se considera que la prueba es positiva cuando se obtienen al menos dos determinaciones positivas. La utilidad de la prueba es grande porque se adelanta en varios días al diagnóstico realizado por otras pruebas, permitiendo instaurar una terapia anti-fúngica adelantada y presenta una sensibilidad superior al 90%, una especificidad superior al 94%, un valor predictivo positivo del 87% y un valor predictivo superior al 95%.

Diferentes estudios, sugieren distintos puntos de corte para considerar un GM positivo. Existe un meta-análisis que nos muestra los puntos de corte más frecuentes (0.5ng/ml, 1ng/ml y 1.5ng/ml) y la inexistencia de diferencias entre ellos⁹². Martens y colaboradores definieron los valores de corte utilizados actualmente que son: un valor estático mayor a 0.8ng/ml o valores de dos muestras consecutivas mayores de 0.5ng/ml⁹³.

Otra de las ventajas de esta técnica radica en la posibilidad de monitorizar los niveles de GM durante el tratamiento, asociándose el descenso de los niveles de GM a la eficacia del tratamiento. Por lo tanto el GM es un marcador terapéutico ya que permite establecer el pronóstico de tratamiento de la AI y puede servir para modificar el mismo o añadir una segunda droga anti-fúngica con el objeto de potenciar o mejorar la eficacia del fármaco anti-fúngico que se elija como primera opción terapéutica⁹⁴.

Un aspecto importante de la técnica para conocer su verdadera utilidad, será su tasa de falsos negativos o positivos. La tasa de falsos negativos con Platelia® *Aspergillus* es del 8-10% de los enfermos de AI^{95,96}. Aunque se desconoce la verdadera razón de estos falsos negativos, algunos estudios han sugerido como posibles causas la encapsulación del proceso infeccioso (que impide la liberación del GM a los líquidos orgánicos), diferencias en el grado de invasión entre pacientes neutropénicos o incluso diferencias en la formación de inmunocomplejos

que impidan la detección del antígeno GM en enfermos con anticuerpos frente a *Aspergillus*⁸⁵.

En conclusión, la detección de GM en suero es un criterio muy útil para establecer un diagnóstico temprano de AI, siempre que se respalde con datos clínicos, microbiológicos y radiológicos.

- PCR

Aunque en las últimas décadas se han desarrollado técnicas para la detección de ADN de *Aspergillus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)⁹⁷⁻⁹⁹, aún no existen técnicas comercializadas para la detección de este hongo de forma rutinaria en el laboratorio asistencial, lo que aumenta la variabilidad y dificulta la comparación de resultados.

La característica más importante de la PCR es su enorme sensibilidad que permite la detección de concentraciones muy pequeñas de entre 1-10fg de ADN fúngico o de 1 a 5 unidades formadoras de colonias por mililitro que la convierten en una técnica 20 veces más sensible que el cultivo¹⁰⁰. Aunque el ADN fúngico se puede detectar en la mayoría de muestras clínicas, las muestras respiratorias presentan problemas para su estudio con técnicas moleculares ya que resulta casi imposible diferenciar al enfermo del portador asintomático (el 25% de la población sana presenta PCR positiva para *Aspergillus* en muestras respiratorias)⁹⁷. La muestra idónea es la sangre completa, el suero o el plasma. En el caso de la sangre completa de pacientes con AI la técnica tiene una sensibilidad del 100% y, además, precede en dos días a la aparición de signos y síntomas de la enfermedad, y hasta en 9 días al diagnóstico clínico¹⁰¹. Otro estudio prospectivo en pacientes hematológicos demostró que el uso combinado de detección de GM y PCR aumenta la sensibilidad en un 83.3% y la PCR se anticipaba al diagnóstico micológico en una media de 16 días en el 67% de los pacientes¹⁰². Además, otro estudio demostró que la PCR puede ser de gran utilidad para la monitorización del tratamiento anti-fúngico ya que se negativizaba a los catorce días en los casos de buena respuesta a la terapia mientras que se mantenía positiva en caso de fracaso terapéutico¹⁰³.

Mengoli y colaboradores (2009) en un meta-análisis con 1.618 pacientes procedentes de 16 estudios observaron que la PCR tiene una sensibilidad del 75% y una especificidad del 87% para el diagnóstico de AI en dos muestras consecutivas de sangre completa. En cambio, con un solo resultado positivo de PCR como criterio de AI la sensibilidad alcanzó el 88% y la especificidad bajaba hasta el 75%¹⁰⁴. Por lo tanto, aunque la detección por PCR es un método sensible, la especificidad es sólo del 70-75% limitando todavía de forma importante su utilidad como técnica diagnóstica. No obstante, Cuenca-Estrella y colaboradores realizaron un estudio en 2.244 pacientes con neutropenia febril y mostraron que la PCR tiene

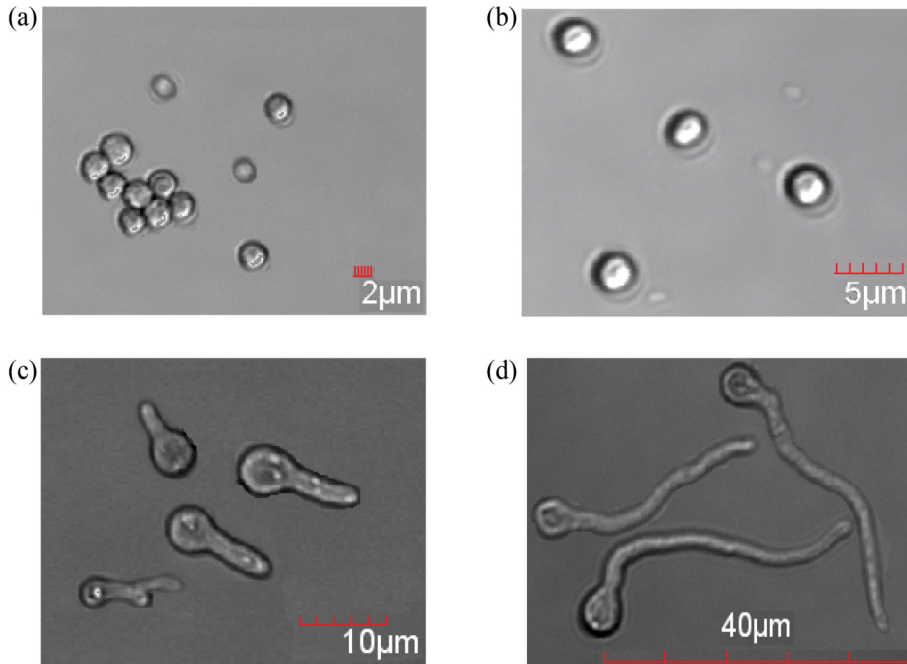
una sensibilidad del 91.6%, una especificidad del 94.4%, un valor predictivo negativo del 98.5% y un valor predictivo positivo del 73.3%. En este estudio observaron que la PCR se adelantaba en 21 días al TACAR y en 68 días a la detección del antígeno GM. A pesar de estos prometedores resultados, hay que tener en cuenta que no todos los pacientes son hematológicos de alto riesgo y solo consideran la neutropenia como factor de riesgo¹⁰⁵. En el 2015, se realizó un estudio en 13 centros españoles con pacientes hematológicos de alto riesgo donde observaron una menor incidencia en el grupo de pacientes donde se utilizaron la PCR y la detección de GM como técnicas diagnósticas (4.2%) en comparación con el grupo donde sólo se realizó la detección de GM (13.1%). Además, observaron una reducción del riesgo absoluto de 8,9% y una disminución del intervalo de tiempo para el diagnóstico (13 días vs 20 días) gracias al uso combinado de las dos técnicas pero, curiosamente, no encontraron que la PCR se anticipara a la detección del antígeno GM¹⁰⁶.

A pesar de la variedad de estudios realizados en los últimos años sobre esta técnica, la PCR aún no ha sido incluida como criterio diagnóstico de AI en los criterios publicados por la EORTC y la MSG en el 2008 y la razón principal es su falta de estandarización.

4. Inmunidad de la Aspergilosis Invasiva

AF es un hongo saprófito y ubicuo que libera miles de conidios que respiramos diariamente⁷⁸. La AI se caracteriza por la proliferación de hifas fúngicas en el tejido pulmonar y los principales afectados, como hemos comentado anteriormente, son pacientes severamente inmunocomprometidos entre los que se incluyen pacientes trasplantados y pacientes que reciben quimioterapia a altas dosis¹⁰⁷. En el caso de individuos inmunocompetentes, la germinación de los conidios inhalados se evita gracias a la acción de los macrófagos alveolares (MA) y a las barreras anatómicas. Si se produce la germinación de los conidios, existe una rápida y eficaz respuesta dirigida por neutrófilos y células dendríticas (CD) que se encargan de activar la respuesta inmune adaptativa, provocando una rápida movilización de las células T contra el hongo invasor. En cambio, en pacientes inmunocomprometidos los conidios inhalados no son eliminados de manera efectiva por el sistema inmune innato, germinando así y produciendo hifas que se encargan de invadir y penetrar el tejido pulmonar (Figura 6).

Figura 6: Etapas de crecimiento de *AF*



A medida que transcurre el tiempo, los conidios en reposo (5a), comienzan a hincharse (5b) y germinan (5c). Dando lugar finalmente a la formación de hifas (5d) (figura obtenida de Anatte Margalit and Kevin Kavanagh)

A continuación desarrollaremos el papel del sistema inmune del hospedador frente a la colonización pulmonar de *AF* y el desarrollo de la AI.

4.1. Primera línea de defensa del hospedador

El epitelio de las vías respiratorias y sus secreciones representan el primer punto de contacto para los conidios inhalados de *AF* y constituyen una de las primeras líneas de defensa del sistema inmunológico. El epitelio ciliar del tracto respiratorio superior se compone de varios tipos de células entre las que se incluyen células ciliadas y células mucosas¹⁰⁸. La mayoría de los conidios de *Aspergillus* inhalados son atrapados por la mucosa y eliminados a través de la acción ciliar de la mucosa epitelial¹⁰⁹. Sin embargo, la aclaración de los conidios a este nivel puede ser menos eficiente debido a que *Aspergillus* produce moléculas tóxicas que inhiben la actividad ciliar y dañan la mucosa endotelial, evitando así su expulsión del pulmón¹¹⁰.

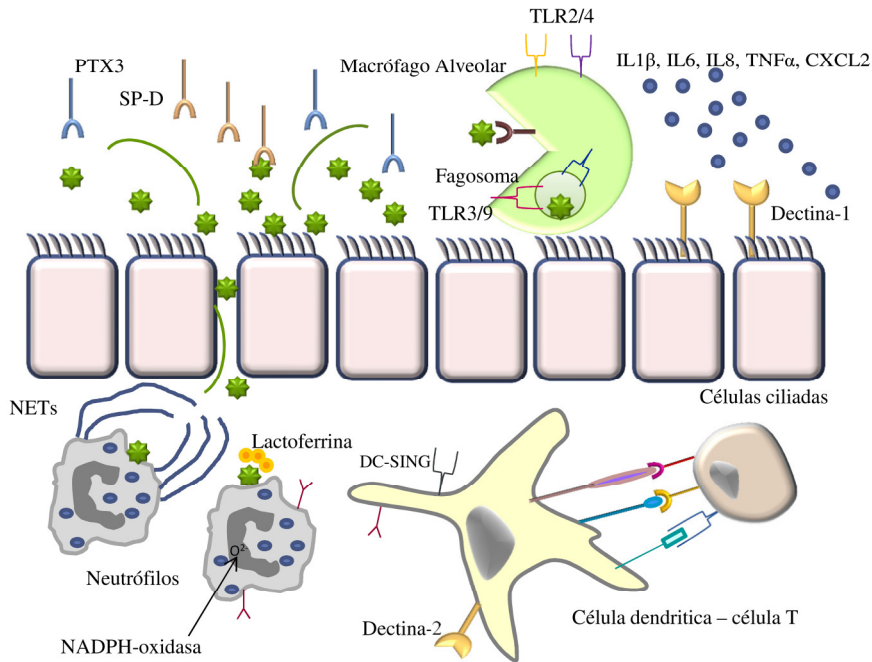
Las células del epitelio respiratorio además segregan una amplia gama de péptidos antimicrobianos algunos de los cuales presentan actividad contra hongos del género *Aspergillus*. Entre ellos podemos incluir la lactoferrina, que secuestra el hierro y las

β -defensinas, cuya síntesis aumenta significativamente ante el exposición de *Aspergillus* frente a las células epiteliales^{109,111}. Además, se ha demostrado *in vitro* el papel antifúngico de la quitinasa¹¹² que es una enzima sintetizada por células epiteliales (CE) y macrófagos capaz de degradar un componente de la pared celular de *Aspergillus* llamado *quitina*. Cabe además destacar en las secreciones respiratorias epiteliales la presencia de un péptido denominado *inhibidor de la leucoproteasa secretora* que se encarga de mantener el equilibrio en el balance proteasas/anti-proteasas dentro de las vías respiratorias y, además, presenta actividad fungicida¹¹³.

Las CE tipo II, las traqueales y los tipos A549 son capaces de internalizar los conidios trasportarlos por endosomas y procesarlos en compartimentos celulares ácidos^{114,115}. Sin embargo, esta actividad fungicida de las CE es mucho más débil que la de los fagocitos profesionales como por ejemplo, los macrófagos. Estudios *in vitro* han demostrado que los conidios son capaces de sobrevivir y germinar dentro de las organelas ácidas de las CE¹¹⁶. Además, existen estudios que demuestran que existen esporas con la habilidad de producir dihidroxinaftaleno melanina (DHN-melanina) que inhibe la apoptosis de macrófagos derivados de monocitos (MDM) y reducen la acidificación fagolisosomal de MA, MDM y neutrófilos^{117,118}.

Las CE de las vías respiratorias presentan una serie de receptores capaces de reconocer a *AF*. Entre ellos destacan los receptores de lectinas tipo-C (RLCs) y los Toll Like Receptors (TLRs). Estos receptores, además de ser capaces de reconocer al hongo, producen una respuesta inmunológica que conduce a la síntesis de un gran número de mediadores pro-inflamatorios^{119,120}. Varios estudios muestran que conidios en la primera fase de germinación (conidios hinchados) y no conidios en reposo desencadenan una respuesta pro-inflamatoria que induce la producción de TNF α , IL-8, HBD2, HBD9 y especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species)¹²¹. La capacidad de diferenciar entre los diferentes estadios morfológicos del conidio resulta fundamental para modular y obtener una respuesta inflamatoria pulmonar adecuada. Al entrar en el pulmón, los conidios en reposo son eliminados rápidamente por MA mientras que las CE se mantienen inactivas. Sin embargo, los conidios que han conseguido escaparse de los MA comienzan a hincharse y son entonces detectados por las CE que dan lugar a una respuesta pro-inflamatoria a través de la producción de IL-8, un quimio-atrayente de neutrófilos¹¹⁹ (Figura 7).

Figura 7: Respuesta inmunocompetente frente a *AF*.



Cuando los conidios son inhalados y llegan al pulmón, son reconocidos de manera inmediata por los receptores solubles tales como PTX3 y SP-D (surfactante pulmonar), los cuales se unen a los conidios, consiguiendo una mejor fagocitosis conidial por los MA. El reconocimiento de los MA está mediado por Dectina-1 y los TLRs, que conducen a la inducción de la respuesta inflamatoria. Los conidios que consiguen escapar de los MA, germinan y atraviesan la barrera alveolar. Los mediadores pro-inflamatorios inducidos por los MA y las CE, reclutan neutrófilos al lugar de la infección. Los neutrófilos utilizan sus mecanismos oxido-dependientes (produciendo ROS) y sus mecanismos oxido-independientes (NETs, desgranulación y producción de lactoferrina) para inactivar a los conidios y a las hifas germinantes. En el lugar de infección también actúan las CD, las cuales fagocitan y procesan los conidios, para una posterior presentación del antígenos a las células T, que a su vez activan la respuesta inmune adaptativa.

4.2. Reconocimiento molecular de *Aspergillus fumigatus*

Los conidios de *Aspergillus* presentan un minúsculo tamaño (2-3μm) y, debido a esto, en ocasiones evitan el aclaramiento mucociliar y alcanzan el tejido broncoalveolar donde se enfrentan a los MA, CD y neutrófilos. Todas estas células presentan un amplio repertorio de receptores de superficie reconocedores de patrones (PRRs, pattern recognition receptors), que detectan patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs, pathogen associated molecular patterns). La unión de los PRRs y los PAMPs provoca una serie de eventos que dan como resultado la fagocitosis de los conidios y la producción de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias y finalmente el aclaramiento del patógeno en pacientes inmunocompetentes^{122,123}. En el caso de los hongos, la pared celular es la

principal fuente de PAMPs conteniendo principalmente β -glucano, quitinas y mananos¹²⁴. El reconocimiento de los hongos, también se realiza por la acción de receptores solubles tales como las pentaxatrininas, las proteínas del complemento, las ficolinas y las colectinas que actúan como opsoninas y facilitan la interacción de los fagocitos con el hongo¹²⁵.

A continuación explicaremos los diferentes tipos de receptores solubles y receptores de superficie con los que cuenta el sistema inmune para enfrentarse a *AF*.

4.2.1. Receptores solubles

Las pentaxatrininas, proteínas del complemento, ficolinas y colectinas, son parte fundamental de la respuesta humoral del sistema inmune innato.

4.2.1.1 Pentaxatrininas

La pentaxatrina 3 (PTX3) es un receptor soluble secretado por una gran variedad celular en particular por fagocitos mononucleares, neutrófilos, CD y CE en respuesta frente a la exposición a conidios y a señales anti-inflamatorias PTX3 produce complejos en la superficie conidial del hongo y actúa como una opsonina mejorando el reconocimiento y la fagocitosis de los conidios por los MA^{126,127}.

PTX3 tiene un papel crítico en la respuesta frente a *Aspergillus* ya que modula la activación del complemento, la regulación de la inflamación y la inducción de la fagocitosis. En estudios *in vivo* se ha demostrado que los ratones PTX3^{-/-} son muy susceptibles a desarrollar AI ya que poseen menos capacidad para activar las células T helper tipo 1 (Th1) y de las T helper tipo 2 (Th2). Además, dichos estudios han demostrado que la administración exógena de PTX3 restablece el funcionamiento de tanto la vía Th1 como la Th2 y mejora notablemente la actividad fagocítica y fungicida¹²⁶. Por otra parte, se ha demostrado además que el PTX3 facilita el reconocimiento y la fagocitosis de los conidios por los neutrófilos a través del receptor II FC γ (RII FC γ). Esto se demostró cuando tras el tratamiento con PTX3 exógeno en ratones con fenotipo RII FC γ ^{-/-} se observó un aumento en la carga fúngica y en la inflamación en comparación con los ratones con fenotipo RII FC γ ^{+/+}¹²⁸.

4.2.1.2 Sistema complemento

El sistema complemento es un mecanismo innato de defensa que está mediado por unos 30 receptores solubles y receptores de superficie implicados en diferentes cascadas bioquímicas que acaban produciendo finalmente la muerte del patógeno de manera directa o indirecta. El sistema complemento presenta tres vías de activación: la vía clásica, la alternativa y la vía de las lectinas. Las tres convergen en un punto común que será la convertasa C3, la cual dará lugar a la opsonización de los

patógenos favoreciendo así su fagocitosis y actuará como quimioatrayente para algunas células pro-inflamatorias como los neutrófilos. Finalmente, la convertasa C3 además actúa sobre la membrana del patógeno favoreciendo la muerte del mismo por lisis osmótica^{129,130}. Sin embargo, esta última acción de la convertasa 3 no es eficaz en hongos del género *Aspergillus* ya que presentan mayores grosores en la pared celular.

AF activa las tres vías del complemento aunque la activación de cada vía depende del estadio morfológico del hongo¹³¹. Los conidios en reposo activan la vía alternativa a través de C3 debido a su naturaleza inmunogénica y cuando los conidios maduran, se produce la activación de la vía clásica debido a que el hongo queda expuesto al sistema inmune dando lugar al desarrollo de anticuerpos. La activación de la vía clásica es iniciada por la unión de dos o más inmunocomplejos formados por inmunoglobulina G (IgG) y/o inmunoglobulina M (IgM) a C1q¹³². C1q también activa la vía clásica a través de las interacciones con PTX3 y con la proteína C reactiva¹³³. Algunos estudios, han demostrado que los ratones C1q^{-/-} presentan un detrimento en la fagocitosis de los conidios y una mayor susceptibilidad a AI que puede ser revertida cuando son tratados con PTX3 exógeno, lo que demuestra que la actividad de PTX3 es independiente de C1q. Por el contrario, los ratones C3^{-/-} presentan una disminución en la fagocitosis de los conidios que sí es dependiente de PTX3^{126,128}. La unión de C3a y la convertasa C3 cataliza la formación de la convertasa C5 que escinde C5 en C5a y C5b. El componente del complemento C5a se define como un potente quimioatrayente de células pro-inflamatorias y se ha demostrado que los ratones deficientes en el componente C5 (C5^{-/-}) presentan una menor afluencia de neutrófilos en el pulmón cuando son infectados con *Aspergillus*. Sin embargo, cuando estos ratones son tratados con suero complementado aumenta la afluencia de neutrófilos en el pulmón e incrementa la supervivencia, lo que demuestra la importancia del sistema complemento en los primeros estadios de la infección de *AF*¹³⁴.

4.2.1.3 Colectinas

Las colectinas son receptores de lectinas tipo-C (RLCs) solubles dependientes de calcio y capaces de reconocer y unirse a restos de carbohidratos de la pared del hongo¹³⁵. Las lectinas de unión a manosa (MBL, mannan binding lectins) son colectinas que activan el complemento a través de la vía de las lectinas. MBL se une a las proteínas denominadas MBL asociadas a proteasas de serina (MASPs) y generan C4b2a (una convertasa C3). Esta escinde C3 en C3a y C3b. El componente del complemento C3b y su producto de escisión inactivo iC3b, son potentes factores de opsonización que favorecen la fagocitosis de los conidios por MA y neutrófilos¹²⁹. La importancia de MBL en infecciones fúngicas se puso de manifiesto en un estudio de ratones inmunodeprimidos e infectados con *Aspergillus* que al ser tratados con MBL sufrieron un aumento en sus tasas de supervivencia,

una reducción en la carga fúngica del pulmón, un aumento en los niveles de TNF α , IL1 β e IFN γ y una disminución en los niveles de IL10¹³⁶.

La proteína surfactante pulmonar A (SP-A) y la proteína surfactante pulmonar D (SP-D) son colectinas segregadas por las CE pulmonares tipo II¹⁰⁹. Estudios *in vitro* han demostrado además que la unión de SP-A y SP-D a los conidios de *Aspergillus* provocan la aglutinación de los conidios favoreciendo así la acción fagocítica y fungicida de los MA y de los neutrófilos¹³⁷.

4.2.1.4 Ficolinas

Las ficolinas son lectinas que al igual que las MBL se unen a las MASPs, y forman un complejo capaz de activar el sistema complemento a través de la vía de las lectinas¹³⁸. Estudios *in vitro* han establecido una cooperación entre la ficolina-2 y PTX3 frente a conidios de *Aspergillus*. De manera que PTX3 mejora la deposición de la ficolina-2 en la superficie de los conidios y la ficolina-2 favorece la unión de PTX3 a la superficie de los conidios¹³⁹.

4.2.2. Receptores de superficie

4.2.2.1. Dectina-1

Una vez que los conidios alcanzan el pulmón comienzan a madurar sufriendo una hinchazón que provocará la pérdida de una fina capa de proteína hidrófoba que rodea al conidio y enmascara los constituyentes inmunogénicos de la pared del hongo. De manera que el conidio pierde su capa hidrófoba quedando al descubierto el β -glucano de la pared celular¹⁴⁰.

Dectina-1 es una proteína de transmembrana tipo II que está altamente expresada en macrófagos, CD y neutrófilos y resulta crucial en la respuesta pro-inflamatoria contra *AF*¹⁴¹. Dectina-1 reconoce los restos de β -glucano en conidios hinchados y en germinación pero no los conidios en reposo lo que permite a los macrófagos diferenciar entre los diferentes estadios morfológicos de *Aspergillus*¹⁴². *In vitro* se ha demostrado que los conidios en reposo son fagocitados por los macrófagos con una peor eficacia que conidios maduros. Además, se ha demostrado que al enmascarar el β -glucano de la pared del hongo no se inhibe la fagocitosis de los macrófagos lo que indica que el β -glucano de la pared celular del hongo no es la única estructura reconocida por los PRRs de los macrófagos¹⁴³. Dectina-1 realiza un reconocimiento que ocurre a nivel de la superficie celular pero desencadena eventos de señalización intracelular a través de la vía Sik quinasa y CARD9 que activan el factor nuclear kappa B (NF κ B, nuclear factor-kappa B) e induce la producción de citoquinas y quemoquinas tales como IL1- α , IL1- β , factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony stimulating factor), proteína inflamatoria de macrófagos-1 α (MIP-1 α , macrophage

inflammatory protein-1 α) y proteína inflamatoria de macrófagos-1 β (MIP-1 β , macrophage inflammatory protein-1 β). La Dectina-1 también induce la producción de IL10 sugiriendo que la dectina-1 juega un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria^{141,144,145}.

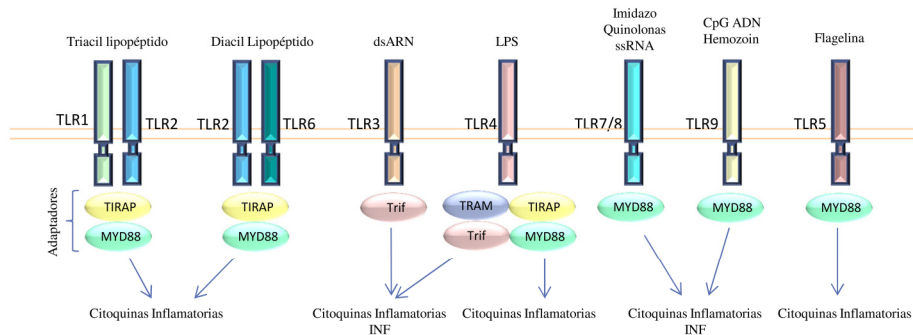
4.2.2.2 Dectina-2

Dectina-2 es un RLC que se expresa en CD y macrófagos y reconoce fundamentalmente α -mananos que forman parte de la capa externa del hongo y se encuentran enmascarando al β -glucano de la pared celular del hongo^{146,147}. Cuando los conidios son inhalados son reconocidos antes por dectina-2 que por dectina-1. Los MA en respuesta frente a AF, presentan una alta expresión de dectin-2 y producirán una respuesta pro-inflamatoria dependiente de NF κ B produciendo citoquinas tales como IL1- β , IL10, IL23p19 y TNF α . Esta producción de citoquinas dependiente de NF κ B está mediada por Syk quinasa y esto quedó patente al silenciar la expresión de Syk quinasa y comprobar la disminución que sufría la expresión y producción de citoquinas. Además al silenciar la expresión de dectin-2 y Syk quinasa, se comprobó una menor actividad fungicida de los MA frente AF, demostrándose así la importancia de este receptor en la respuesta inmune frente al hongo¹⁴⁸.

4.2.2.3 Toll like receptors (TLRs)

Esta familia de receptores desempeña un papel fundamental en la respuesta inmune innata contra patógenos así como en la posterior inducción de la respuesta inmune adaptativa. Los TLRs reconocen patrones moleculares específicos en una amplia gama de patógenos y tras el reconocimiento de los patógenos desencadenan vías de señalización intracelular que dan como resultado la inducción de citoquinas y quemoquinas inflamatorias. Hasta la fecha se han identificado 10 miembros de esta familia de receptores y estudios inmunológicos han ayudado a identificar sus respectivos ligandos¹⁴⁹ (Figura 8). Además, los TLRs inducen moléculas co-estimuladoras de células presentadoras de antígeno, tales como las CDs. Este proceso de maduración de las CDs es esencial para la activación de la respuesta inmune adaptativa, lo que indica que los TLRs son un activador común de ambas vías (innata y adaptativa) que culmina en la inducción de la producción de las citoquinas inflamatorias como el TNF α , IL6, IL1 β e IL12. Además induce vías alternativas para adecuar la respuesta frente a los diferentes patógenos como por ejemplo en el caso de TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, y TLR9 que inducen una respuesta antiviral por inducción de IFN tipo I (Figura 8).

Figura 8. Respuestas inmunes mediadas por TLRs



TLR2 junto con TLR1 o TLR6 reconocen los patrones moleculares de triacil y diacil lipopéptido, respectivamente. TLR3 reconoce dsRNA. TLR4 reconoce LPS bacteriano. TLR7/8 median el reconocimiento de imidazoquinolinas y ssARN. TLR9 reconoce ADN de bacterias y virus, y TLR5 reconoce la flagelina bacteriana. TLR1/2 y TLR2/6 utilizan como adaptadores a MyD88 y TIRAP/MAL. TLR3 utiliza únicamente a Trif. TLR4 utiliza cuatro adaptadores, MyD88, TIRAP/MAL, Trif y TRAM. TLR7/8, TLR9 y TLR5 utilizan a un único adaptador, que es MyD88. La vía dependiente de MyD88 controla la respuesta inflamatoria, mientras que la vía mediada por Trif controla principalmente la respuesta mediada por IFN.

Los TLRs son receptores de membrana tipo I caracterizados por un dominio extracelular rico en leucinas que actúa en el reconocimiento de los PAMPs y un dominio intracelular Toll/interleukin-1 receptor (TIR) necesario para iniciar la respuesta intracelular¹⁵⁰. Entre los dominios intracelulares TIR nos encontramos con MYD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), TIRAP (TIR domain containing adaptor protein), TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN β) y TRAM (TRIF-related adapter molecule). La utilización diferencial de estos adaptadores que contienen el dominio TIR proporciona especificidad a las vías de señalización mediadas por los diferentes TLRs. Cuando los TLRs entran en contacto con el patógeno, actúan provocando una respuesta en cascada que culmina con la activación del NF κ B y en la activación de la proteína-1(AP-1) dando lugar a una respuesta inmune específica.

- Vías de activación de los TLRs

La estimulación de los TLRs desencadena la expresión de varios genes implicados en la respuesta inmune. El reconocimiento microbiano de los TLRs facilita la dimerización de estos en homodímeros o heterodímeros¹⁵¹. Por ejemplo, TLR2 puede formar un heterodímero con TLR1 o TLR6. En la cascada del dominio intracelular TIR encontramos un dominio modulador MYD88, el cual será esencial para todos los TLRs en la inducción de citoquinas inflamatorias. Sin embargo, la activación de TLRs específicos conduce a patrones de expresión génica ligeramente diferentes. Podemos diferenciar entre vías de activación MYD88 dependientes y vías MYD88 independientes (Figura7).

Vías MYD88 dependientes: esta vía es inducida por todos los TLRs así como por los receptores de IL1. MYD88 contiene dos dominios, un dominio amino terminal y otro carboxi terminal, asociados ambos con el dominio TIR de los TLRs. Cuando se activa MYD88, el dominio amino terminal interactúa con el dominio amino terminal de IRAK4, lo que permite el reclutamiento de IRAK4 para formar un complejo y fosforilar IRAK1. De esta manera se asocia con TRAF6 que a su vez permite la activación de dos vías, una que produce la activación de los factores de transcripción de AP-1, a través de la activación de MAP quinasas (MAP, proteína de activación mitosis) y la otra que conduce a la activación del complejo TAK1/TAB que aumenta la actividad del complejo I κ B quinasa (IKK) y activa NF κ B. (Figura 8)

NF κ B es un factor de transcripción dimérico formado por p50 y p52 que pueden asociarse a otras proteínas que comparten un dominio de homología REL en su extremo N-terminal formando así diferentes miembros de la familia NF κ B: NF κ B1, NF κ B2, RelA, RelB y c-Rel. Los cuales pueden clasificarse en dos subfamilias:

- Subfamilia I: incluye los miembros con dominio de activación transcripcional (TAD, Transcription activation domain): RelA (p65), RelB y c-Rel.
- Subfamilia II: incluye los miembros sin dominio TAD: NF κ B1 (p50) y NF κ B2 (p52).

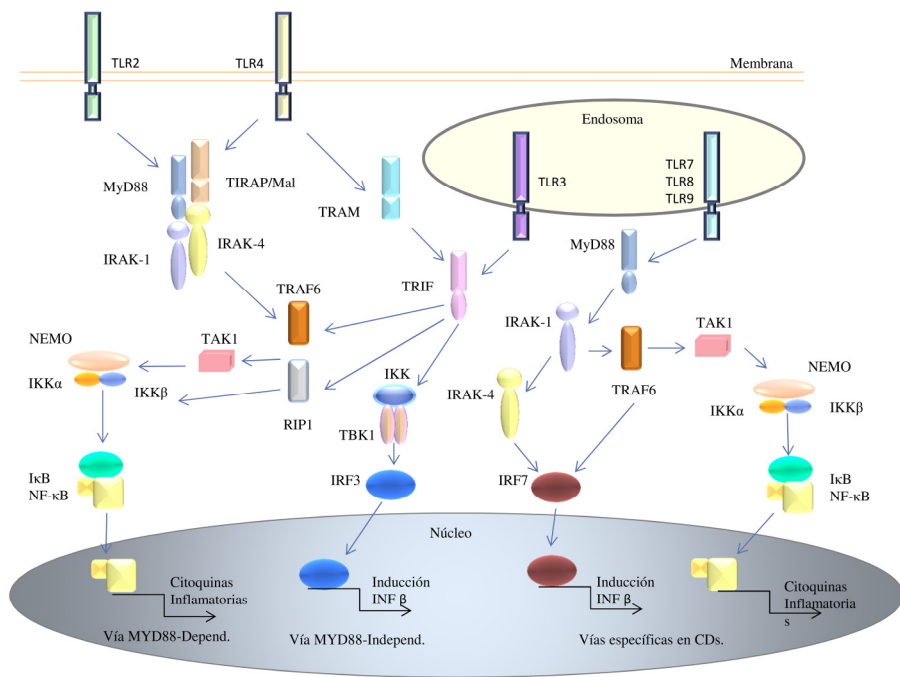
En relación a su estructura todos los miembros presentan el dominio homólogo REL, el cual se encuentra formado por 300 aminoácidos y es el responsable de la dimerización entre los diferentes miembros de la familia NF κ B pero, además, de la asociación del inhibidor I κ B (inhibidores κ B) y de los motivos κ B con el DNA. Además, en el dominio REL se encuentran las secuencias de localización nuclear. Los miembros de la subfamilia I, RelA (p65), RelB y c-Rel, presentan el dominio TAD en la región C-terminal que es necesario para la regulación positiva de la expresión génica. Aunque las funciones de los dominios REL y TAD son muy diferentes, ambos dominios pueden sufrir modificaciones post-transduccionales que pueden afectar a la actividad transcripcional de NF κ B así como a su unión con el DNA. El NF κ B es un heterodímero formado por RelA (p65) y p50 en la mayoría de las células y, en células no estimuladas, se encuentra secuestrado en el citoplasma por una familia de inhibidores, llamados I κ Bs (inhibidores κ B). Tras la estimulación de los TLRs, IKK fosforila dos residuos de serina de I κ B que, tras un proceso de ubiquitinización, se degrada en el proteasoma permitiendo así la liberación de NF κ B al núcleo donde activa la expresión de genes específicos.

Vía MYD88 independiente/TRIF dependiente: esta vía solo la emplean el TLR3 y el TLR4 que señalizan a través de la proteína TRIF (adaptador que contiene el dominio TIR e induce IFN- β). Por su parte, el TLR4 puede ocupar la proteína

TRAM (molécula adaptadora relacionada con TRIF)^{152,153} que actúa de puente entre el dominio TIR y TRIF (Figura 9).

La señalización de la vía independiente a MYD88 abarca la siguiente secuencia: la proteína TRIF recluta al complejo proteico TRAF6-TAK1-TAB2 que activa a la IKK permitiendo la liberación de NFκB. A través de otra ruta la molécula TRIF interactúa con el dímero TBK1/IKK ocasionando la translocación del factor regulador de IFN-3, Interferon Regulatory Factor 3) provocando la síntesis de interferón tipo I¹⁵⁴.

Figura9: Vías de señalización de los TLRs, mostrándose las dos rutas de señalización, tanto la dependiente como la independiente a MYD88



(Modificado de Akira 2006).

- TLR-2 y TLR-4

Numerosos estudios reconocen a los TLR-2 y TLR-4 como componentes fundamentales en la respuesta del hospedador frente *AF*. Sin embargo, existen algunas discrepancias en los resultados descritos hasta el momento y aún no están bien definidos los PAMPs de *AF* que se unen a TLR-2 y TLR-4¹⁵⁵.

Recientes estudios *in vitro* han demostrado que los conidios y las hifas de *AF* estimulan TLR2 y producen un incremento de citoquinas producidas por macrófagos murinos. Por otra parte, se ha observado que TLR4 media una

respuesta pro-inflamatoria inducida solo por conidios de *AF* mientras que las hifas pero no los conidios de *Aspergillus* producen una estimulación de IL10 a través de mecanismos dependientes de TLR2. Por lo tanto, parece que TLR4 media señales pro-inflamatorias frente a conidios mientras que TLR2 induce la vía anti-inflamatoria en la germinación de conidios a hifas. Esto hace pensar que el paso de la germinación puede ser considerado un mecanismo de defensa de *AF* frente a la respuesta del hospedador¹⁵⁶.

El papel de TLR2 y TLR4 en la producción de citoquinas contra *AF* ha sido analizado en numerosos estudios¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Estos estudios han demostrado que TLR2 forma heterodímeros con TLR6 y TLR1 en ratones y con TLR1 en humanos para detectar *AF* y que, tras la incubación con una cepa de *AF* RodA deficiente, los macrófagos derivados de médula ósea de ratones deficientes en TLR1 y TLR6 producían menos cantidad de IL12p40, CXCL2, IL6 y TNF α que los macrófagos derivados de médula de ratones WT. Además, los pulmones de los ratones “knockout” para TLR1 y TLR6 presentaban una disminución en la producción de CXCL1 y CXCL2 y, además, tenían mayor carga fúngica en comparación con los ratones WT¹⁵⁹.

- TLR-3 y TLR-9

El TLR3 y el TLR9 están también implicados en la defensa del hospedador frente a *AF*. Los TLR3 se localizan en el sistema endosomal de las CD y de las CE y son capaces de detectar la doble hebra de RNA que liberan los conidios al entrar en la vía endosomal. El papel de TLR3 consiste en modular la respuesta adaptativa antifúngica inmune y fue demostrada *in vivo* por Carvalho y colaboradores. Quienes en ratones TLR3 $^{-/-}$ vieron disminuida la capacidad migratoria de las CD a través de los nódulos linfáticos. Por lo tanto se verá reducida la respuesta de las células T inducida por las CD, de manera que estos ratones TLR3 $^{-/-}$ serán incapaces de activar la respuesta contra *AF* de las células T CD8 $^{+}$ ¹⁶⁰. Los TLR3, regulan su respuesta antifúngica inflamatoria a través de la proteína reguladora TRIF. En ratones con Aspergilosis pulmonar TRIF $^{-/-}$ se observó una exacerbada respuesta inflamatoria en comparación con ratones MYD88 $^{-/-}$ y ratones WT¹⁶¹. Los TLR3 expresados en CE proporcionan protección frente *AF* a través de la activación de la indolamina-2,3-dioxigenasa, que es un regulador de la respuesta inflamatoria mediada por células T a través de TLR3/TRIF. Además la transfección de CE con RNA conidial indujo la expresión de IFN- β y de CXCL10 a través de una vía dependiente de TRIF/RIP1/TBK1¹⁶². IFN- β e IP-10, son mediadores tanto del sistema inmune innato como del adaptativo. Por lo que los TLR3 además de proporcionar un vínculo entre la respuesta inmune y adaptativa, parecen que juegan un papel fundamental en la respuesta proinflamatoria en las vías respiratorias¹⁶³.

TLR9 es un receptor de CpG DNA desmetilado, que es un componente de *AF* que queda expuesto durante el procesamiento en el fagolisosoma. En humanos, los TLR9 se encuentran principalmente en las CD y las Células B, mientras que en ratones también se expresan en monocitos y macrófagos¹⁶⁴. Tras el reconocimiento del DNA conidial, los TLR9 acumulan rápidamente el contenido de las esporas en fagosomas, donde sufrirán una escisión proteolítica. Este reclutamiento en fagosomas es independiente del estado de germinación del conidio, esto indica que el componente del hongo responsable de esta actividad, está presente en los diferentes estados de maduración del hongo. La vía de los TLR9, parece ser independiente a la vía de los demás TLRs, ya que se observó, que su actividad no se modificaba en macrófagos derivados de médula MYD88^{-/-} y TRIF^{-/-}¹⁶⁵.

Los TLR9, parecen jugar un papel regulador importante en la respuesta innata frente a *AF*. Esta afirmación quedó patente en un estudio con ratones neutropénicos TLR9^{-/-}, los cuales mostraban una respuesta inflamatoria reducida dos días después de la infección y un aumento significativo de la respuesta inflamatoria cuatro días después de la infección, en comparación con los WT. Por lo que parece ser que TLR9 será necesario al inicio de la respuesta inflamatoria, y también parece ejercer un efecto regulador en la respuesta inflamatoria con el fin de evitar el daño tisular y la progresión de la infección. También se observó una correlación entre el fenotipo TLR9^{-/-} y una reducción de la expresión de dectin-1 en comparación con el fenotipo TLR9^{+/+}. Lo que puede explicar la incapacidad de respuesta de los ratones TLR9^{-/-} frente a conidios en la primera fase de maduración (conidios hinchados)¹⁶⁶.

A excepción de TLR3, todos los TLRs actúan a través de Myd88. Y está molécula Myd88 juega un importante papel en la respuesta inflamatoria temprana. En los pulmones de ratones inmunodeprimidos Myd88^{-/-} se observó una disminución del aclaramiento del hongo y una pobre respuesta inflamatoria, la cual se normalizó tres días después de la infección. Lo que nos confirma la actuación de otras vías que median la respuesta inflamatoria de manera independiente a Myd88^{167,168}.

- Dectin-1–TLR interactions, DC-SIGN, NOD2 and NLRP3

Dectin-1 y TLR2 desempeñan una respuesta sinérgica frente a estímulos fúngicos, facilitando la fagocitosis de los conidios de *AF*. *In vitro* la deficiencia de TLR2 y MYD88 en macrófagos murinos, redujo significativamente la captación de los conidios. Lo que indica que TLR2/vía MYD88 dependiente, promueve la fagocitosis mediada por Dectin-1, aunque no será indispensable en la unión de los conidios^{143,169}.

DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) es un RLC, que se expresa en CD y MA, juega un papel importante en la defensa del hospedador frente al hongo y en estudios *in vitro* han establecido

su capacidad para reconocer, unir y mediar la internalización de los conidios de *AF* tanto en CD como en MA.

El dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2 o NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2) ha sido recientemente implicado en el reconocimiento de *AF*. *In vitro*, macrófagos murinos que mostraban una mayor expresión en NOD2 mostraban una mayor inducción de NFκB, mientras que las células knockout para NOD2 mostraban una reducción de NFκB. Demostrando así un posible papel de NOD2 en la defensa contra *AF*¹⁷⁰.

In vitro también se observó que el inflasoma NLP3 es activado por las hifas y no por conidios, e induce una respuesta inflamatoria mediada por la IL-1β¹⁷¹. Aunque dectin-1, es capaz de inducir la IL-1β sin que sea necesario la internalización del hongo por lo que producirá una respuesta inmediata y más rápida que la generada por NLP3¹⁷².

4.3. Respuesta celular

4.3.1 Macrófagos

Los macrófagos son células tisulares que contribuyen a la defensa antifúngica mediante la fagocitosis y la eliminación de elementos fúngicos¹⁷³. El proceso de fagocitosis puede ser activado por una gran variedad de citoquinas entre las que destaca el IFNγ. Además, los macrófagos son capaces de producir una fuerte respuesta inflamatoria a través de la activación de PRRs y secreción de citoquinas (como TNFα e IL-12), quemoquinas (MIP-2, CXCL2 y CXCL1) y otros productos inmunomoduladores de la respuesta adaptativa, los cuales son claves en el reclutamiento de neutrófilos¹⁷⁴ (20). Recientemente, un estudio *in vitro* demostró que macrófagos sometidos a Dexametasona eran incapaces de eliminar *AF* lo que puede ayudar a explicar por qué el tratamiento con altas dosis de corticoides es un factor de riesgo para padecer AI. Además, la adición del factor estimulador de colonias de Granulocitos-Macrófagos (GM-CSF) recuperó la capacidad fungicida tanto *in vitro* como *in vivo*^{175,176}. Por otra parte, en un modelo de Aspergilosis invasiva en animales inmunocomprometidos se observó que el pretratamiento con el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) mejoraba los parámetros clínicos así como la capacidad fungicida de los macrófagos¹⁷⁷.

4.3.2 Células Dendríticas

Las DCs son capaces de reconocer un amplio rango de patógenos entre los que se encuentra *Aspergillus* y que el tipo de respuesta inmunológica que activa viene determinada por el tipo de patógeno pudiendo activar los linfocitos T₀ CD4⁺ tanto a Th1 como a Th2 o incluso activando una inmunidad independiente de células T¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Las células dendríticas, además, son capaces de diferenciar a los patógenos

fúngicos en las diferentes formas de su ciclo vital. En el modelo murino, se ha observado que las DCs responden de manera diferente ante las dos formas en las que se encuentra *Candida Albicans* durante su ciclo vital y que aunque, en ambos casos el hongo es fagocitado, los receptores de la célula dendrítica empleados en su reconocimiento son diferentes¹⁸¹. Esta hipótesis se ha confirmado cuando se ha observado que las DCs activan la vía Th2 cuando reconocen hifas y la vía Th1 cuando el antígeno reconocido es de conidios. Hallazgos similares se han encontrado en estudios con *Aspergillus fumigatus* (AF) donde se ha observado que los receptores de las DCs encargados de su unión son DC-SIGN y VLA-5 que conducen a la internalización y al procesamiento de sus antígenos. En el caso de AF se pudo comprobar que las DCs tienen una actividad fungicida superior a la que muestran los macrófagos y que, en los pulmones, al igual que ocurría en el caso de *Candida Albicans* son capaces de diferenciar entre conidios e hifas activando la vía Th1 o Th2, respectivamente. De hecho, la exposición de conidios inactivados a DCs producía un elevado incremento de la IL-12 un inductor de la vía Th1 y de moléculas coestimuladoras que median la respuesta inmunológica celular.

4.3.3 Neutrófilos

Los neutrófilos son los primeros en ser reclutados en el foco infeccioso. Carecen de la capacidad de presentación del antígeno a linfocitos T pero tienen una potente capacidad fagocítica mediada por receptores del complemento y Fc que permiten la fagocitosis de los patógenos opsonizados. De hecho, en modelos animales, el tratamiento con G-CSF incrementaba notablemente los niveles de supervivencia lo que nos hace pensar que la estimulación de los neutrófilos puede ser una terapia para algunas infecciones fúngicas^{182,183}. Los neutrófilos poseen mecanismos de defensa frente a patógenos fúngicos tanto oxidativos como no oxidativos. Las defensinas son una familia de proteínas que poseen los neutrófilos y que constituyen un mecanismo no oxidativo por el cual el neutrófilo es capaz de romper membranas provocando cambios en la osmolaridad que dificultan la supervivencia del hongo. Los neutrófilos muestran, además, mecanismos oxidativos para dañar a los patógenos fúngicos siendo capaces de sintetizar radicales libres que provocan alteraciones en la estructura de algunas proteínas, degradación de ácidos nucleicos y peroxidación lipídica¹⁸⁴.

Recientemente se ha descubierto que los neutrófilos pueden generar fibras o redes extracelulares llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (NET, neutrophil extracellular traps). Las NET son una barrera física que evita la diseminación del patógeno, facilitan su muerte al favorecer la alta concentración de moléculas antimicrobianas y limitan el daño del tejido¹⁸⁵. Por lo que son una nueva forma de defensa antimicrobiana mediada por los neutrófilos y ha sido implicada en la defensa contra AF¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. La formación de las NET está inducida por una variedad de microbios y agentes pro-inflamatorios como la IL8 y es particularmente

importante en la defensa frente a patógenos que son demasiado grandes para ser fagocitados, como es el caso de las hifas de *AF*^{185,189}, por lo que podemos afirmar que los neutrófilos junto a los MA, son pilares esenciales en la primera línea de defensa contra *AF*.

4.3.4 NK

La función de las NK en la defensa frente a *AF*, ha sido destacada en numerosos estudios. Aunque su mecanismo de reconocimiento del patógeno no está claro, si se ha establecido que responden frente al conidio en estado germinativo y no frente al conidio en reposo^{190,191}. La actividad fungicida de estas NK se atribuye a la liberación de perforinas y al incremento de $IFN\gamma$, el cual evita el crecimiento del conidio y su germinación a hifa^{190,192}. El $IFN\gamma$ derivado de las células NK, potencia la actividad fungicida de los MA y además produce un incremento en el pulmón de quemoquinas tales como: CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Estas quemoquinas a través de su receptor común CXCR3 median la respuesta de las células Th1-CD4+. Curiosamente las NK también expresan este receptor CXCR3, por lo que la producción de los ligandos de CXCR3 promueve un ciclo *feedback* positivo para estas células durante la infección fúngica¹⁹²⁻¹⁹⁴.

La importancia de estas NK se ha demostrado en estudios en ratones, los cuales confirman que la tasa de mortalidad es el doble en ratones con AI, neutropénicos y con depleción en NK frente a ratones infectados neutropénicos¹⁹⁵. Por lo que parece, que son un punto a destacar en la defensa contra la infección fúngica, particularmente en pacientes neutropénicos. De hecho han sido propuestas como inmunoterapia en pacientes trasplantados para reducir el riesgo de Aspergilosis¹⁹¹.

4.3.5 Monocitos

El análisis *in vitro* de *AF* y monocitos, ha permitido diferenciar entre dos subconjuntos de monocitos ($CD4^+/CD16^+$ y $CD4^+/CD16^-$), con funciones diferenciadas en la defensa frente al hongo. Ambos subconjuntos de monocitos fagocitan de manera eficaz a los conidios, pero solo los monocitos $CD4^+/CD16^-$ inhiben la germinación de los conidios a hifas pero secretan poco $TNF\alpha$, mientras que los $CD4^+/CD16^+$ son incapaces de inhibir la germinación de los conidios pero secretan altas cantidades de $TNF\alpha$ tras la exposición al hongo¹⁹⁶. También se observó mediante estudios de incubación de *AF* y monocitos humanos, que ambos subgrupos no respondían frente a conidios en reposo pero si frente a conidios maduros (o hinchados) e hifas produciendo una inducción de la expresión de: $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-1 α , IL6, IL10, IL8, CCL7, CCL2 Y CCL20¹⁹⁷.

Los monocitos pueden diferenciarse a CD, las cuales transportan los conidios a los ganglios linfáticos drenantes del pulmón, donde se inicia una respuesta específica

contra *AF* de células T CD4⁺¹⁹⁸. Además, los monocitos pueden aumentar el reclutamiento de los neutrófilos y por lo tanto desempeñan un papel crucial en la diseminación de la infección fúngica¹⁹⁹.

4.3.6 Plaquetas

La función clásica y más conocida de las plaquetas consiste en mediar la coagulación después de haberse producido un daño endotelial pero además las plaquetas serán capaces de mediar la respuesta inmune innata especialmente cuando se produce una infección en el torrente sanguíneo. Varios estudios *in vitro*, han identificado el papel de las plaquetas en la defensa frente a *AF*. Las plaquetas humanas rodean y se adhieren a la superficie de los conidios e hifas opsonizadas aunque no son capaces de engullir los conidios tal vez por el gran tamaño de las esporas del hongo en comparación con las plaquetas^{200,201}. Mientras otros estudios afirmaron que la activación de las plaquetas era dependiente del contacto ya que se observó como las plaquetas se activaban al exponerlas frente a derivados del hongo como las proteasas de serina y la gliotoxina²⁰². Las plaquetas almacenan gránulos de proteínas microbicidas de plaquetas (PMP), los cuales son liberados en la activación plaquetaria inducida por patógenos. Uno de estas PMPs, la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT) ha demostrado tener efecto fungicida sobre varias especies de *Aspergillus* y entre ellas se encuentra *AF*^{201,203}. De manera que una vez activadas, las plaquetas inhibirán la germinación de los conidios y el crecimiento de las hifas^{200,202} y además inducen el reclutamiento de otras células tales como los PMNs y monocitos, en los cuales inducen una mayor expresión de IL8. Por lo que parece que las plaquetas también tendrán un papel destacado en la mediación de la respuesta proinflamatoria contra *AF*²⁰⁴.

4.4. Respuesta inmune adaptativa

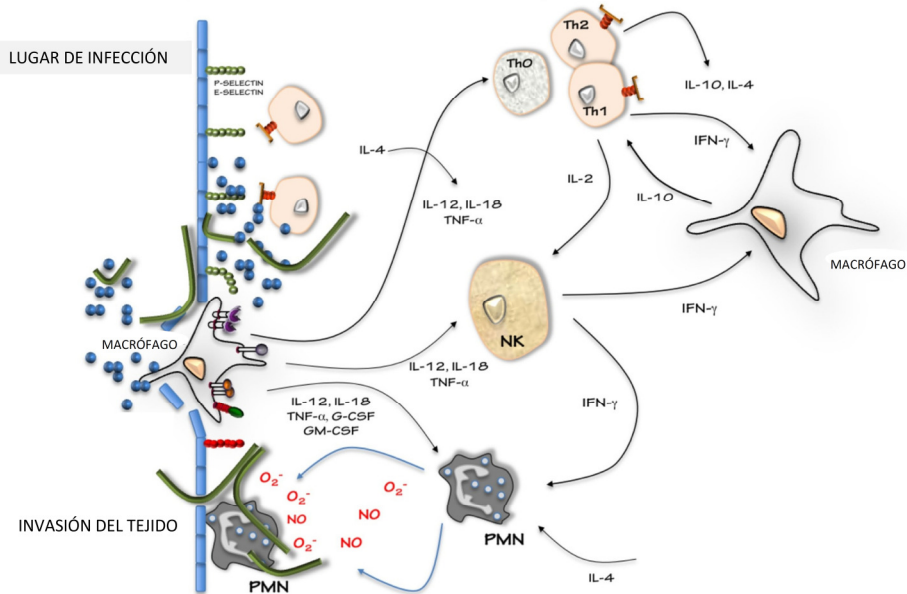
La expresión de moléculas coestimuladoras por los fagocitos activa el proceso de inmunidad adaptativa que supone la regulación de las células Th (Figura 10). Las citoquinas liberadas por linfocitos Th1 (IFN γ) y las liberadas de los linfocitos Th2 (IL4 e IL10) tienen efectos opuestos sobre las funciones efectoras de los macrófagos y de las células dendríticas. En el modelo murino, las citoquinas liberadas por Th1 y Th2 seguían un patrón diferente en ratones resistentes y susceptibles a infección por *Aspergillus ssp*²⁰⁵). La activación de células Th1-CD4⁺ inducía la producción de IFN γ e IL12 por macrófagos y DCs que constituye la respuesta inmunoprotectora frente a *Aspergillus*^{44,206,207}. Por el contrario, la activación de células Th2-CD4⁺ induce la producción de IL4 e IL10 que se asocia a una progresión de la AI. La neutralización de la IL4 e IL10 así como la administración de IFN γ , resultaban en un efecto protector del sistema inmune contra *AF*²⁰⁸ logrando recuperar a los animales infectados, disminuyendo notablemente la mortalidad, e incrementando la expresión de los ARN mensajeros

específicos de tanto la IL12 como el IFN γ . Además, la neutralización del IFN γ producía un agravamiento de la patología y, concomitantemente incrementaba la expresión del ARN mensajero de IL10. Además, se ha demostrado que las células Th1 confieren protección a ratones *Knockout* para IL4 e IL10 y a ratones susceptibles con antagonistas de IL4 e IL10, mientras la respuesta de células Th2 está asociada con la progresión de la enfermedad al igual que la neutralización del IFN γ y la IL12²⁰⁹. En ratones inmunocompetentes (C57BL/6J) infectados con conidios vivos, también se observó una activación de la vía Th1 con mayores niveles de IFN γ , mientras que los infectados con conidios muertos produjeron menores niveles de IFN γ y mayores niveles de IL4, debido a una activación de la vía Th2. Por lo que podemos concluir que las células Th distinguen entre las diferentes formas de AF, respondiendo de manera adecuada ante una forma realmente patógena²¹⁰.

En estudios clínicos de infecciones fúngicas, se ha observado que existe una relación inversa entre la producción de IFN γ e IL10. En pacientes oncológicos con AI que respondían a la terapia antifúngica y mostraban regresión de la enfermedad, se observaba una linfoproliferación específica contra AF y una mayor ratio de IFN γ /IL10, mientras que en pacientes con un desarrollo estable o diseminado de la infección se observaba una menor ratio de IFN γ /IL10²¹¹. De nuevo en modelo murino, se ha observado que la resistencia al desarrollo AI estaba asociada a una elevada producción de IL6, TNF α , e IL12 y, además, que los ratones que eran resistentes a la primera AI adquirirían resistencia frente a posibles reinfecciones, es decir, desarrollaban una inmunidad adquirida⁴⁴. En animales susceptibles de infección, sin embargo, la temprana producción de TNF α e IL12 no se producía y se observaba, además, una elevada producción de IL4 e IL10. Las citoquinas, una vez liberadas por las células Th, muestran, a su vez, acciones opuestas sobre los macrófagos y las células dendríticas²¹²⁻²¹⁴. La respuesta oxidativa y el daño que los macrófagos y las células dendríticas hacen a las hifas está potenciado por IFN γ y los factores estimuladores de colonias^{214,215} mientras que es inhibido por la IL10²¹². Cenci y colaboradores, encontraron que la capacidad de los macrófagos y las células dendríticas pulmonares para eliminar las hifas y los conidios se encontraba potenciada en ratones resistentes a la AI y severamente deprimida en ratones donde se producía progresión y diseminación de la infección⁴⁴. Esos cambios en la actividad fagocítica frente AF se deben a la acción de las citoquinas locales de tal manera que el TNF α ²¹⁶ y las quemoquinas²¹⁷ pueden activar, principalmente en la fase inicial de la enfermedad, los mecanismos de defensa por su estimulación sobre células fagocíticas del pulmón y a través del reclutamiento celular. Se ha observado, además, que la producción de TNF α está incrementada en ratones resistentes a la AI y disminuida en ratones susceptibles.

De hecho, el control inicial de la infección pulmonar de *AF* está claramente dañado en ratones deficientes en $TNF\alpha$, mientras que el reclutamiento celular permanece intacto, lo que determina que el control inicial de la infección por $TNF\alpha$, es decir, su acción protectora, no es dependiente del reclutamiento celular sino que, probablemente, se deba a que el $TNF\alpha$ activa la producción de $IL12^{44,218}$. La $IL12$ tiene un papel fundamental en la protección frente a *AF* desarrollando respuestas protectoras a través de células $Th1^{209}$. La producción de $IL12$ está disminuida en ratones altamente susceptibles a la infección por *AF* y su administración exógena disminuye la sensibilidad y confiere resistencia. Además, esa resistencia a la infección se ve comprometida cuando se neutraliza la $IL12$. Esto indica que la $IL12$ puede ser esencial para el desarrollo óptimo de inmunidad en AI^{44} . Parece ser que la $IL12$ ejerce su efecto protector a través de la inhibición de la producción de citoquinas de $Th2$ como se ha observado en otros modelos experimentales o quizás, a través de su capacidad para mantener la activación de la citoquinas que inducen la fagocitosis de elementos fúngicos.

Figura 10: Esquema de la respuesta inmune adaptativa frente *Aspergillus fumigatus*.



El reconocimiento del antígeno fúngico conduce a la liberación de $IL4$, $IL12$, $IL18$ y $TNF\alpha$ dando lugar a la estimulación de las células NK , las cuales liberan $IFN\gamma$ aumentando de esta manera la vía $Th1$. En este proceso elevados niveles de $IL-10$ o un balance negativo de $IFN\gamma/IL-10$ correlacionan con la progresión de la enfermedad

5 Variabilidad genética y polimorfismos

Existen numerosas regiones de variabilidad genética dentro de los genes implicados tanto en la respuesta inmunológica innata como adquirida. Las variaciones de un único nucleótido (SNPs, single nucleotide polymorphism) en regiones incluidas en genes de moléculas inmunológicas están asociadas con la susceptibilidad o resistencia a padecer infecciones.

5.1 Polimorfismos en citoquinas, quemoquinas y receptores

Actualmente, se han publicado varios estudios sobre el riesgo genético a Aspergillosis asociados a SNPs en genes que codifican para citoquinas y quemoquinas como: IL10⁵⁰, IL1 β ²¹⁹, IL1A²¹⁹ y CXCL10²²⁰ así como para receptores tales como: IL23R²²¹, TNFR1 y TNFR2^{222,223} o antagonistas como el IL1RA²¹⁹. De todos ellos solo la IL10 ha sido validada en cohortes independientes aunque sin un estudio funcional del todo claro.

IL1. Los genes del cluster de IL1 participan en la regulación de la respuesta inmune. IL1a e IL1b son potenciadores de la respuesta inmune a través de la interacción con IL1RI mientras que IL1Ra es su antagonista natural. Los tres genes que forman el cluster de IL1 son polimórficos y se ha demostrado que afectan a la producción de estas citoquinas. Por tanto, su aparición podría influir en la susceptibilidad a padecer AI. Los polimorfismos estudiados son los siguientes: -889 (C/T) en la IL1 α , -511 (C/T) en la IL1 β y una secuencia de repeticiones en tándem (VNRT, variable number of tandem repeats) en IL1Ra. Tras realizar un análisis de haplotipos, se observó una mayor asociación a riesgo de AI en aquellos pacientes portadores del haplotipo VNTR2/-889C/-511T con un valor de $P = 0.020$ ²¹⁹. Estudios recientes han identificado polimorfismos en genes que codifican para la IL1 y para la β -Defensina-1 que afectan a la producción de citoquinas proinflamatorias por las células mononucleares, lo que provoca una mayor susceptibilidad a infección del paciente post-trasplante²²⁴.

TNF y sus receptores. La resistencia a la AI se ha asociado a una elevada producción de TNF α (11) que es una citoquina proinflamatoria y asociada con la efectividad y duración de la respuesta inflamatoria. Existen varios polimorfismos en la región del promotor del gen de TNF α que parecen afectar a sus niveles de expresión 1031 (T/C), - 863 (C/A), - 857 (T/C), - 376 (G/A), - 308 (G/A) y - 238 (G/A) y podrían estar relacionados con la susceptibilidad a enfermedades infecciosas. Entre ellos el más significativo es el SNP - 308 (G/A), en el cual, el alelo A se ha asociado a un incremento en la producción de TNF α por los macrófagos *in vitro* y a un incremento de sus niveles en sangre *in vivo* y, por tanto, conferiría de protección frente a AI²²⁵. Sainz y colaboradores analizaron un

conjunto de polimorfismos relacionados con genes de mediadores de la respuesta inflamatoria en la infección fúngica, los cuales eran: TNF α (-308 y +489), linfotóxina α (LT α) (+252), TNFR2 (+676) y una VNRT en la posición -322 en la región promotora del gen TNFR2. Los SNPs de TNF α y LT α no fueron asociados con AI, mientras que la VNRT de la región promotora de TNFR2 mostraba una fuerte asociación a AI con una P = 0.029, aunque tampoco encontraron asociación con el polimorfismo +626 en ese mismo gen²²³. Este mismo grupo publicó tres SNPs del gen TNFR1 (rs2234649 A/C, rs4149570 G/T y rs767455 A/G) analizados en 144 pacientes hematológicos inmunodeprimidos y 131 controles²¹⁹. Los portadores de los SNPs rs767455 y rs4149570 fueron asociados con susceptibilidad a la infección (p= 0.033 y p=0.018, respectivamente). Estos resultados están apoyados por una fuerte correlación entre una menor expresión de TNFR1 y una mayor frecuencia de galactomanano positivo en los pacientes portadores del SNP rs4149570²²².

IL6. La IL6 es una citoquina proinflamatoria y su elevada producción provoca resistencia frente a *Aspergillus*⁴⁴. Los polimorfismos -174 (G/C) o -634 (G/c) en la región del promotor del gen de la IL6 en el cromosoma 7 está asociado a los niveles de IL6 en plasma, de tal manera que la presencia del alelo C determinaba una menor producción de IL6²²⁶ y, por tanto, posiblemente una susceptibilidad a enfermedades infecciosas como las producidas por *Aspergillus*. En este caso no se ha observado una asociación significativa de estos dos polimorfismos en la región promotora del gen de la IL6 con la susceptibilidad a padecer AI, pero sí una notable sobrerrepresentación de un haplotipo C - 174/C - 634 en el grupo de pacientes susceptibles a IPA comparado con los pacientes sin la infección²²⁷.

IL10. La IL10 es una citoquina antiinflamatoria, que regula las citoquinas de la vía Th1, el complejo de histocompatibilidad II, moléculas coestimuladoras en macrófagos y su elevada producción está implicada en el desarrollo de susceptibilidad⁴⁴. Probablemente, los polimorfismos encontrados en humanos que afectan a su producción estén implicados en el desarrollo de susceptibilidad. Los SNPs -1082 (G/A), -819 (C/t) y -592 (C/A), según diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, afectan a la producción de IL10 y además, análisis de haplotipos mostró el haplotipo ACC asociado a riesgo de desarrollar AI en pacientes post-trasplante²²⁸. Estos hallazgos fueron confirmados por Sainz y colaboradores⁵⁰ y Mezger y colaboradores²²⁰. También se ha confirmado que los portadores del alelo G del polimorfismo rs1800896 (posición -1082) presentan mayores niveles de IL10 que los portadores del alelo A^{228,229}.

CXCL10. El CXCL10 es un mediador antiinflamatorio inducido por IFN γ y el cual estimula la migración de las células Th1 y además incrementa la adhesión al endotelio de las células T. 84 polimorfismos en 17 genes de citoquinas,

quemoquinas y sus receptores (CCL2, CCR1, CCR5, CCR6, CCR7, CXCL10, ICAM-1, IFNG, IL4, IL6, IL10, IL12B, IL18, SCYA20, TLR2, TLR4 Y TNF α) fueron analizados en pacientes post-trasplante en busca de una posible asociación con AI. Los resultados más potentes se observaron en tres SNPs localizados en el gen de CXCL10 (rs1554013, rs3921, rs4257674) con una $p < 0.007^{220}$. Análisis funcionales, demostraron que CD inmaduras expuestas a AF mostraban mayores niveles de CXCL10 si portaban el genotipo WT frente al haplotipo de riesgo CGAG. También se observó un aumento CXCL10 en el suero de pacientes diagnosticados de AI probada/probable frente a pacientes inmunodeprimidos pero no IA probada/probable. Por lo que estos SNPs en CXCL10 podrían ser de importancia en la secreción de quemoquinas tras la exposición a AF²²⁰.

IL23R. Carvalho y colaboradores analizaron la importancia pronóstica de las variantes genéticas de la vía IL23/Th17. Y observaron que las variantes de IL23R e IL17A fueron los factores pronósticos más importantes, en particular el rs11209026 en IL23R el cual se asoció a una supervivencia global mejorada y a un menor riesgo de infecciones fúngicas. Lo que sugiere que las variantes genéticas de la vía inflamatoria IL23/TH17, serán factores importantes en el resultado clínico del TPH-Alo.

5.2 Polimorfismos en receptores de superficie

TLRs: El reconocimiento del hongo y la señalización de los TLRs, será crucial para que el sistema innato inicie una respuesta adecuada. Por lo que las alteraciones genéticas en los TLRs no afectarán sólo al reconocimiento del patógeno sino que también afectarán a la respuesta inmune produciendo alteraciones tales como la reducción de los niveles de citoquinas²³⁰.

Los TLRs 1, 2, 4 y 6 han sido descritos como unos de los receptores más relevantes del sistema inmune innato, a pesar de que algunos de los ligandos de *Aspergillus* para estos receptores son todavía desconocidos. Kesh y colaboradores mostraron SNPs no sinónimos, dos en TLR1 (Asn 248 Ser y Arg 80 Thr) y uno en TLR6 (Ser 249 Pro) asociados con el riesgo de AI en pacientes post-trasplante, mientras que en el TLR4 no hallaron ningún resultado significativo²³¹. Estos resultados están en concordancia con el estudio que Mezger y colaboradores realizaron en 5 SNPs del TLR4 (rs1927911, rs4986790, rs2737191, rs5030728 y rs1554973) en pacientes post-trasplante, en los cuales tampoco encontraron ninguna asociación con infección²²⁰. En cambio Bochud y colaboradores encontraron un haplotipo en el tercer exón del TLR4 asociado con infección: rs4986790 (A/G; Asp 299 Gly) y rs4986791 (C/T; Thr 399 Ile). La presencia de los alelos minoritarios Gly299 e Ile399, respectivamente, disminuye su funcionalidad y predispone hacia una mayor susceptibilidad y a un incremento en la severidad de infección⁵¹. Estos resultados serían confirmados por Koldehoff y colaboradores²³² y por Carvalho y

colaboradores, quienes mostraron una asociación significativa el alelo G del rs4986790 (Asp 299 Gly) y la Aspergilosis cavitaria crónica (OR= 3.46; P= 0.003)²³³. En el TLR2 hasta ahora, ningún polimorfismo ha sido asociado con el riesgo de Aspergilosis^{220,233,234}. Por otro lado, sí que ha sido encontrado un polimorfismo en el TLR3 (95C/A) que conduce a una activación defectuosa de las células T CD8+ y es asociado con susceptibilidad a AI¹⁶⁰ y también un SNP en el TLR5(1174C/T) que ha sido también asociado con susceptibilidad a AI con una P=0.004²³⁵ lo que nos sugiere que el TLR5 está involucrado en la defensa contra AF.

Dectina-1: es un receptor de superficie que media la captura y destrucción de AF, por lo que individuos con variaciones genéticas en este receptor son altamente susceptibles a las infecciones por este hongo tras someterse a trasplante. Cunha y colaboradores mostraron que la presencia del polimorfismo Y234X en dectin-1 (codón de parada, denominado CLEC7A) tanto en donantes como en receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas aumentaba el riesgo de padecer Aspergilosis, siendo el riesgo mayor cuando el polimorfismo estaba presente simultáneamente en los donantes como en los receptores, además estos resultados están soportados por datos funcionales donde se observó una disminución en la producción de: IFN γ , IL10, IL1 β , IL6 y IL17A^{236,237}.

5.3 Polimorfismos en receptores solubles

PTX3: es un miembro de la superfamilia de las pentraxinas, producido y liberado rápidamente por diferentes tipos celulares, en particular por fagocitos, CD y CE. Activa la vía clásica del complemento y facilita el reconocimiento del hongo por los macrófagos y DC. Cunha y colaboradores mostraron una variante haplotípica de PTX3 en pacientes hematológicos trasplantados asociada con un mayor riesgo a AI²³⁸. Esta asociación fue replicada en una nueva cohorte de receptores de pacientes trasplantados²³⁹. Y además ha sido asociada a una menor producción y expresión de PTX3 y a una reducida actividad fagocítica en PBMCs. Estos resultados también se confirmaron en el modelo murino, donde se observó que ratones deficientes en PTX3 tenían una mayor susceptibilidad a AI que los ratones WT. Y este resultado observado en ratones deficientes de PTX3 era causado por un reconocimiento defectuoso de los conidios de *Aspergillus* de los macrófagos alveolares y de las CD¹²⁶.

MBL: desempeña un papel importante en la opsonización y lisis de patógenos fúngicos, y además será capaz de activar el complemento a través de la vía de las lectinas y, por tanto, cualquier alteración en sus niveles, podría desencadenar pérdida de capacidad de eliminación de *Aspergillus* por activación del complemento. Estudios recientes muestran un haplotipo de tres SNPs en MBL asociado con una mayor susceptibilidad a AI²⁴⁰. La presencia de este haplotipo

produce bajos niveles de MBL dando lugar a un deterioro de la actividad y en parte este podría ser el motivo de una mayor susceptibilidad a AI.

5.4 Otros genes

Otros estudios mostraron asociaciones con SNPs localizados en genes relacionados con la vía de respuesta inmune frente a los hongos, como son: MASP2²⁴⁰, receptores de compuestos de glicosilación avanzada (RAGE, receptor for advanced glycation end products)²⁴¹, proteínas del grupo S100 que fijan calcio (S100B, S100 calcium-binding protein B)²⁴¹ y plasminógeno²⁴². Sin embargo estos estudios, no muestran una clara relevancia funcional ni una validación de sus resultados, por lo que deberán ser estudiados con una mayor profundidad.

Tabla4. Factores de riesgo genéticos para AI

| Genes | SNPs | Alelos | Loc. | Poblac. | Paciente | P-value | Author, year |
|---|------------|--------|----------|---------|----------|---------------|-----------------|
| Receptores reconocedores de patrones | | | | | | | |
| TLR1 | rs5743611 | C/G | Exon | 127 | TPH | < 0,001 | |
| TLR6 | rs4833095 | C/T | Exon | 127 | TPH | < 0,001 | Kesh, 2005 |
| | rs5743810 | C/T | Exon | 127 | TPH | < 0,001 | |
| TLR4 | rs4986790 | A/G | 5' UTR | 336 | TPH | 0,02 | Bochud, 2008 |
| | rs4986790 | A/G | 5' UTR | 120 | TPH | 0,003 | Carvalho, 2008 |
| | rs4986791 | C/T | 5' UTR | 154 | TPH | 0,006 | Koldehoff 2013 |
| | rs4986791 | C/T | 5' UTR | 221 | TPH | 0,003 | Carvalho, 2009 |
| TLR3 | rs3775296 | G/T | 5' UTR | 223 | TPH | 0,007 | Carvalho, 2012b |
| TLR5 | rs5744168 | C/T | Exon | 171 | TPH | 0,004 | Grube, 2013 |
| TLR9 | rs5743836 | C/T | Promotor | 102 | TPH | 0,043 | Carvalho, 2008 |
| DECTIN-1 | rs16910526 | A/C | Exon | 205 | TPH | 0,05 | Cunha, 2010 |
| | rs16910526 | A/C | Exon | 179 | TPH | 0,2 | Chai, 2011 |
| MBL | rs5030737 | C/T | Exon | 97 | TPH | 0,02 | Vaid, 2007 |
| | rs5030737 | C/T | Exon | 92 | TPH | 0,015 | Crosdale, 2001 |
| PTX3 | rs2305619 | A/G | Intron | 268/330 | TPH | 0,003/0,02 | Cunha, 2014a |
| | rs3816527 | A/C | Exon | | | | |
| | rs2305619 | A/G | Intron | 1127 | TOS | 0,02 | Wojtowics, 2014 |
| | rs3816527 | A/C | Exon | | | | |
| Citoquinas, quemoquinas y sus receptores | | | | | | | |
| IL-1 β | rs1143627 | C/T | Promotor | 110 | PH | 0,095 | Sainz, 2008 |
| | rs16944 | A/G | Promotor | 26 | TPH | 0,0005 | wojtowicz, 2014 |
| IL-1RN | rs419598 | C/T | Exon | 1101 | TPH | 0,02 | wojtowicz, 2014 |
| IL-1 α | rs1800587 | C/T | 5' UTR | 110 | PH | aplotype: 0,C | Sainz, 2008 |
| DEF β 1 | rs1800972 | C/G | 5' UTR | 26 | Donor | 0,002 | wojtowicz, 2014 |
| IL10 | rs1800896 | A/G | Promotor | 378 | | 0,01 | Brouard, 2005 |
| | rs1800896 | A/G | Promotor | 120 | PH | 0,001 | Sainz, 2007 |
| | rs1800896 | A/G | Promotor | 105 | TPH | 0,012 | |
| | rs1800871 | C/T | Promotor | 105 | TPH | | Seo, 2005 |
| | rs1800872 | A/C | Promotor | 105 | TPH | | |

| Citoquinas, quemoquinas y sus receptores | | | | | | | |
|--|------------|-----------|-------------|------|-------|---------------|--------------------|
| IL-1 β | rs1143627 | C/T | Promotor | 110 | PH | 0,095 | Sainz, 2008 |
| | rs16944 | A/G | Promotor | 26 | TPH | 0,0005 | wojtowicz, 2014 |
| IL-1RN | rs419598 | C/T | Exon | 1101 | TPH | 0,02 | wojtowicz, 2014 |
| IL-1 α | rs1800587 | C/T | 5' UTR | 110 | PH | aplotype: 0,C | Sainz, 2008 |
| DEF β 1 | rs1800972 | C/G | 5' UTR | 26 | Donor | 0,002 | wojtowicz, 2014 |
| IL10 | rs1800896 | A/G | Promotor | 378 | | 0,01 | Brouard, 2005 |
| | rs1800896 | A/G | Promotor | 120 | PH | 0,001 | Sainz, 2007 |
| | rs1800896 | A/G | Promotor | 105 | TPH | 0,012 | |
| | rs1800871 | C/T | Promotor | 105 | TPH | | Seo, 2005 |
| | rs1800872 | A/C | Promotor | 105 | TPH | | |
| IL-23R | rs11209026 | A/G | Exon | 201 | TPH | 0,05 | Carvalho, 2010 |
| TNFR1 | rs4149570 | G/T | Promotor | 144 | PH | 0,018 | Sainz, 2010 |
| | rs767455 | C/T | Exon | 144 | PH | 0,034 | |
| TNFR2 | N/M | -322 VNRT | | 120 | PH | 0,029 | Sainz, 2007 |
| CXCL10 | rs4257674 | A/G | Intron | 139 | TPH | 0,001 | |
| | rs1554013 | C/T | Intron | 139 | TPH | 0,007 | Mezger,2008 |
| | rs3921 | C/G | 3' UTR | 139 | TPH | 0,003 | |
| TNF- α | rs1800629 | A/G | Intron | 39 | TPH | 0,01 | Sambatakau, 2006 |
| ING- γ | rs2069705 | C/T | Promotor | 139 | TPH | 0,01 | Mezger,2008 |
| Otros Genes | | | | | | | |
| Plasminogeno | rs4252125 | A/G | Coding exor | 194 | TPH | 0,001 | Zaas,2008(26) |
| S100B | rs9722 | C/T | 3' UTR | 223 | TPH | 0,001 | Cunha, 2011(19) |
| RAGE | rs1800624 | A/T | Intron | 223 | TPH | 0,04 | |
| MASP2 | rs72550870 | A/G | Coding exor | 106 | TPH | 0,002 | Granell, 2006 (42) |

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos, **TOS:** Trasplante de órganos sólidos **PH:** Paciente hematológico, **TLRs:** Toll like receptors, **Dectin-1:** Lectina de la superfamilia del tipo C, también denominada CLEC7A, **DC-SING:** Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin, **MBL:** Manosa de unión a lectinas PTX3:Pentaxatrina3, **IL1 β :** Interleuquina 1 β , **IL1 α :** Interleuquina 1 α , **DEF β 1:** 1 β Defensina, **IL10:** Interleuquina 10, **IL23R:** Receptor de la Interleuquina 23, **TNFR1:** TNF α receptor 1, **TNFR2:** TNF α receptor 2, **CXCL10:** Ligando-10 quemoquina CXC, **TNF α :** Factor α de necrosis tumoral, **ING γ :** Interferón γ , **S100B:** Proteínas del grupo S100 que fijan calcio, **RAGE:** Receptores de compuestos de glicosilación avanzada, **MASP2:** Lectina de unión a manosa asociada a proteasas de serina

JUSTIFICACIÓN

Existen diversos sistemas de defensa frente a hongos con mecanismos de acción que van desde simples barreras físicas hasta procesos tremendamente sofisticados y específicos. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado la selectiva acción de las células fagocíticas (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos) en el reconocimiento de los hongos. Estas células confieren un rápido reconocimiento de los conidios o hifas a través de una serie de receptores que reconocen patrones moleculares específicos lo que garantiza la iniciación primero de la respuesta inmune innata y después de la adaptativa. Cualquier defecto en la función fagocitaria incrementa enormemente el grado de susceptibilidad a este tipo de infecciones. Además de los fagocitos, muchos otros tipos celulares son importantes para una respuesta efectiva frente a hongos. Es importante, por ejemplo, el papel que desempeñan las células NK, los linfocitos T así como células no hematopoyéticas como las células epiteliales y endoteliales. Así mismo, es importante destacar el papel que juega la producción de una gran variedad de factores quemo-atrayentes para el posterior reclutamiento de leucocitos al sitio de infección entre los que se incluyen péptidos derivados de la ruta del complemento, quemoquinas, leucotrienos y ciertas citoquinas. Por último, no debemos obviar la actividad del complemento o la respuesta humoral frente a hongos cuyo papel está aún siendo investigado. Sin embargo, a pesar del creciente conocimiento de los mecanismos respuesta frente a hongos, todavía se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares que subyacen a la respuesta frente a estos patógenos. Recientes estudios en genética epidemiológica han demostrado una importante implicación de ciertas alteraciones genéticas en el control de la respuesta inmune y parece lógico, por tanto, pensar que la presencia de dichas alteraciones genéticas en puntos estratégicos del genoma pudiera determinar el grado con el que un paciente inmunocomprometido responde frente a infecciones por hongos e incluso el grado con el que un paciente responde a la terapia anti-fúngica. Conocer los patrones genéticos que determinan una mayor susceptibilidad a padecer aspergilosis invasiva podría ayudar a crear estrategias profilácticas individualizada adaptadas al riesgo de cada paciente e incluso optimizar el tratamiento de la enfermedad lo que probablemente nos conduciría a la obtención de una mejora en la respuesta clínica del paciente. En base a esta hipótesis varios grupos en Europa (entre ellos el nuestro) están ya trabajando en la identificación de biomarcadores genéticos asociados a la susceptibilidad a AI con notables resultados. Nos obstante, todos estos grupos han estado desarrollando su investigación mediante estudios casos-contrroles con poblaciones relativamente pequeñas y, generalmente, abordando el análisis de sólo unos pocos marcadores genéticos mediante estudios de genes candidato. Así pues, se hace necesario el soporte de iniciativas como el consorcio AspBIOmics del que nuestro grupo forma parte y que agrupa instituciones y e investigadores de reconocido prestigio en el campo para fortalecer la investigación en el área de la genómica de las infecciones fúngicas.

OBJETIVOS

1. Identificar mediante el análisis de polimorfismos genéticos en genes del sistema inmune los mecanismos moleculares que subyacen al riesgo a desarrollar Aspergilosis Invasiva.
2. Identificar la existencia de marcadores genéticos de susceptibilidad en pacientes de trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (considerados de alto riesgo).
3. Establecer el impacto funcional de las variantes genéticas consideradas de interés mediante ensayos funcionales *in vitro* en cultivos primarios.
4. Establecer un modelo que combine variables clínicas y variables genéticas que nos permita mejorar significativamente la capacidad de predecir el desarrollo de aspergilosis invasiva facilitando así la implementación de estrategias profilácticas y terapéuticas adaptadas al riesgo de cada paciente.

ANEXO PUBLICACIONES

ARTÍCULO PRIMERO

Dectin-1 and DC-SING Polymorphisms Associated with Invasive Pulmonary Aspergillosis Infection.

Introducción. Los RLC (receptores de lectinas tipo C) son receptores de membrana tipo II y se encuentran altamente expresados en macrófagos, CD y neutrófilos. Además, son un componente crucial en la respuesta proinflamatoria contra *AF*. El reconocimiento de las estructuras del hongo por las lectinas tipo C y la actividad quimiotáctica mediada por el eje CCL2/CCR2, serán puntos críticos en la respuesta inmune frente al hongo. El presente estudio fue diseñado para investigar si la presencia de polimorfismos dentro de los genes DC-SING, Dectin-1, Dectin-2, CCL2 y CCR2, estaba implicada en el riesgo a desarrollar AI

Métodos. Veintisiete polimorfismos fueron seleccionados por tagging y funcionalidad para ser genotipados en una población de estudio de 182 pacientes hematológicos de los cuales 57 fueron diagnosticados como AI probable o probada según los criterios de la EORTC/MSG del 2008.

Resultados. El análisis de asociación reveló que los portadores de los genotipos Dectin-1_{rs3901533_T/T} y Dectin-1_{rs7309123_G/G} y los portadores de los alelos CD-SING_{rs4804800_G}, DC-SING_{rs11465384_T}, DC-SING_{rs7248637_A} y DC-SING_{rs7252229_C} tenían un incremento significativo del riesgo a padecer AI (OR = 5,59 IC 95% 1,37-22,77; OR = 4,91 IC del 95% 1,52-15,89; OR = 2,75 IC del 95% 1,27 - 5,95; OR = 2,70 IC del 95% 1,24 - 5,90; OR = 2,39 IC del 95% 1,09 - 5,22 y OR = 2,05 IC del 95% 1,00 - 4,22, respectivamente). También se observó que existía un aumento de GM positivos en los pacientes portadores del alelo Dectin-1_{rs3901533_T} y del genotipo Dectin-1_{rs7309123_G/G}. También observamos que en donantes sanos con este último genotipo, existía una disminución en los niveles de expresión de RNAm de Dectin-1, en comparación con los portadores del alelo C, lo que sugiere que este polimorfismo puede estar afectando a los niveles de Dectin-1 y por lo tanto a la susceptibilidad del individuo a desarrollar AI. Análisis de interacción SNP-SNP revelaron diferentes modelos de interacción significativa con efecto sinérgico que incluían los genes Dectina-1, Dectina-2, CCL2 y CCR2. Aunque estos resultados deben ser validados en cohortes mayores, sugieren que los polimorfismos de los genes Dectin-1, Dectin-2, DC-SING, CCL2 y CCR2 influyen en el riesgo a desarrollar AI

Conclusiones. Este estudio sugiere que las variantes genéticas de Dectin-1, DC-SIGN, Dectin-2, CCL2 y CCR2 influyen en el riesgo a desarrollar AI y por lo tanto podrían ayudar a determinar la susceptibilidad a la infección y a desarrollar una profilaxis adaptada al riesgo del paciente.

Dectin-1 and DC-SIGN Polymorphisms Associated with Invasive Pulmonary Aspergillosis Infection

Juan Sainz^{1,2,3*}, Carmen Belén Lupiáñez^{1,3}, Juana Segura-Catena^{1,3}, Lourdes Vazquez⁴, Rafael Ríos^{1,3}, Salvador Oyonarte⁵, Kari Hemminki^{2,6}, Asta Försti^{2,6}, Manuel Jurado^{1,3}

1 Genomic Oncology Area, Genyo (Pfizer-University of Granada-Andalusian Government Centre for Genomics and Oncological Research), Granada, Spain, **2** Molecular Genetic Epidemiology Department, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany, **3** Haematology Department, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain, **4** Hematology Department, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain, **5** Blood Transfusion Regional Centre and Sectorial Tissue Bank, Granada, Spain, **6** Center for Primary Health Care Research, Clinical Research Center, Malmö, Sweden

Abstract

The recognition of pathogen-derived structures by C-type lectins and the chemotactic activity mediated by the CCL2/CCR2 axis are critical steps in determining the host immune response to fungi. The present study was designed to investigate whether the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) within *DC-SIGN*, *Dectin-1*, *Dectin-2*, *CCL2* and *CCR2* genes influence the risk of developing Invasive Pulmonary Aspergillosis (IPA). Twenty-seven SNPs were selected using a hybrid functional/tagging approach and genotyped in 182 haematological patients, fifty-seven of them diagnosed with proven or probable IPA according to the 2008 EORTC/MSG criteria. Association analysis revealed that carriers of the *Dectin-1*_{rs3901533} T/T and *Dectin-1*_{rs7309123} G/G genotypes and *DC-SIGN*_{rs4804800} G, *DC-SIGN*_{rs11465384} T, *DC-SIGN*_{rs7248637} A and *DC-SIGN*_{rs7252229} C alleles had a significantly increased risk of IPA infection (OR = 5.59 95%CI 1.37–22.77; OR = 4.91 95%CI 1.52–15.89; OR = 2.75 95%CI 1.27–5.95; OR = 2.70 95%CI 1.24–5.90; OR = 2.39 95%CI 1.09–5.22 and OR = 2.05 95%CI 1.00–4.22, respectively). There was also a significantly increased frequency of galactomannan positivity among patients carrying the *Dectin-1*_{rs3901533} T allele and *Dectin-1*_{rs7309123} G/G genotype. In addition, healthy individuals with this latter genotype showed a significantly decreased level of Dectin-1 mRNA expression compared to C-allele carriers, suggesting a role of the *Dectin-1*_{rs7309123} polymorphism in determining the levels of Dectin-1 and, consequently, the level of susceptibility to IPA infection. SNP-SNP interaction (epistasis) analysis revealed significant interactions models including SNPs in *Dectin-1*, *Dectin-2*, *CCL2* and *CCR2* genes, with synergistic genetic effects. Although these results need to be further validated in larger cohorts, they suggest that *Dectin-1*, *DC-SIGN*, *Dectin-2*, *CCL2* and *CCR2* genetic variants influence the risk of IPA infection and might be useful in developing a risk-adapted prophylaxis.

Citation: Sainz J, Lupiáñez CB, Segura-Catena J, Vazquez L, Ríos R, et al. (2012) Dectin-1 and DC-SIGN Polymorphisms Associated with Invasive Pulmonary Aspergillosis Infection. PLoS ONE 7(2): e32273. doi:10.1371/journal.pone.0032273

Editor: Woonin Lee, University of Kentucky, United States of America

Received: August 31, 2011; **Accepted:** January 24, 2012; **Published:** February 27, 2012

Copyright: © 2012 Sainz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants P08-CVI-4116 from Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (Sevilla, Spain) and PI081051 from Fondo de Investigaciones Sanitarias (Madrid, Spain). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: juan.sainz@genyo.es

Introduction

Invasive Pulmonary Aspergillosis (IPA) is a life-threatening infection caused mainly by *Aspergillus fumigatus*, an opportunistic fungal pathogen that frequently colonizes respiratory tracts and rapidly spreads to blood vessels and tissues [1]. The incidence of IPA infection has increased in the last years due to the use of immunosuppressive and immunomodulatory drugs and is still causing significant morbidity and mortality worldwide, especially in immunosuppressed and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) patients [2].

Early recognition of *A. fumigatus* by myeloid leukocytes is a crucial for down-stream immune response and conidia clearance and, therefore, in the development and progression of IPA infection [3]. Myeloid leukocytes are activated by pattern-recognition receptors (PRRs), which directly recognize fungal cell wall structures and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [4]. Among the PRRs expressed in neutrophils, pulmonary macrophages and dendritic cells, C-type lectin family

members such as *DC-SIGN* (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), *Dectin-1* (Dendritic cell-associated C-type lectin-1) and *Dectin-2* (Dendritic cell-associated C-type lectin-2) seem to be important in the effectiveness of innate immune response against *A. fumigatus* [5,6]. Recent studies have reported that the C-type lectins mediate *A. Fumigatus* recognition, capture and internalization [7] and that their binding to fungal cell wall carbohydrates is highly specific and selective [8]. *DC-SIGN* and *Dectin-1* recognize β -(1-3)-glucans and galactomannans (GM) in the cell wall of *A. fumigatus* [7,9] while *Dectin-2* interacts with α -mannans [10]. However, numerous studies have shown that C-type lectins are not only involved in the recognition of fungal pathogens but also in the induction of anti-fungal Th1 and Th17 immune responses [5,11].

Although the mechanisms underlying *DC-SIGN*-mediated immune response are still highly speculative, it has been suggested that *DC-SIGN* promotes dendritic cell (DC) migration and T-cell activation through the ICAM-3 binding [12,13] and modulates *TLR* signalling by targeting *Raf-1*, which regulates NF κ B p65

activation and, consequently the production of pro-inflammatory cytokines [14]. Likewise, *Dectin-1* and *Dectin-2* induce Syk-dependent canonical and noncanonical *NFκB* pathways [15,16] promoting the production of some pro-inflammatory cytokines (*IL1α*, *IL1β*, *IL12* and *IL8*), chemokines (*CCL2/MCP-1*, *CCL3/MIP-1*, *CXCL2/MIP-2* and *CXCL10*) [17] and the IL17-mediated neutrophil recruitment [18]. It has also been described that *Dectin-1* and *Dectin-2* are able to work in collaboration with *TLRs* (mainly *TLR2*, *TLR4* and *TLR6*) modulating immune responses through the production of *IL6*, *IL12p70* and *TNF* [3,16]. These findings support the hypothesis that C-type lectins, cytokines or chemokines are important mediators during infection with *A. fumigatus*.

Several polymorphisms in human PRRs [19–24] as well as in some cytokines [25–27], chemokines [28] and their receptors [29,30] have hitherto been associated with an increased risk of invasive aspergillosis in susceptible hosts. Based on these observations, the objective of the present study was to investigate the role of tagging and potentially functional single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located within the *DC-SIGN*, *Dectin-1*, *Dectin-2*, *MCP-1/CCL2* and *CCR2* genes on IPA susceptibility.

Materials and Methods

Study population and clinical diagnosis of IPA infection

All participants enrolled were Caucasian and recruited in the University Hospital Virgen de las Nieves (Granada, Spain) or in the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain). All determinations and genetic analyses in hematological patients were performed with fully informed written consent, and anonymity of the data was guaranteed. The study protocol was approved by the Ethical Review Committee of Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain. The population included 182 hematological patients recruited between January 2004 and January 2011. All hematological patients in this study received a prolonged chemotherapy treatment or underwent HSCT and were therefore considered susceptible to develop IPA infection. Demographic information and clinical data were obtained by detailed review of hospital records. Data were gathered on: site of infection; host factor criteria (severe neutropenia for >10 days, persistent fever for >96 h refractory to appropriate broad-spectrum antibacterial treatment, signs and symptoms indicating graft-versus-host disease [GVHD], corticoid therapy [>0.3 mg/kg per day], and invasive fungal infection during a previous episode of neutropenia), microbiological criteria (positive result for *Aspergillus* antigen in ≥ 2 consecutive blood samples when considering an index of 0.5 or in only 1 sample when the index was higher than 0.8), and clinical criteria of lower respiratory tract infection [major criteria: any of the following new infiltrates on computed tomography (CT) imaging: halo sign, air-crescent sign, or cavity within area of consolidation; minor criteria: cough, thoracic pain, hemoptysis, pathologic pulmonary sound, and radiological evidence suggestive of invasive infection]. Laboratory data were also recorded. Proven and probable IPA was diagnosed based on the updated criteria (2008) reported by the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group (EORTC/IFICG) [31].

Quantification of serum galactomannan antigen

Serum GM detection has been shown to be a useful test for the early diagnosis and follow-up of IPA and is now included in IPA diagnosis criteria [31]. In the present study, serum GM antigen was determined twice weekly during the hospital stay and at each outpatient visit until the end of their immunosuppressant or

chemotherapeutic treatment. Serum GM concentrations were determined by Platelia *Aspergillus* ELISA kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instructions. This commercial kit has proven to offer good sensitivity to detect GM [32], and GM concentration was found to correlate with the fungal tissue burden [33,34]. A test sample was classified as positive when the optical density ratio was ≥ 0.5 in two consecutive positive samples or >0.8 in a unique serum sample. A careful review of concomitant treatments (piperacillin-tazobactam or amoxicillin-clavulonic acid) in each patient was necessary to detect possible false-positive GM determinations. Likewise, tests were performed on the same day to avoid sample contamination and to ensure accuracy of results.

SNP selection and genotyping

Twenty-seven tagging/functional SNPs within *DC-SIGN*, *Dectin-1*, *Dectin-2*, *CCL2* and *CCR2* were selected to genotype the entire panel of individuals (Table 1). The aim of the SNP tagging was to identify a set of SNPs that efficiently tags all the known SNPs while the functional approach was used to determine the net impact of potentially functional variants within *DC-SIGN*, *Dectin-1*, *Dectin-2*, *CCL2* and *CCR2* genes on IPA risk. Tagging SNPs were selected using Haploview Tagger program (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>; <http://www.broad.mit.edu/mpg/tagger/>) and a pairwise tagging with a minimum r^2 of 0.8. In this selection we forced the inclusion of the *DC-SIGN*_{rs4804803}, *CCL2*_{rs1024610} and *CCL2*_{rs1024611} polymorphisms as their functionality has been suggested [35–37]. Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) Qiagen Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Genotyping of *DC-SIGN*, *Dectin-1*, *Dectin-2*, *CCL2* and *CCR2* polymorphisms was carried out using KASPar assays (KBiosciences, Hoddesdon, Hertfordshire, UK) in a 384-well plate format (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) where hematological patient samples were randomly distributed. KASPar reactions were performed using KASPar assay mix (containing probes) and KASPar kit containing 2× Reaction Mix and MgCl₂ (50 mM). PCR conditions were: denaturation at 94°C for 15 min, 10 cycles of denaturation at 94°C for 10 sec, annealing at 57°C for 5 sec and elongation at 72°C for 10 sec and 20 cycles of denaturation at 94°C for 10 sec, annealing at 57°C for 20 sec and elongation at 72°C for 40 sec. Recycling conditions were 94°C for 10 sec, annealing and elongation at 60°C for 60 sec. PCR products were analyzed with the ABI Prism 7900HT detection system using the SDS 2.4 software (Applied Biosystems). For internal quality control, about 5% of samples were randomly selected and included as duplicate. Concordance between the original and the duplicate samples for the 27 SNPs analyzed was $\geq 99.5\%$. Call rates for all SNPs were $\geq 97.8\%$ with the exception of the *Dectin-1*_{rs11053599} SNP with a call rate of 94.5%.

Statistical analysis

The Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) tests were performed in the control group (non-IPA patients) by a standard observed-expected chi-square (χ^2) test at each polymorphic site (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Unconditional logistic regression was used to assess the main effects of the genetic polymorphisms on IPA risk using co-dominant, dominant and recessive inheritance models. For each SNP, the more common allele in the control group was assigned as the reference category. All analyses were adjusted for age, gender, hematological malignancy and established risk factors for IPA infection (HSCT, neutropenia, GVHD and corticoid therapy use) and were conducted using the statistical software SSPS (version 14.0, SPSS

Table 1. Selected SNPs within DC-SIGN, Dectin-1, Dectin-2, CCL2 and CCR2 genes.

| Gene and SNP position | dbSNP rs# | Location | Aa change | Nucleotide substitution | Hypothetical function and/or reported associations | Reference |
|------------------------------|------------|--------------|-----------|-------------------------|--|--|
| DC-SIGN_c.-139 | rs2287886 | Promoter | - | A/G | Affects transcriptional activity and DC-SIGN mRNA expression level; associated with protection against IPA infection; associated with several infection and immune-related diseases such as HIV-1, Dengue, TB, parenteral infection, SARS, RA. | Sainz <i>et al.</i> 2010; Chang <i>et al.</i> 2010; Koizumi <i>et al.</i> 2007; Mezger <i>et al.</i> 2008; Kashima <i>et al.</i> 2009; Martin <i>et al.</i> 2004; Gómez <i>et al.</i> 2006 |
| DC-SIGN_c.-336 | rs4804803 | Promoter | - | A/G | Affects transcriptional activity and DC-SIGN mRNA expression; associated with risk of parenteral infection, HIV-1, HCV, dengue and tuberculosis. | Sakuntabhai <i>et al.</i> 2005; Martin <i>et al.</i> 2004 Barreiro <i>et al.</i> 2006; Ryan <i>et al.</i> 2010 |
| DC-SIGN_c.2797 | rs4804800 | 3'-UTR | - | A/G | 3'-UTR affecting RNA expression | - |
| DC-SIGN_c.342+2863 | rs8112310 | 5' near gene | - | A/T | Potential activity affecting DC-SIGN expression | - |
| DC-SIGN_IVS6 -326 | rs10410342 | Intron | - | C/G | Unknown | - |
| DC-SIGN_c.749-28 | rs11465384 | 3'-UTR | - | C/T | 3'-UTR affecting RNA expression | - |
| DC-SIGN_c.1974 | rs11465413 | 3'-UTR | - | A/T | 3'-UTR affecting RNA expression | - |
| DC-SIGN_IVS2+11 | rs7252229 | Intron | - | G/C | Unknown | - |
| DC-SIGN_c.898 | rs7248637 | 3'-UTR | - | A/G | 3'-UTR affecting RNA expression | - |
| DC-SIGN_c.2629 | rs11465421 | 3'-UTR | - | A/C | 3'-UTR affecting RNA expression | - |
| Dectin-1 (CLEC7A)_c.714 | rs16910526 | Coding exon | Y238X | A/C | Defective expression and lack of b-glucan recognition by Phagocytes; associated with increased <i>Aspergillus</i> and <i>Candida</i> colonization in hematopoietic transplant recipients | Ferwerda <i>et al.</i> 2009 Cunha <i>et al.</i> 2010; Platinga <i>et al.</i> 2009 |
| Dectin-1 (CLEC7A)_c.375-1148 | rs11053599 | Intron | - | A/C | Unknown | - |
| Dectin-1 (CLEC7A)_c.375-1404 | rs7309123 | Intron | - | C/G | Unknown | - |
| Dectin-1 (CLEC7A)_c.255+813 | rs3901533 | Intron | - | G/T | Unknown | - |
| Dectin-1 (CLEC7A)_c.104-520 | rs4763446 | Intron | - | C/T | Unknown | - |
| Dectin-1 (CLEC7A)_c.104-811 | rs16910631 | Intron | - | C/T | Unknown | - |
| Dectin-1 (CLEC7A)_c.103+732 | rs7311598 | Intron | - | A/G | Unknown | - |
| Dectin-2 (CLEC6A)_c.369+338 | rs7134303 | Intron | - | A/G | Unknown | - |
| Dectin-2 (CLEC6A)_c.122-425 | rs4264222 | Intron | - | C/T | Unknown | - |
| Dectin-2 (CLEC6A)_c.32-699 | rs4459385 | Intron | - | C/T | Unknown | - |
| CCL2 (MCP-1)_c.903 | rs4586 | Coding exon | C35C | C/T | Associated with an increased risk of TB | Thye <i>et al.</i> 2009 |
| CCL2 (MCP-1)_c.-2136 | rs1024610 | Promoter | - | A/T | Unknown | - |
| CCL2 (MCP-1)_c.-2518 | rs1024611 | Promoter | - | C/T | Correlate with MCP-1 mRNA expression; associated with increased risk to TB, HCV and HBV infections | Ganachari <i>et al.</i> 2010; Park <i>et al.</i> 2006; Flores-Villanueva <i>et al.</i> 2005; Mühlbauer <i>et al.</i> 2003 |
| CCL2 (MCP-1)_c.1543 | rs13900 | 3'-UTR | - | C/T | Unknown | - |
| CCR2_c.-1221 | rs3918358 | Promoter | - | A/C | Unknown | - |
| CCR2_c.667 | rs743660 | 3'-UTR | - | A/G | Associated with a decreased risk of Asthma | Kim <i>et al.</i> 2007 |
| CCR2_Ex2+241 | rs1799864 | Coding exon | V64I | A/G | Associated with slower progression to HIV | Smith <i>et al.</i> 1997 |

Abbreviations: UTR, untranslated region; TB, Tuberculosis; HCV, Hepatitis C virus; HBV, Hepatitis B virus; HIV-1, Human immunodeficiency virus-1; SARS, acute severe respiratory syndrome; RA, Rheumatoid arthritis.

doi:10.1371/journal.pone.0032273.t001

Table 2. Demographic and clinical data of IPA and non-IPA patients.

| | Patients with IPA (n = 57) | Patients without IPA (n = 125) | ‡ P values |
|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------|
| Demographic variables | | | |
| Age (range) | 48.98 (16-76) | 50.95 (16-78) | NS |
| Sex ratio (male/female) | 35/22 | 70/55 | NS |
| Hematological disease (%) | | | |
| AML | 27 (47.37) | 41 (32.80) | |
| ALL | 9 (15.79) | 12 (9.60) | |
| MM | 4 (7.02) | 20 (16.00) | |
| CML | 0 (0.00) | 2 (1.60) | |
| HL | 2 (3.51) | 15 (12.00) | |
| NHL | 8 (14.03) | 23 (18.40) | |
| AA | 3 (5.26) | 2 (1.60) | |
| CLL | 2 (3.51) | 6 (4.80) | |
| MDS | 2 (3.51) | 4 (3.20) | |
| EORTC/MSG 2008 classification | | | |
| Proven IPA | 13 (22.80) | - | |
| Probable IPA | 44 (77.20) | - | |
| Risk factors | | | |
| HSCT | 33 (57.90) | 53 (42.4) | NS |
| Severe neutropenia† | 45 (78.95) | 105 (84.00) | NS |
| Corticoid therapy | 14 (24.56) | 40 (32.00) | NS |
| GVHD | 8 (14.04) | 11 (8.80) | NS |

Abbreviations: NS, non-significant. HSCT: Hematopoietic stem cell transplantation, AML: acute myeloid leukemia, ALL: acute lymphoid leukemia, MM: Multiple Myeloma, CML: chronic myeloid leukemia, HL: Hodgkin's lymphoma, NHL: non-Hodgkin's lymphoma, AA: Aplastic anemia, CLL: chronic lymphocytic leukemia, MDS: myelodysplastic syndrome.

†: Severe neutropenia was defined as absolute neutrophil count <500 cells/mm³ for a period of more than 12 days. GVHD: graft versus host disease;

‡: p-values were calculated by student-t test for continuous- and Fishers exact test for binary data.

doi:10.1371/journal.pone.0032273.t002

Inc., Chicago, USA). All tests were considered to be statistically significant with a p value of <0.05.

Adjustment for multiple testing was carried out following a conservative threshold for statistical significance, based on a revised version of the Bonferroni method: we calculated for each gene the “number of effective independent variables” (M_{eff}) by use of the SNP Spectral Decomposition approach (<http://gump.qimr.edu.au/general/daleN/SNPSpDsuperlite/>) [38]. We obtained a study-wise M_{eff} value by adding up the gene M_{eff} 's.

SNPtool (http://www.dkfz.de/de/molgen_epidemiology/tools/SNPtool.html) [39] and the Haploview v4.2 software were used for LD blocks reconstruction and haplotype association statistics. Block structures were determined according to the method of Gabriel et al. [40].

Functional prediction of associated SNPs

We used the Web-based tool FastSNP [41] available at <http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw> for predicting the functional significance of the SNPs associated with IPA infection. FastSNP utilizes information from another online program PolyPhen (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/PolyPhen/>) and from four different web resources (TFSearch, ESEfinder, Rescue-ESE and FAS-ESS) to determine whether SNPs are located at exonic splicing regulatory sites, cause a non-conservative amino acid change or whether they alter the transcription factor-binding site of a gene (for instance, acting as intronic enhancer). The score was given by this tool on

the basis of levels of risk with a ranking of 0 (no effect), 1 (very low), 2 (low), 3 (medium), 4 (high), or 5 (very high).

RNA extraction, reverse transcription, and qPCR

Whole blood samples from 21 healthy donors were collected into PAXGENE RNA tubes and stored at -80°C until use. Total RNAs were extracted using a PAXGENE Blood RNA Isolation Kit (PreAnalytiX) and reverse transcribed to cDNA using QuantiTect Reverse Transcription Kit (catalog number: 205311; Qiagen). Real-time quantitative PCR was carried out using an ABI PRISM[®] 7500 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. Briefly, 2 μl of the cDNA were loaded in a PCR reaction containing 12.5 μl of $2\times$ QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix with an appropriate concentration of MgCl_2 , 2.5 μl of primers (Hs_CLE-C7A_1_SG QuantiTect Primer Assay, catalog number: QT00024059; Geneglobe, Qiagen) and 8 μl of RNase-free water. PCR cycling conditions were as follows: 95°C for 15 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds combined with annealing at 60°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 seconds. All samples were run in duplicate. Relative quantification of Dectin-1 mRNA expression was calculated with the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. We obtained the fold changes in gene expression normalized to an internal control gene (GAPDH, Hs_GAPDH_2_SG QuantiTect Primer Assay, Catalog number: QT01192646; Qiagen) and relative to one calibrator (First-

Table 3. DC-SIGN and Dectin-1 polymorphisms associated with susceptibility to Invasive Pulmonary Aspergillosis.

| Gene_rs number | Genotype | IPA patients (%) | Non-IPA patients (%) | OR (95% CI) ¹ | P-value | P-trend |
|--------------------|--------------|------------------|----------------------|--------------------------|---------|---------|
| DC-SIGN_rs4804800 | A/A | 32 (56.1) | 91 (72.8) | 1.00 | | |
| | A/G | 21 (36.8) | 31 (24.8) | 2.61 (1.17–5.86) | | |
| | G/G | 4 (7.0) | 3 (2.4) | 3.82 (0.68–21.50) | 0.031 | |
| | A/G+G/G | 25 (43.9) | 34 (27.2) | 2.75 (1.27–5.95) | 0.009 | |
| | per G allele | | | 2.29 (1.21–4.35) | | 0.01 |
| DC-SIGN_rs11465384 | C/C | 36 (63.2) | 99 (79.2) | 1.00 | | |
| | C/T | 21 (36.8) | 25 (20.0) | 2.80 (1.27–6.15) | | |
| | T/T | 0 (0.0) | 1 (0.8) | 0.00 (0.00–NA) | 0.029 | |
| | C/T+T/T | 21 (36.8) | 26 (20.8) | 2.70 (1.24–5.90) | 0.012 | |
| | per T allele | | | 2.45 (1.16–5.17) | | 0.019 |
| DC-SIGN_rs7248637 | G/G | 35 (62.5) | 95 (76.6) | 1.00 | | |
| | G/A | 19 (33.9) | 25 (20.2) | 2.46 (1.09–5.58) | | |
| | A/A | 2 (3.6) | 4 (3.2) | 1.90 (0.27–13.41) | 0.088 | |
| | G/A+A/A | 21 (37.5) | 29 (23.4) | 2.39 (1.09–5.22) | 0.028 | |
| | per A allele | | | 1.94 (1.01–3.74) | | 0.047 |
| DC-SIGN_rs7252229 | G/G | 30 (51.4) | 79 (63.7) | 1.00 | | |
| | G/C | 27 (47.1) | 41 (33.1) | 2.50 (1.19–5.29) | | |
| | C/C | 0 (0.0) | 4 (3.2) | 0.00 (0.00–NA) | 0.004 | |
| | G/C+C/C | 27 (47.1) | 45 (36.3) | 2.05 (1.00–4.22) | 0.049 | |
| | per C allele | | | 1.49 (0.78–2.84) | | 0.22 |
| Dectin-1_rs3901533 | G/G | 35 (61.4) | 77 (60.7) | 1.00 | | |
| | G/T | 14 (24.6) | 43 (33.9) | 0.57 (0.24–1.36) | | |
| | T/T | 8 (14.0) | 5 (5.4) | 5.59 (1.37–22.77) | 0.012 | |
| | G/G+G/T | 49 (86.0) | 120 (96.0) | 6.30 (1.56–25.37) | 0.007‡ | |
| | per T allele | | | 1.39 (0.80–2.42) | | 0.25 |
| Dectin-1_rs7309123 | C/C | 23 (40.4) | 49 (39.2) | 1.00 | | |
| | C/G | 21 (36.8) | 66 (52.8) | 0.81 (0.36–1.82) | | |
| | G/G | 13 (22.8) | 10 (8.0) | 4.91 (1.52–15.89) | 0.005 | |
| | C/C+C/G | 44 (77.2) | 115 (92.0) | 5.52 (1.86–16.39) | 0.001‡ | |
| | per G allele | | | 1.75 (1.01–3.01) | | 0.042 |

¹Models adjusted for age, gender, hematological malignancy, HSCT, neutropenia (defined as absolute neutrophil count <500 cells/mm³ for a period of more than 10 days), GVHD and corticoid therapy use (>0.3 mg/Kg/day).

‡Assuming a recessive model of inheritance. Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval. Differences in samples numbers are due to failures in genotyping. doi:10.1371/journal.pone.0032273.t003

Choice® Human Brain Reference RNA, catalog number: 6050; Applied Biosystems).

SNP-SNP interaction analysis

We also analyzed high-order interactions between SNPs using the multifactor dimensional reduction (MDR) constructive induction algorithm. A detailed explanation on the MDR method has been described elsewhere [42,43]. SNPs in LD (cut-off of $r^2 \sim 0.8$) were excluded from the MDR analysis. Cross-validation and permutation testing were used to identify the best models. All possible two-, three- and four-way SNP interactions were tested using 100-fold cross-validation and the exhaustive search. The model with the highest testing balanced accuracy (TA) and cross validation consistency (CVC) was selected as “best model”. Statistical significance was evaluated using a 1,000-fold permutation test to compare observed testing balanced accuracies with those expected under the null hypothesis of no association (using the MDR permutation testing module 0.4.9 alpha). MDR results

were considered statistically significant at the 0.05 level. Finally, interactions were visualized by constructing an interaction dendrogram according to the method described by Moore et al [43]. MDR software and MDR permutation testing module are open-source and freely available from <http://www.epistasis.org>.

Results

Population characteristics are described in Table 2. Compared to non-IPA, IPA cases were more likely to have cough and pathologic pulmonary sound ($p < 0.001$ and 0.011 , respectively) and presented more often pathological chest radiographies and CT scans ($p < 0.001$). Established risk factors for IPA infection such as HSCT, neutropenia, GVHD and corticoid therapy use were homogeneously distributed between IPA and non-IPA patient groups.

Fifty-seven patients were diagnosed with proven or probable IPA infection according to the revised EORTC/MSG criteria (2008). The association of risk of IPA infection with the individual

27 SNPs in the C-type lectin and chemokine genes is shown in the Table S1. All analyzed polymorphisms fulfilled Hardy-Weinberg expectations for the control group (non-IPA patients).

Several polymorphisms were found to be associated with IPA infection (Table 3). The *Dectin-1*_{rs3901533}, *Dectin-1*_{rs7309123} and *DC-SIGN*_{rs4804800} polymorphisms showed the strongest association with risk of IPA infection (OR_{T/T} = 5.59, 95%CI 1.37–22.77; OR_{G/G} = 4.91, 95%CI 1.52–15.89 and OR_{A/G+G/G} = 2.75, 95%CI 1.27–5.95, respectively). Additionally, carriers of the *DC-SIGN*_{rs11465384_T}, *DC-SIGN*_{rs7248637_A} and *DC-SIGN*_{rs7252229_C} alleles had a significantly increased risk of IPA infection (OR_{C/T+T/T} = 2.70, 95%CI 1.24–5.90; OR_{G/A+A/A} = 2.39, 95%CI 1.09–5.22; OR_{G/C+C/C} = 2.05, 95%CI 1.00–4.22, respectively) whereas patients carrying the *DC-SIGN*_{rs2287886_A} allele showed a tendency to be associated with a decreased risk of IPA infection (per-allele OR = 0.60, 95%CI 0.34–1.05) (Table 3 and Table S1). After correction for multiple testing using SNPSpD (number of independent marker loci, 21; $p = 0.05/21 = 0.002$), none of the SNPs retained significance although *Dectin-1*_{rs7309123} showed significance when the carrier status was analyzed (CC+CG vs. GG, $P = 0.001$; Table 3).

In order to assess the degree to which the selected SNPs and the positivity of GM correlated, we also performed lineal regression analysis. In the whole population, 3784 assays were performed in duplicate and 531 were considered as positive (14.03%). We found a significantly higher percentage of positive GM among patients

carrying the *Dectin-1*_{rs3901533_T} allele and among those patients bearing the *Dectin-1*_{rs7309123_G/G} genotype suggesting a role of these polymorphisms in determining a defective recognition and clearance of *Aspergillus* conidia (Figure 1). No correlation was observed for the polymorphisms within *DC-SIGN* that were associated with the infection.

We subsequently assessed whether SNPs associated with IPA infection showed capacity to change putative transcription factor binding sites using FastSNP. The predictive functional analysis suggested an intronic enhancer function for the *Dectin-1*_{rs7309123} SNP due to its location in transcription factor Cdx4 (caudal type homeo-box transcription factor 1) binding site (GAAAGAC; score 1–2). These data suggest a central role of the rs7309123 in the susceptibility to IPA infection. None of the remaining SNPs associated with IPA infection was predicted to affect transcription factor binding sites or splicing or to introduce a damaging amino acid change.

To explore the potential consequences of *Dectin-1*_{rs7309123} SNP, *Dectin-1* mRNA expression was measured in 21 healthy donors and was correlated with genotypes. Our results showed that subjects harbouring GG genotype showed a significantly decreased level of *Dectin-1* mRNA expression compared to C-allele carriers ($p < 0.001$; Figure 2). These results further supported our hypothesis suggesting that *Dectin-1*_{rs7309123_G} allele may disrupt binding sites for potential transcription factors.

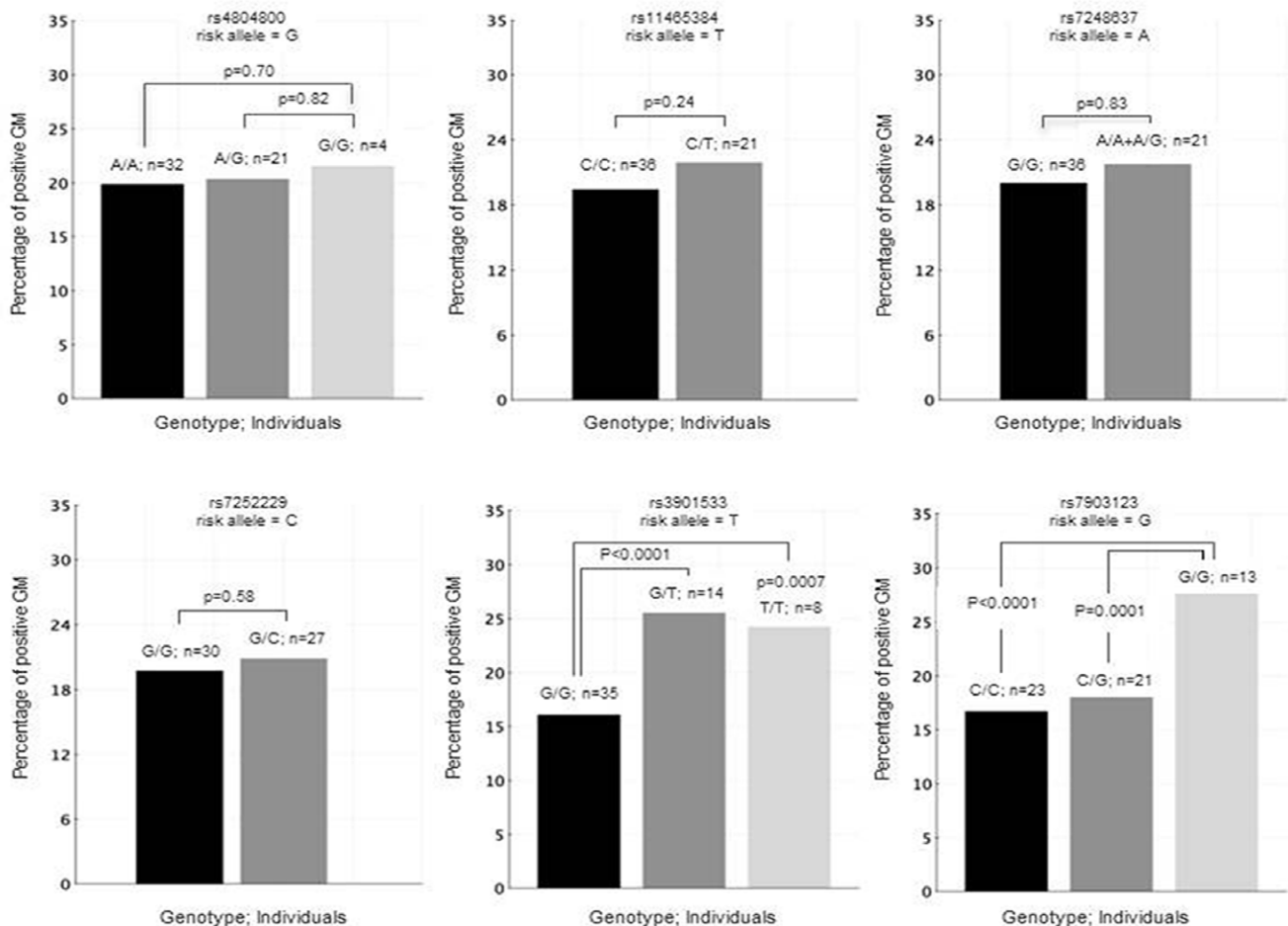


Figure 1. Distribution of positive galactomannan percentage by DC-SIGN and Dectin-1 genotypes.

doi:10.1371/journal.pone.0032273.g001

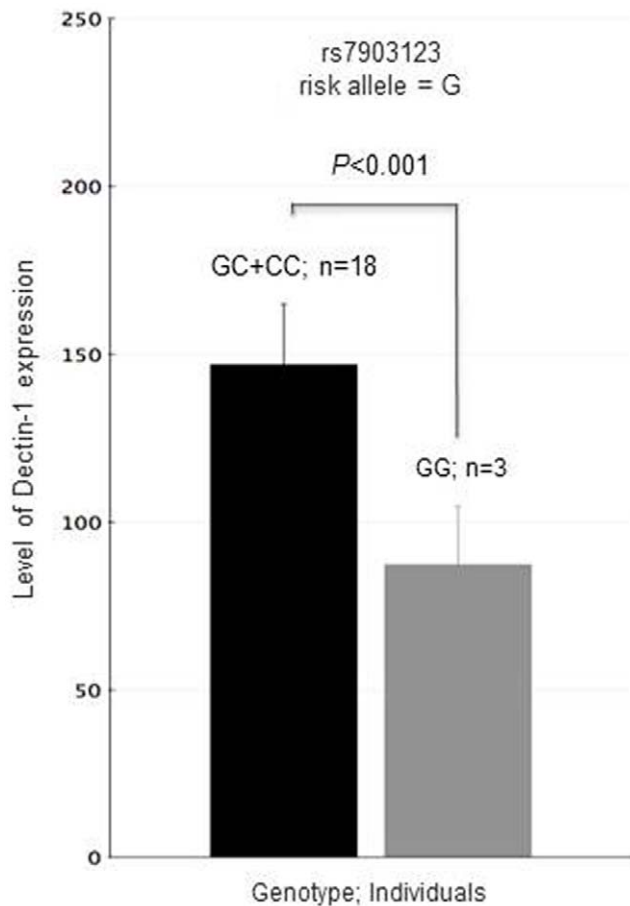


Figure 2. Correlation between Dectin-1_{rs7903123} genotype and expression of Dectin-1 as measured by quantitative PCR in total RNA from healthy donors (n = 21). Dectin-1 mRNA levels were normalized for GAPDH mRNA levels. FirstChoice[®]Human Brain Reference RNA was used as Calibrator (Ambion; Catalog number AM6050). doi:10.1371/journal.pone.0032273.g002

The MDR analysis of the SNPs tested revealed statistically significant interactions. Two SNPs (rs1024611 and rs4264222) were excluded from the MDR analysis as they were in LD with other SNPs using a cut-off value of $r^2 \sim 0.80$ in our sample set. The best interaction models selected by the TuRF filter algorithm along with its testing accuracy and cross-validation consistency are shown in Table 4. The overall best model with the highest cross-validation consistency (CVC) consisted of a model that included the *CCL2*_{rs4586}, *Dectin-1*_{rs3901533}, *CCR2*_{rs3918358} and *Dectin-2*_{rs7134303} SNPs. This model had a significant testing accuracy of 0.7735

(permutation $p < 0.001$) and a cross-validation consistency of 100/100. Of note is that two SNPs showing genetic interaction in this model were not significantly associated with an increased risk of IPA infection in the univariate analysis (*CCR2*_{rs3918358} and *Dectin-2*_{rs7134303}). The best two-locus model consisted of the *Dectin-1*_{rs3901533} and *DC-SIGN*_{rs4804800} SNPs, two variants that showed also association in the single-locus analysis. This model had a testing accuracy of 0.6409 and a cross-validation consistency of 76/100. This model was not any more significant after 1,000-fold permutation testing. However, the entropy based information gain calculated for this pair of SNPs indicated strong synergy, which may be interpreted as the two SNPs acting together to increase the risk of IPA infection. The best three-locus model included the *CCL2*_{rs4586}, *Dectin-1*_{rs3901533} and *Dectin-2*_{rs7134303} SNPs. In this model, testing accuracy raised to 0.7085 (permutation $p = 0.025$) whereas the cross-validation consistency was of 68/100. Figure 3 illustrates an interaction dendrogram that summarizes the estimates of interactions.

Discussion

The marked differences in susceptibility to IPA infection among hematological patients (with or without allo-HSCT) suggest that the effective immune response against *Aspergillus* is determined by both environmental and host genetic factors [44,45]. Studies on genetic polymorphisms in genes coding for components of the innate immunity have supported this hypothesis [19,23–30,46].

In this report, we studied the influence of the tagging and potentially functional polymorphisms of *DC-SIGN*, *Dectin-1*, *Dectin-2*, *CCL2/MCP-1* and *CCR2* in susceptibility to IPA infection in a Spanish population. Polymorphisms in these genes have been reported to influence a number of infectious diseases including HIV-1 [47–49], HTLV-1 [50], CMV [51], Tuberculosis [52–55], HCV [56,57], HBV [58], Dengue [35] and SARS [59] among others, revealing their potential role in host defense against pathogens.

We found that polymorphisms in *Dectin-1* (rs3901533 and rs7309123) and *DC-SIGN* (rs4804800, rs11465384, rs7248637 and rs7252229) were associated with an increased risk to develop IPA infection, which points towards their critical involvement in the pathogenesis of this invasive fungal infection. The highest risk of IPA infection was found for carriers of the *Dectin-1*_{rs3901533_T/T} and *Dectin-1*_{rs7309123_G/G} genotypes and the *DC-SIGN*_{rs4804800_G} allele. Patients carrying these genotypes/alleles had from 2 to 6 times increased risk of IPA infection. Additionally, patients carrying the *DC-SIGN*_{rs11465384_T}, *DC-SIGN*_{rs7248637_A} and *DC-SIGN*_{rs7252229_C} alleles showed a 2-fold increased risk in comparison with patients harboring the wild-type allele. Although it was not statistically significant, we also found that the *DC-SIGN*_{rs2287886} SNP may be associated with a reduced risk of IPA infection. Interestingly, this latter result was in agreement with our

Table 4. Multifactor dimensionality reduction analysis summary.

| Model | TA | P-value* | CVC |
|--|--------|----------|---------|
| 1 MCP-1 _{rs4586} | 0.5881 | NS | 59/100 |
| 2 Dectin-1 _{rs3901533} , DC-SIGN _{rs4804800} | 0.6409 | NS | 76/100 |
| 3 MCP-1 _{rs4586} , Dectin-1 _{rs3901533} , Dectin-2 _{rs7134303} | 0.7085 | 0.025 | 68/100 |
| 4 MCP-1 _{rs4586} , Dectin-1 _{rs3901533} , <i>CCR2</i> _{rs3918358} , Dectin-2 _{rs7134303} | 0.7735 | <0.001 | 100/100 |

TA, Testing accuracy; CVC, Cross-validation consistency.

*1000-fold permutation test.

doi:10.1371/journal.pone.0032273.t004

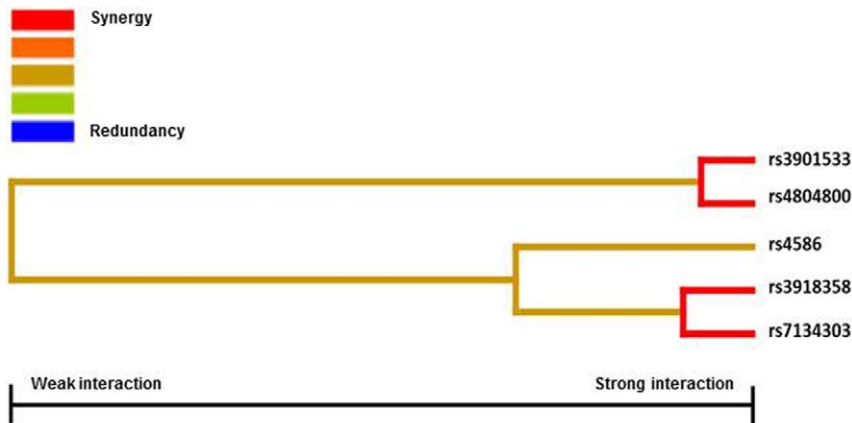


Figure 3. Interaction dendrogram generated by the MDR software. The interaction dendrogram was used to confirm, visualize, and interpret the interaction model. The MDR analysis was performed by using the open-source MDR software package. The colors used depict the degree of synergy, ranging from red (highest information gain) to blue (highest information redundancy). Note that the interaction between *Dectin-1* (rs3901533) and *DC-SIGN* (rs4804800) SNPs showed the highest degree of synergy (gain of information). doi:10.1371/journal.pone.0032273.g003

previously reported findings using the former EORTC/MSG classification criteria, 2005 [60]. The apparent effect of these SNPs on IPA susceptibility persisted even after adjustment for age, gender, hematological malignancy and several known risk factors (H SCT, neutropenia, GVHD and corticoid therapy use), indicating that *Dectin-1* and *DC-SIGN* variants contribute independently to the risk of infection.

Another interesting finding of this study was the significantly greater positive GM percentage of patients carrying the *Dectin-1*_{rs3901533_T} allele than those with the wild-type allele. Additionally, patients harboring the G/G genotype for the *Dectin-1*_{rs7903123} SNP showed an increased percentage of positive GM compared to those carrying the C allele (C/C+C/G). No differences were found when positive GM determinations were correlated with *DC-SIGN* polymorphisms. These data along with the remarkable degree of association of *Dectin-1* and *DC-SIGN* variants with risk of IPA infection provides a compelling evidence for a critical role for these PRRs in immune response to IPA infection. In this regard, numerous studies have shown that *Dectin-1* and *DC-SIGN* are not only involved in the recognition of fungal pathogens but also in the induction of anti-fungal Th1 and Th17 immune responses [5,11]. Mezger *et al.* also demonstrated that *Dectin-1* is involved in the induction of several pro-inflammatory cytokines, chemokines and immune receptors [18] while Werner *et al.* showed that *Dectin-1* is also regulating Th17-mediated immune response in the lungs [61]. Furthermore, Dennehy and Brown suggested a role of *Dectin-1* mediating its own signaling, as well as synergizing with TLRs to trigger NF κ B-mediated immune response against fungal pathogens [62].

Although it is now well recognized that SNPs in genes modulating immune response are likely to be determinants of host susceptibility to fungal infections, so far, little is known regarding the biological significance of these variants. In order to shed light into the potential functionality of *Dectin-1* (rs3901533 and rs7309123) and *DC-SIGN* (rs4804800, rs11465384, rs7248637, rs7252229 and rs2287886) variants, we investigated whether they were involved in disruption of a binding site for critical transcription factors that might influence transcription level of these genes. Our predictive analysis showed that the carriage of the C allele for the *Dectin-1*_{rs7309123} SNP creates a putative binding site for Cdx4, a relatively unknown transcription factor, which might be involved in the control of *Dectin-1* gene expression. To

assess whether the *Dectin-1*_{rs7309123} polymorphism might be associated with a decreased expression of *Dectin-1*, we correlated *Dectin-1* mRNA expression levels with *Dectin-1*_{rs7309123} genotypes. Interestingly, we observed that individuals harbouring the GG genotype showed a relatively lower expression than those carrying the C allele (CC+GC). These results further supported our hypothesis suggesting that *Dectin-1*_{rs7309123} SNP may have an effect on the *Dectin-1*-mediated recognition of *Aspergillus* conidia and subsequent immune responses. However, this predicted change in transcription activity is only suggestive at this stage and will need further validation using *in vitro* functional assays.

Several lines of evidence point to the relevance of epistatic effects in the etiology of complex diseases but, up to now, no studies have been carried out to analyze the presence of SNP-SNP interactions in IPA infection. For this reason, we decide to assess interactions among genetic polymorphisms within *DC-SIGN*, *Dectin-1*, *Dectin-2*, *CCL2* and *CCR2*, genes and the risk of IPA infection. The MDR approach used in this study was able to determine two multilocus combinations associated with high risk to develop IPA infection. Of the interactions identified, MDR indicated that the type of interaction in the two significant models was synergistic. These results support the hypothesis that multiple SNP-SNP interactions may play a role in determining the risk of IPA infection. This hypothesis is biologically plausible since the immune system would warrant prevention of fungal infection even when some genetic variants were present.

Recent population-based studies have even led to the identification of several SNPs involved in the early recognition of *Aspergillus* and associated them with an increased risk for invasive fungal infection. It has previously been suggested that SNPs within C-type lectin genes are associated with fungal infections. Platinga *et al.* (2009) and Cunha *et al.* (2010) suggested that patients carrying the Y238X (rs16910526) polymorphism in the *Dectin-1* gene were more likely to be colonized with *Aspergillus* and *Candida* species [19,63], compared with those harboring the wild-type allele. However, these results were not replicated in a very recent study [24]. In our study, such findings were neither evidenced even when H SCT and non-H SCT patients were analyzed separately (data not shown). This puzzling finding suggests that, although intronic polymorphisms within *Dectin-1* and *DC-SIGN* are indeed themselves a strong indication that these genes play an important role in the susceptibility to IPA infection, we cannot rule out the

possibility that these SNPs are part of a bigger haplotype containing important other genetic variants in the neighboring genes. In any case, because all these population-based studies have been conducted using relatively small cohorts, additional studies in larger set of patients are needed to definitely establish the role of these variants in the susceptibility to invasive fungal infection.

In summary, this study provides evidence of association between *Dectin-1* and *DC-SIGN* polymorphisms and the risk of IPA infection. By the inclusion of functional prediction analyses, the correlation of genotypes with positive GM determinations and *Dectin-1* mRNA expression levels, the study strongly supported the role of *Dectin-1* gene variants in determining susceptibility to IPA infection. Epistatic analyses also suggested the presence of a gene-gene interaction involving *Dectin-1* with *CCL2* and *CCR2* variants to determine IPA infection. Despite all these evidences, additional studies using larger cohorts will be necessary to confirm the effect of these polymorphisms on the susceptibility to IPA infection.

Supporting Information

Table S1 Associations of polymorphisms involved in the phagocyte-immune related response against *Aspergillus*

References

- Soubani AO, Chandrasekar PH (2002) The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest* 121: 1988–1999.
- Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L (2002) Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 100: 4358–4366.
- Luther K, Torosantucci A, Brakhage AA, Heesemann J, Ebel F (2007) Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the *Dectin-1* beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol* 9: 368–381.
- Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17: 593–623.
- Geijtenbeek TB, Gringhuis SI (2009) Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9: 465–479.
- Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, et al. (2005) The beta-glucan receptor *Dectin-1* recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 1: e42.
- Serrano-Gomez D, Dominguez-Soto A, Ancochea J, Jimenez-Heffernan JA, Leal JA, et al. (2004) Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 173: 5635–5643.
- Adams EL, Rice PJ, Graves B, Ensley HE, Yu H, et al. (2008) Differential high-affinity interaction of *Dectin-1* with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. *J Pharmacol Exp Ther* 325: 115–123.
- Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI (2001) Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 294: 2163–2166.
- Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, et al. (2010) *Dectin-2* recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity* 32: 681–691.
- Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, et al. (2009) *Dectin-1* directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through *Raf-1* and *Syk*. *Nat Immunol* 10: 203–213.
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, et al. (2000) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100: 575–585.
- Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, et al. (2002) Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol* 168: 1362–1371.
- den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB (2009) Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol Immunother* 58: 1149–1157.
- LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, et al. (2007) *Syk*- and *CARD9*-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8: 630–638.
- Saijo S, Iwakura Y (2011) *Dectin-1* and *Dectin-2* in innate immunity against fungi. *Int Immunol*.
- lus. ¹Models adjusted for age, gender, hematological malignancy, HSCT, neutropenia (defined as absolute neutrophil count <500 cells/mm³ for a period of more than 10 days), GVHD and corticoid therapy use (>0.3 mg/Kg/day). ‡ Assuming a recessive model of inheritance. Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval. Differences in samples numbers are due to failures in genotyping. (DOC)
- Reid DM, Gow NA, Brown GD (2009) Pattern recognition: recent insights from *Dectin-1*. *Curr Opin Immunol* 21: 30–37.
- Mezger M, Kneitz S, Wozniok I, Kurzai O, Einsele H, et al. (2008) Proinflammatory response of immature human dendritic cells is mediated by *Dectin-1* after exposure to *Aspergillus fumigatus* germ tubes. *J Infect Dis* 197: 924–931.
- Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, et al. (2010) *Dectin-1* Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood* 116: 5394–5402.
- Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, et al. (2008) Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 359: 1766–1777.
- Carvalho A, Pasqualotto AC, Pitzurra L, Romani L, Denning DW, et al. (2008) Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 197: 618–621.
- Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, Jaffe D, Hsu K, et al. (2005) TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 1062: 95–103.
- de Boer MG, Jolink H, Halkes CJ, van der Heiden PL, Kremer D, et al. (2011) Influence of polymorphisms in innate immunity genes on susceptibility to invasive aspergillosis after stem cell transplantation. *PLoS One* 6: e18403.
- Chai LY, de Boer MG, van der Velden WJ, Plantinga TS, van Spruiel AB, et al. (2011) The Y238X stop codon polymorphism in the human beta-glucan receptor *Dectin-1* and susceptibility to invasive aspergillosis. *J Infect Dis* 203: 736–743.
- Sainz J, Perez E, Gomez-Lopera S, Jurado M (2008) IL1 gene cluster polymorphisms and its haplotypes may predict the risk to develop invasive pulmonary aspergillosis and modulate C-reactive protein level. *J Clin Immunol* 28: 473–485.
- Sainz J, Hassan L, Perez E, Romero A, Moratalla A, et al. (2007) Interleukin-10 promoter polymorphism as risk factor to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Immunol Lett* 109: 76–82.
- Seo KW, Kim DH, Sohn SK, Lee NY, Chang HH, et al. (2005) Protective role of interleukin-10 promoter gene polymorphism in the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 36: 1089–1095.
- Mezger M, Steffens M, Beyer M, Manger C, Eberle J, et al. (2008) Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 111: 534–536.
- Sainz J, Salas-Alvarado I, Lopez-Fernandez E, Olmedo C, Comino A, et al. (2010) TNFR1 mRNA expression level and TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23: 423–436.
- Sainz J, Perez E, Hassan L, Moratalla A, Romero A, et al. (2007) Variable number of tandem repeats of TNF receptor type 2 promoter as genetic biomarker of susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Hum Immunol* 68: 41–50.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, et al. (2008) Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization

- for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46: 1813–1821.
32. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, et al. (2004) Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 190: 641–649.
 33. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, et al. (2004) Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 126: 852–860.
 34. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, et al. (2002) Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 186: 1297–1306.
 35. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, et al. (2005) A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet* 37: 507–513.
 36. Rovin BH, Lu L, Saxena R (1999) A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 344–348.
 37. McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, et al. (2005) CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation* 112: 1113–1120.
 38. Stephens M, Scheet P (2005) Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet* 76: 449–462.
 39. Chen B, Wilkening S, Drechsel M, Hemminki K (2009) SNP_tools: A compact tool package for analysis and conversion of genotype data for MS-Excel. *BMC Res Notes* 2: 214.
 40. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, et al. (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296: 2225–2229.
 41. Yuan HY, Chiou JJ, Tseng WH, Liu CH, Liu CK, et al. (2006) FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic Acids Res* 34: W635–641.
 42. Ritchie MD, Hahn LW, Moore JH (2003) Power of multifactor dimensionality reduction for detecting gene-gene interactions in the presence of genotyping error, missing data, phenocopy, and genetic heterogeneity. *Genet Epidemiol* 24: 150–157.
 43. Moore JH (2004) Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diagn* 4: 795–803.
 44. Ok M, Einsele H, Loeffler J (2011) Genetic susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infections. *Int J Med Microbiol* 301: 445–452.
 45. Asakura Y, Komatsu T (2009) Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis. *N Engl J Med*. pp 360–635; author reply 635–636.
 46. Zaas AK, Liao G, Chien JW, Weinberg C, Shore D, et al. (2008) Plasminogen alleles influence susceptibility to invasive aspergillosis. *PLoS Genet* 4: e1000101.
 47. Martin MP, Lederman MM, Hutcheson HB, Goedert JJ, Nelson GW, et al. (2004) Association of DC-SIGN promoter polymorphism with increased risk for parenteral, but not mucosal, acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 78: 14053–14056.
 48. Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, et al. (1997) Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 277: 959–965.
 49. Koizumi Y, Kageyama S, Fujiyama Y, Miyashita M, Lwembe R, et al. (2007) RANTES -28G delays and DC-SIGN -139C enhances AIDS progression in HIV type 1-infected Japanese hemophiliacs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23: 713–719.
 50. Kashima S, Rodrigues ES, Azevedo R, da Cruz Castelli E, Mendes-Junior CT, et al. (2009) DC-SIGN (CD209) gene promoter polymorphisms in a Brazilian population and their association with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *J Gen Virol* 90: 927–934.
 51. Mezger M, Steffens M, Semmler C, Arlt EM, Zimmer M, et al. (2008) Investigation of promoter variations in dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) (CD209) and their relevance for human cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem-cell transplantation. *Clin Microbiol Infect* 14: 228–234.
 52. Vannberg FO, Chapman SJ, Khor CC, Tosh K, Floyd S, et al. (2008) CD209 genetic polymorphism and tuberculosis disease. *PLoS One* 3: e1388.
 53. Ganachari M, Ruiz-Morales JA, Gomez de la Torre Pretell JC, Dinh J, Granados J, et al. (2010) Joint effect of MCP-1 genotype GG and MMP-1 genotype 2G/2G increases the likelihood of developing pulmonary tuberculosis in BCG-vaccinated individuals. *PLoS One* 5: e8881.
 54. Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH, Flores LM, Jo EK, et al. (2005) A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med* 202: 1649–1658.
 55. Barreiro LB, Neyrolles O, Babb CL, Tailleur L, Quach H, et al. (2006) Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS Med* 3: e20.
 56. Ryan EJ, Dring M, Ryan CM, McNulty C, Stevenson NJ, et al. (2010) Variant in CD209 promoter is associated with severity of liver disease in chronic hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 71: 829–832.
 57. Muhlbauer M, Bosserhoff AK, Hartmann A, Thasler WE, Weiss TS, et al. (2003) A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. *Gastroenterology* 125: 1085–1093.
 58. Park BL, Kim YJ, Cheong HS, Kim LH, Choi YH, et al. (2006) Association of common promoter polymorphisms of MCP1 with hepatitis B virus clearance. *Exp Mol Med* 38: 694–702.
 59. Chan KY, Xu MS, Ching JC, So TM, Lai ST, et al. (2010) CD209 (DC-SIGN) -336A>G promoter polymorphism and severe acute respiratory syndrome in Hong Kong Chinese. *Hum Immunol* 71: 702–707.
 60. Sainz J, Segura-Catena J, Jurado M (2010) [Association between genetic polymorphism in the promoter region of CD209 and propensity to develop invasive pulmonary aspergillosis]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 32 Suppl A: 9–13.
 61. Werner JL, Gessner MA, Lilly LM, Nelson MP, Metz AE, et al. (2011) Neutrophils produce IL-17A in a Dectin-1 and IL-23 dependent manner during invasive fungal infection. *Infect Immun*.
 62. Denmehy KM, Brown GD (2007) The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol* 82: 253–258.
 63. Plantinga TS, van der Velden WJ, Ferwerda B, van Spruel AB, Adema G, et al. (2009) Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased candida colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 49: 724–732.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Table S1. Associations of polymorphisms involved in the phagocyte-immune related response against *Aspergillus*.

| Gene_rs number | Genotype | IPA patients (%) | Non-IPA patients (%) | OR (95 CI) ¹ | p-value | p trend |
|--------------------|--------------|------------------|----------------------|-------------------------|---------|---------|
| DC-SIGN_rs2287886 | G/G | 30 (52.6) | 50 (40.3) | 1.00 | | |
| | A/G | 23 (40.4) | 62 (50.0) | 0.60 (0.29-1.27) | | |
| | A/A | 4 (7.0) | 12 (9.7) | 0.36 (0.10-1.34) | 0.190 | |
| | A/G+A/A | 27 (47.4) | 74 (59.7) | 0.55 (0.27-1.13) | 0.100 | |
| | per A allele | | | 0.60 (0.34-1.05) | | 0.069 |
| DC-SIGN_rs4804803 | A/A | 28 (49.1) | 70 (56.0) | 1.00 | | |
| | A/G | 26 (45.6) | 44 (35.2) | 2.01 (0.95-4.27) | | |
| | G/G | 3 (5.3) | 11 (8.8) | 0.56 (0.12-2.52) | 0.096 | |
| | A/G+G/G | 29 (50.9) | 55 (44.0) | 1.62 (0.80-3.29) | 0.180 | |
| | per G allele | | | 1.17 (0.68-2.02) | | 0.570 |
| DC-SIGN_rs4804800 | A/A | 32 (56.1) | 91 (72.8) | 1.00 | | |
| | A/G | 21 (36.8) | 31 (24.8) | 2.61 (1.17-5.86) | | |
| | G/G | 4 (7.0) | 3 (2.4) | 3.82 (0.68-21.50) | 0.031 | |
| | A/G+G/G | 25 (43.9) | 34 (27.2) | 2.75 (1.27-5.95) | 0.009 | |
| | per G allele | | | 2.29 (1.21-4.35) | | 0.009 |
| DC-SIGN_rs8112310 | T/T | 35 (61.4) | 77 (62.1) | 1.00 | | |
| | A/T | 19 (33.3) | 43 (34.7) | 1.01 (0.48-2.12) | | |
| | A/A | 3 (5.3) | 4 (3.2) | 2.11 (0.35-12.69) | 0.720 | |
| | A/T+A/A | 22 (38.6) | 47 (37.9) | 1.10 (0.54-2.23) | 0.800 | |
| | per A allele | | | 1.16 (0.63-2.14) | | 0.620 |
| DC-SIGN_rs10410342 | G/G | 53 (93.0) | 109 (87.2) | 1.00 | | |
| | C/G | 4 (7.0) | 13 (10.4) | 1.08 (0.28-4.14) | | |
| | C/C | 0 (0.0) | 2 (2.4) | 0.00 (0.00-NA) | 0.100 | |
| | C/G+C/C | 4 (7.0) | 16 (12.8) | 0.61 (0.17-2.14) | 0.430 | |
| | per C allele | | | 0.52 (0.19-1.46) | | 0.190 |
| DC-SIGN_rs11465384 | C/C | 36 (63.2) | 99 (79.2) | 1.00 | | |
| | C/T | 21 (36.8) | 25 (20.0) | 2.80 (1.27-6.15) | | |
| | T/T | 0 (0.0) | 1 (0.8) | 0.00 (0.00-NA) | 0.029 | |
| | C/T+T/T | 21 (36.8) | 26 (20.8) | 2.70 (1.24-5.90) | 0.012 | |

| | | | | | | |
|---------------------|--------------|-----------|------------|-------------------|-------|-------|
| | per T allele | | | 2.45 (1.16-5.17) | | 0.019 |
| DC-SIGN_rs11465413 | T/T | 42 (73.7) | 103 (82.4) | 1.00 | | |
| | A/T | 14 (24.6) | 22 (17.6) | 1.20 (0.50-2.86) | | |
| | A/A | 1 (1.8) | 0 (0.0) | 0.00 (0.00-NA) | 0.410 | |
| | A/T+A/A | 15 (26.3) | 22 (17.6) | 1.28 (0.55-3.02) | 0.570 | |
| | per A allele | | | 1.37 (0.61-3.10) | | 0.450 |
| DC-SIGN_rs7252229 | G/G | 30 (51.4) | 79 (63.7) | 1.00 | | |
| | G/C | 27 (47.1) | 41 (33.1) | 2.50 (1.19-5.29) | | |
| | C/C | 0 (0.0) | 4 (3.2) | 0.00 (0.00-NA) | 0.004 | |
| | G/C+C/C | 27 (47.1) | 45 (36.3) | 2.05 (1.00-4.22) | 0.049 | |
| | per C allele | | | 1.49 (0.78-2.84) | | 0.220 |
| DC-SIGN_rs7248637 | G/G | 35 (62.5) | 95 (76.6) | 1.00 | | |
| | G/A | 19 (33.9) | 25 (20.2) | 2.46 (1.09-5.58) | | |
| | A/A | 2 (3.6) | 4 (3.2) | 1.90 (0.27-13.41) | 0.088 | |
| | G/A+A/A | 21 (37.5) | 29 (23.4) | 2.39 (1.09-5.22) | 0.028 | |
| | per A allele | | | 1.94 (1.01-3.74) | | 0.047 |
| DC-SIGN_rs11465421 | A/A | 14 (24.6) | 30 (24.0) | 1.00 | | |
| | A/C | 30 (52.6) | 68 (54.4) | 1.11 (0.48-2.57) | | |
| | C/C | 13 (22.8) | 27 (21.6) | 1.23 (0.44-3.46) | 0.930 | |
| | A/C+C/C | 43 (75.4) | 95 (76.0) | 1.14 (0.51-2.55) | 0.740 | |
| | per C allele | | | 1.11 (0.66-1.86) | | 0.690 |
| Dectin-1_rs16910526 | A/A | 46 (83.6) | 102 (82.3) | 1.00 | | |
| | A/C | 9 (16.4) | 22 (17.7) | 1.14 (0.42-3.15) | 0.790 | |
| | | | | | | - |
| Dectin-1_rs11053599 | C/C | 41 (77.4) | 84 (70.6) | 1.00 | | |
| | A/C | 11 (20.8) | 33 (27.7) | 0.90 (0.37-2.15) | | |
| | A/A | 1 (1.9) | 2 (1.7) | 0.85 (0.07-10.68) | 0.960 | |
| | A/C+A/A | 12 (22.6) | 35 (29.4) | 0.89 (0.38-2.07) | 0.790 | |
| | per A allele | | | 0.90 (0.43-1.90) | | 0.790 |
| Dectin-1_rs7309123 | C/C | 23 (40.4) | 49 (39.2) | 1.00 | | |
| | C/G | 21 (36.8) | 66 (52.8) | 0.81 (0.36-1.82) | | |

| | | | | | | |
|---------------------|--------------|------------|-------------|-------------------|---------|-------|
| | G/G | 13 (22.8) | 10 (8.0) | 4.91 (1.52-15.89) | 0.005 | |
| | C/C+C/G | 44 (77.2) | 115 (92.0) | 5.52 (1.86-16.39) | 0.001 † | |
| | per G allele | | | 1.75 (1.01-3.01) | | 0.042 |
| Dectin-1_rs3901533 | G/G | 35 (61.4) | 77 (60.7) | 1.00 | | |
| | G/T | 14 (24.6) | 43 (33.9) | 0.57 (0.24-1.36) | | |
| | T/T | 8 (14.0) | 5 (5.4) | 5.59 (1.37-22.77) | 0.012 | |
| | G/G+G/T | 49 (86.0) | 120 (96.0) | 6.30 (1.56-25.37) | 0.007 † | |
| | per T allele | | | 1.39 (0.80-2.42) | | 0.250 |
| Dectin-1_rs4763446 | T/T | 41 (73.2%) | 97 (78.2%) | 1 | | |
| | C/T | 13 (23.2%) | 25 (20.2%) | 1.07 (0.45-2.51) | | |
| | C/C | 2 (3.6%) | 2 (1.6%) | 2.91 (0.29-29.23) | 0.660 | |
| | C/T+C/C | 15 (26.8%) | 27 (21.8%) | 1.18 (0.52-2.67) | 0.700 | |
| | per C allele | | | 1.25 (0.61-2.55) | | 0.540 |
| Dectin-1_rs16910631 | C/C | 46 (80.7%) | 103 (82.4%) | 1 | | |
| | C/T | 11 (19.3%) | 22 (17.6%) | 1.13 (0.44-2.90) | 0.810 | |
| | | | | | | - |
| Dectin-1_rs7311598 | A/A | 48 (84.2%) | 96 (76.8%) | 1 | | |
| | A/G | 8 (14%) | 26 (20.8%) | 0.70 (0.27-1.84) | | |
| | G/G | 1 (1.8%) | 3 (2.4%) | 0.72 (0.05-9.48) | 0.760 | |
| | A/G+G/G | 9 (15.8%) | 29 (23.2%) | 0.71 (0.28-1.78) | 0.450 | |
| | per G allele | | | 0.75 (0.33-1.68) | | 0.480 |
| Dectin-2_rs7134303 | A/A | 38 (66.7%) | 67 (54%) | 1 | | |
| | A/G | 17 (29.8%) | 49 (39.5%) | 0.61 (0.28-1.31) | | |
| | G/G | 2 (3.5%) | 8 (6.5%) | 0.28 (0.05-1.67) | 0.190 | |
| | A/G+G/G | 19 (33.3%) | 57 (46%) | 0.55 (0.26-1.15) | 0.110 | |
| | per G allele | | | 0.57 (0.31-1.07) | | 0.072 |
| Dectin-2_rs4264222 | C/C | 37 (64.9%) | 62 (49.6%) | 1 | | |
| | C/T | 18 (31.6%) | 55 (44%) | 0.58 (0.27-1.22) | | |
| | T/T | 2 (3.5%) | 8 (6.4%) | 0.28 (0.05-1.67) | 0.160 | |
| | C/T+T/T | 20 (35.1%) | 63 (50.4%) | 0.53 (0.26-1.09) | 0.086 | |
| | per T allele | | | 0.56 (0.30-1.03) | | 0.056 |
| Dectin-2_rs4459385 | | | | | | |

| | | | | | | |
|----------------|--------------|------------|------------|------------------|-------|-------|
| | C/C | 28 (50.9%) | 77 (62.6%) | 1 | | |
| | C/T | 22 (40%) | 38 (30.9%) | 1.46 (0.69-3.10) | | |
| | T/T | 5 (9.1%) | 8 (6.5%) | 2.14 (0.54-8.50) | 0.420 | |
| | C/T+T/T | 27 (49.1%) | 46 (37.4%) | 1.55 (0.76-3.17) | 0.230 | |
| | per T allele | | | 1.46 (0.83-2.57) | | 0.190 |
| CCL2_rs4586 | | | | | | |
| | T/T | 29 (50.9%) | 48 (38.4%) | 1 | | |
| | C/T | 18 (31.6%) | 61 (48.8%) | 0.58 (0.26-1.26) | | |
| | C/C | 10 (17.5%) | 16 (12.8%) | 1.24 (0.43-3.57) | 0.26 | |
| | C/T+C/C | 28 (49.1%) | 77 (61.6%) | 0.72 (0.35-1.45) | 0.35 | |
| | per C allele | | | 0.95 (0.57-1.56) | | 0.82 |
| CCL2_rs1024610 | | | | | | |
| | A/A | 31 (54.4%) | 70 (56%) | 1 | | |
| | T/A | 22 (38.6%) | 46 (36.8%) | 1.24 (0.59-2.62) | | |
| | T/T | 4 (7%) | 9 (7.2%) | 1.16 (0.30-4.51) | 0.85 | |
| | T/A+T/T | 26 (45.6%) | 55 (44%) | 1.23 (0.60-2.49) | 0.57 | |
| | per T allele | | | 1.15 (0.66-1.99) | | 0.63 |
| CCL2_rs1024611 | | | | | | |
| | A/A | 32 (56.1%) | 63 (50.4%) | 1 | | |
| | G/A | 24 (42.1%) | 53 (42.4%) | 1.17 (0.57-2.41) | | |
| | G/G | 1 (1.8%) | 9 (7.2%) | 0.24 (0.03-2.20) | 0.29 | |
| | G/A+G/G | 25 (43.9%) | 62 (49.6%) | 1.01 (0.50-2.01) | 0.98 | |
| | per G allele | | | 0.87 (0.48-1.56) | | 0.63 |
| CCL2_rs13900 | | | | | | |
| | C/C | 32 (57.1%) | 61 (48.8%) | 1 | | |
| | C/T | 23 (41.1%) | 56 (44.8%) | 1.02 (0.50-2.10) | | |
| | T/T | 1 (1.8%) | 8 (6.4%) | 0.23 (0.02-2.11) | 0.32 | |
| | C/T+T/T | 24 (42.9%) | 64 (51.2%) | 0.88 (0.44-1.78) | 0.73 | |
| | per T allele | | | 0.79 (0.43-1.43) | | 0.43 |
| CCR2_rs3918358 | | | | | | |
| | A/A | 26 (45.6%) | 67 (53.6%) | 1 | | |
| | A/C | 28 (49.1%) | 46 (36.8%) | 1.78 (0.83-3.80) | | |
| | C/C | 3 (5.3%) | 12 (9.6%) | 0.62 (0.12-3.22) | 0.22 | |
| | A/C+C/C | 58 (46.4%) | 58 (46.4%) | 1.54 (0.74-3.17) | 0.24 | |
| | per C allele | | | 1.19 (0.67-2.11) | | 0.56 |
| CCR2_rs743660 | | | | | | |
| | G/G | 30 (53.6%) | 73 (59.4%) | 1 | | |
| | A/G | 24 (42.9%) | 40 (32.5%) | 1.55 (0.73-3.28) | | |

| | | | | | | |
|----------------|-------------------------|------------|-------------|------------------|-------|-------|
| CCR2_rs1799864 | A/A | 2 (3.6%) | 10 (8.1%) | 0.55 (0.09-3.51) | 0.360 | |
| | A/G+A/A per A allele | 26 (46.4%) | 50 (40.6%) | 1.38 (0.67-2.85) | 0.390 | 0.690 |
| | G/G | 50 (87.7%) | 103 (82.4%) | 1 | | |
| | A/G | 7 (12.3%) | 21 (16.8%) | 0.73 (0.27-1.99) | | |
| | A/A | 0 (0%) | 1 (0.8%) | 0.00 (0.00-NA) | 0.40 | |
| | A/G+A/A per A allele | 7 (12.3%) | 22 (17.6%) | 0.67 (0.25-1.81) | 0.42 | 0.33 |
| | | | | 0.63 (0.25-1.62) | | |

¹Models adjusted for age, gender, hematological malignancy, HSCT, neutropenia (defined as absolute neutrophil count <500 cells/mm³ for a period of more than 10 days), GVHD and corticoid therapy use (>0.3mg/Kg/day). ‡ Assuming a recessive model of inheritance. Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval. Differences in samples numbers are due to failures in genotyping. Results in bold show p<0.05.

ARTÍCULO SEGUNDO

Polymorphisms in host immunity modulating genes and risk of invasive aspergillosis: Results from the aspBIOmics consortium

Introducción. La presencia de polimorfismos en genes inmunomoduladores ha sido asociada con el riesgo de varios tipos de cáncer, pero poco se conoce aún sobre el efecto que éstos tienen sobre el riesgo a desarrollar infecciones fúngicas como la Aspergilosis Invasiva (AI), una severa complicación clínica que presenta elevados índices de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos y sometidos a trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH). En base a estos antecedentes y en el contexto del consorcio internacional aspBIOmics, decidimos realizar un estudio de asociación para evaluar si la presencia de 36 polimorfismos potencialmente funcionales en los genes IL4, IL4R, IL8, IL8RA, IL8RB, IL10, IL12A, IL12B, IL13, IFNG, IFNGR2, CCR5, MIF y VEGF podría influir sobre el riesgo a desarrollar AI.

Métodos. Analizamos 36 polimorfismos en 14 genes inmunomoduladores asociados con el riesgo a sufrir AI y construimos un modelo predictivo con estas variantes capaz de evaluar el riesgo a infección. Se llevó a cabo un estudio de asociación de casos-controles en tres etapas, con 781 pacientes inmunocomprometidos, de los cuales 149 fueron diagnosticados con AI probada o probable de acuerdo a los criterios revisados de la EORTC/MSG.

Resultados. Nuestros análisis revelaron que los pacientes portadores de los polimorfismos en IL4R_{rs2107356} e IL8_{rs2227307} tenían un mayor riesgo a desarrollar la infección (OR=1.92 IC 95% 1.20 - 3.09 y OR=1.73 IC 95% 1.06 - 2.81). Mientras que los portadores de IL12B_{rs3212227} e IFN γ _{rs2069705} mostraban protección frente a desarrollar la enfermedad (OR=0.60 IC 95% 0.38 - 0.96; OR=0.63 IC 95% 0.41 - 0.97). Cabe destacar que en un análisis estratificado por trasplante, encontramos que los portadores de IL4R_{rs2107356} e IFN γ _{rs2069705} tenían un riesgo mayor a desarrollar AI (OR= 5.63 IC 95% 1.20 - 3.09; OR=0.24 IC 95% 0.10 - 0.59) que aquellos pacientes no trasplantados. Aunque ninguna de estas asociaciones superó la corrección por *multiple testing*, debemos destacar los resultados de IL4R_{rs2107356} e IFN γ _{rs2069705} en pacientes trasplantados (P=0.0009 y P=0.0011). Además, realizamos ensayos *in vitro*, donde observamos que los macrófagos de los portadores del alelo IFN γ _{rs2069705_C} mostraban una mayor actividad fungicida frente a los conidios de *Aspergillus* (P=0.0003) y bajo condiciones de estimulación, mostraban mayores niveles de IFN γ y de TNF α (P_{LPS-96h} = 0.057; P_{PHA-96h} = 0.036; P_{LPS+PHA-96h} = 0.030; P_{PHA-72h} = 0.045; P_{LPS+PHA-72h} = 0.018; P_{LPS-96h} = 0.058; P_{LPS+PHA-96h} = 0.0058 y mayores niveles de RNAm de IFN γ (P=0.049). También, encontramos que los linfocitos B CD19⁺ de los portadores del genotipo mutado IL4_{rs2107356_A/A} tendían a expresar niveles mayores de IL4R, frente a los portadores del genotipo WT (n=7; P=0.08). Aunque los portadores del genotipo IL4_{rs2107356_A/A} tendían a

tener una mayor expresión de IL4R en células T and monocitos, estos resultados no fueron estadísticamente significativos. Además, hallamos que los portadores del alelo IL12B_{rs3212227_C} mostraban un aumento en la producción de IL12p70 y los portadores del alelo IL12B_{rs3212227_C} tenían un aumento de los niveles de IFN γ . Mientras que análisis predictivos, los cuales incluían polimorfismos asociados significativamente con AI, nos mostraban una notable mejora en la habilidad para predecir la enfermedad frente a un modelo solo con variables clínicas y demográficas (AUROC=0.659 vs. AUROC=0.564, P_{-2log likelihood ratio test}=0.00052).

Conclusiones. Los resultados sugieren que variantes genéticas en genes inmunomoduladores pueden ser utilizados como marcadores para predecir la susceptibilidad a AI en pacientes hematológicos inmunocomprometidos o en pacientes sometidos a trasplante alogénico de médula ósea y para el diseño de nuevas estrategias profilácticas y de tratamiento.

Polymorphisms in Host Immunity-Modulating Genes and Risk of Invasive Aspergillosis: Results from the AspBIOmics Consortium

C. B. Lupiáñez,^{a,b} L. M. Canet,^{a,b} A. Carvalho,^{c,d} L. Alcazar-Fuoli,^e J. Springer,^f M. Lackner,^g J. Segura-Catena,^{a,b} A. Comino,^h C. Olmedo,^h R. Ríos,^{a,b} A. Fernández-Montoya,ⁱ M. Cuenca-Estrella,^e C. Solano,^j M. Á. López-Nevot,^k C. Cunha,^c A. Oliveira-Coelho,^c T. Villaescusa,^{l,m} L. Fianchi,ⁿ J. M. Aguado,^o L. Pagano,ⁿ E. López-Fernández,^b L. Potenza,^p M. Luppi,^p C. Lass-Flörl,^g J. Loeffler,^f H. Einsele,^f L. Vazquez,^l the PCRAGA Study Group, M. Jurado,^{a,b} J. Sainz^{a,b}

Genomic Oncology Department, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, PTS Granada, Granada, Spain^a; Hematology Department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain^b; Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal^c; ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal^d; Mycology Reference Laboratory, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^e; Universitätsklinikum Würzburg, Medizinische Klinik II, Würzburg, Germany^f; Division of Hygiene and Medical Microbiology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria^g; Experimental Research Unit, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain^h; Blood Transfusion Regional Centre and Sectorial Tissue Bank, Granada, Spainⁱ; Hematology Department, Clinic University Hospital of Valencia, Valencia, Spain^j; Immunology Department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain^k; Hematology Department, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain^l; Hematology Department, Jiménez Díaz Foundation, Madrid, Spain^m; Istituto di Ematologia, Università Cattolica del S. Cuore, Rome, Italyⁿ; Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario 12 de Octubre, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain^o; Department of Medical and Surgical Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, AOU Policlinico, Modena, Italy^p

Recent studies suggest that immune-modulating single-nucleotide polymorphisms (SNPs) influence the risk of developing cancer-related infections. Here, we evaluated whether 36 SNPs within 14 immune-related genes are associated with the risk of invasive aspergillosis (IA) and whether genotyping of these variants might improve disease risk prediction. We conducted a case-control association study of 781 immunocompromised patients, 149 of whom were diagnosed with IA. Association analysis showed that the *ILAR*_{rs2107356} and *IL8*_{rs2227307} SNPs (using dbSNP numbering) were associated with an increased risk of IA (*ILAR*_{rs2107356} odds ratio [OR], 1.92; 95% confidence interval [CI], 1.20 to 3.09; *IL8*_{rs2227307} OR, 1.73; 95% CI, 1.06 to 2.81), whereas the *IL12B*_{rs3212227} and *IFN γ* _{rs2069705} variants were significantly associated with a decreased risk of developing the infection (*IL12B*_{rs3212227} OR, 0.60; 95% CI, 0.38 to 0.96; *IFN γ* _{rs2069705} OR, 0.63; 95% CI, 0.41 to 0.97). An allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT)-stratified analysis revealed that the effect observed for the *ILAR*_{rs2107356} and *IFN γ* _{rs2069705} SNPs was stronger in allo-HSCT (*ILAR*_{rs2107356} OR, 5.63; 95% CI, 1.20 to 3.09; *IFN γ* _{rs2069705} OR, 0.24; 95% CI, 0.10 to 0.59) than in non-HSCT patients, suggesting that the presence of these SNPs renders patients more vulnerable to infection, especially under severe and prolonged immunosuppressive conditions. Importantly, *in vitro* studies revealed that carriers of the *IFN γ* _{rs2069705C} allele showed a significantly increased macrophage-mediated neutralization of fungal conidia ($P = 0.0003$) and, under stimulation conditions, produced higher levels of gamma interferon (IFN γ) mRNA ($P = 0.049$) and IFN γ and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) cytokines (P value for 96 h of treatment with lipopolysaccharide [$P_{LPS-96\text{ h}}$], 0.057; P value for 96 h of treatment with phytohemagglutinin [$P_{PHA-96\text{ h}}$], 0.036; $P_{LPS+PHA-96\text{ h}} = 0.030$; $P_{PHA-72\text{ h}} = 0.045$; $P_{LPS+PHA-72\text{ h}} = 0.018$; $P_{LPS-96\text{ h}} = 0.058$; $P_{LPS+PHA-96\text{ h}} = 0.0058$). Finally, we also observed that the addition of SNPs significantly associated with IA to a model including clinical variables led to a substantial improvement in the discriminatory ability to predict disease (area under the concentration-time curve [AUC] of 0.659 versus AUC of 0.564; $P_{-2\text{ log likelihood ratio test}} = 5.2 \cdot 10^{-4}$ and $P_{50,000\text{ permutation test}} = 9.34 \cdot 10^{-5}$). These findings suggest that the *IFN γ* _{rs2069705} SNP influences the risk of IA and that predictive models built with *IFN γ* , *IL8*, *IL12p70*, and *VEGFA* variants can be used to predict disease risk and to implement risk-adapted prophylaxis or diagnostic strategies.

Invasive aspergillosis (IA) is a life-threatening infection caused by *Aspergillus* spp. that affects acute myelogenous leukemia (AML) and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) patients (1–3). Despite recent improvements in the prophylaxis and treatment of IA, its incidence and attributable mortality rates remain unacceptably high even among those individuals who lack established risk factors (4, 5).

The initial immune response against fungal pathogens such as *Aspergillus fumigatus*, the principal pathogenic species, relies mainly on phagocytes and on endothelial and epithelial cells that recognize this fungal pathogen through pattern recognition receptors (PRRs), leading to phagocytosis, antigen presentation, and the production of specific cytokines and chemokines (6, 7). There are different families of PRRs, including C-type lectin receptors (CLRs), Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors (RLRs), and NOD-like receptors (NLRs), that, in response to *Aspergillus* pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), activate Th₁, Th₂, and Th₁₇-related signaling cascades on phagocytes and nonprofessional immune cells (8–12). These intracellular molecular pathways culminate in the production of both proinflammatory (13–18) and anti-inflammatory cytokines (19,

20) and certain chemokines and their receptors (21–23), as well as in the release of certain proangiogenic factors, such as *VEGFA* and

Received 31 October 2015 Returned for modification 29 November 2015

Accepted 5 December 2015

Accepted manuscript posted online 14 December 2015

Citation Lupiáñez CB, Canet LM, Carvalho A, Alcazar-Fuoli L, Springer J, Lackner M, Segura-Catena J, Comino A, Olmedo C, Ríos R, Fernández-Montoya A, Cuenca-Estrella M, Solano C, López-Nevot MÁ, Cunha C, Oliveira-Coelho A, Villaescusa T, Fianchi L, Aguado JM, Pagano L, López-Fernández E, Potenza L, Luppi M, Lass-Flörl C, Loeffler J, Einsele H, Vazquez L, PCRAGA Study Group, Jurado M, Sainz J. 2016. Polymorphisms in host immunity-modulating genes and risk of invasive aspergillosis: results from the AspBIOmics Consortium. *Infect Immun* 84:643–657. doi:10.1128/IAI.01359-15.

Editor: G. S. Deepe, Jr., University of Cincinnati

Address correspondence to J. Sainz, juan.sainz@genyo.es.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01359-15>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

bFGF (17, 24), which are also key determinants in the immune response against *Aspergillus* spp.

Although both innate and adaptive immune responses against *A. fumigatus* have been extensively characterized (25, 26), it remains unclear why some immunocompromised subjects develop invasive or disseminated fungal infections while others under similar clinical conditions do not. The remarkable genetic variation of immune genes suggests that the presence of specific genetic variants in these genes influences their biological functions and, consequently, affect the risk of developing invasive fungal infections, such as IA. In support of this hypothesis, recent studies on genetic susceptibility have successfully identified several genetic variants on PRR genes (*DC-SIGN*, *Dectin-1*, *TLRs*, *PTX3*, and *MBL*) (27–40), cytokines (*IL1* gene cluster, *IL10*, *IL12*, and *IFN γ*) (32, 41–44), chemokines (*CXCL10*) (45), and immune receptors (*TNFR1* and *TNFR2*) (46, 47) as factors influencing the risk of developing IA. With this background, the purpose of this study was to comprehensively assess whether the presence of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) within 14 immune-modulating genes (*IL4*, *IL4R*, *IL8*, *IL8RA*, *IL8RB*, *IL10*, *IL12A*, *IL12B*, *IL13*, *IFN γ* , *IFN γ R2*, *CCR5*, *MIF*, and *VEGF*) influence the risk of developing IA. We also decided to evaluate the functional role of key variants in modulating immune responses and whether selected polymorphisms could be used to predict the disease risk.

MATERIALS AND METHODS

Study design and study population. We analyzed whether 36 SNPs within 14 immune-modulating genes were associated with IA. SNP selection was based on three criteria: (i) SNPs within immunoregulatory genes that may affect immune responses, (ii) SNPs having laboratory evidence of a biological function, and/or (iii) SNPs previously reported as being associated with infectious diseases (Table 1). SNPs were genotyped using KASPar assays (LGC Genomics KBioscience, London, United Kingdom) as previously described in detail (28). Patients were included either if they were undergoing allo-HSCT or if they had been diagnosed with acute myeloid leukemia (AML) or acute lymphoid leukemia (ALL) and were receiving intensive remission-induction chemotherapy. A total of 593 patients were recruited between February 2010 and March 2014 through the aspBIOmics Consortium (www.aspbiomics.eu) and through two Spanish medical institutions (University Hospital of Salamanca and Clinic University Hospital of Valencia) and a Spanish multicenter clinical trial (PCRAGA; EU clinical trial number 2010-019406-17) (48). Based on microbiological and clinical data, 113 patients were diagnosed with proven or probable IA according to the revised EORTC/MSG criteria (49). In order to further confirm significant associations identified in our population, we extended the analysis to a second patient group consisting of 188 high-risk patients (36 IA patients and 152 without IA) (Table 2) recruited from two Italian medical institutions (Università Cattolica del S. Cuore, Rome, and University of Modena and Reggio Emilia, AOU Policlinico, Modena) and from the Virgen de las Nieves University Hospital (Granada, Spain) between January 2013 and January 2015. This ambitious study design provided a population of 781 high-risk patients, 149 of whom were diagnosed with proven and probable IA (19 proven and 130 probable IA). To our knowledge, this is one of the largest populations recruited so far for exploring genetic susceptibility to IA. The study was approved by the ethical review boards of each participating institution.

Statistical analysis. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) tests were performed on the uninfected control group by a standard observed-expected chi-square (χ^2) test. Logistic regression analyses adjusted for age, gender, country of origin, allo-HSCT status, and receipt or nonreceipt of antifungal prophylaxis were performed to determine significant associations with IA risk. SNPtool (50) and Haploview were used for linkage disequilibrium (LD) block reconstruction and haplotype association sta-

tistics. Block structures were determined according to the method of Gabriel et al. (51). In order to account for multiple testing, we calculated an adjusted significance level using the Meff method (52), which considers the number of independent marker loci ($M_{\text{effLi}} = 31$) and the number of models of inheritance tested (codominant, dominant, recessive, and log additive). Detailed information about this method of multiple testing correction is freely available online at <http://neurogenetics.qimrberghofer.edu.au/SNPSPDLite>. Thus, the resulting threshold for the main-effect analysis was 0.0004 (the quotient of $[0.05/31]/4$).

Cell isolation and differentiation. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and monocytes were isolated from whole blood collected from healthy donors after written informed consent was obtained (PI12/02688 and SECVS 014/2015 protocols). PBMCs were isolated by gradient centrifugation using Ficoll-Paque plus (GE Healthcare Bio-Sciences), and monocytes were isolated by immunomagnetic selection of CD14⁺ cells (Miltenyi Biotec). The purity of the obtained CD14⁺ population was assessed by fluorescence-activated cell sorting analysis. Monocytes then were plated at a density of 5×10^5 cells/ml in 24-well plates and cultivated for 7 days in complete RPMI 1640 medium supplemented with human serum and 20 ng/ml of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) to allow differentiation into macrophages. The culture medium was replaced every 3 days. Genotyping of significant SNPs was performed, and either PBMCs or monocytes were grouped according to the genotype of interest.

Assessment of fungicidal activity. Human monocyte-derived macrophages were infected with conidia from *Aspergillus fumigatus* at an effector-to-target ratio of 1:10. To measure the fungicidal ability, macrophages were allowed to kill the ingested conidia for 2 h. Serial dilutions of macrophage lysates were plated on solid growth media, and following a 2-day incubation, the number of CFU was enumerated and the percentage of CFU inhibition calculated. In order to avoid a bias due to differences in internalization rates, the supernatants collected after the coculture were plated and compared among different donors.

IL12p70 and IFN γ stimulation assays. *IL12p70* and *IFN γ* stimulation assays were performed in PBMCs from healthy donors according to a previously reported protocol (53). PBMCs were selected according to the genotypes of *IL12B* allele rs3212227 (*IL12B*_{rs3212227}) and *IFN γ* _{rs2069705} (using dbSNP numbering) and were cultured in 2 ml of RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% sterile heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and an antibiotic mixture containing penicillin, streptomycin, and neomycin (Gibco/Life Technologies) at 37°C in 5% CO₂. PBMCs from healthy subjects harboring the *IFN γ* _{rs2069705T/T} ($n = 8$), *IFN γ* _{rs2069705C/T} ($n = 8$), and *IFN γ* _{rs2069705C/C} ($n = 3$) genotypes were incubated for 72 h and 96 h with phytohemagglutinin (PHA; 2 μ g/ml) alone or in combination with lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/ml), and gamma interferon (IFN γ), interleukin-12p70 (IL12p70), tumor necrosis factor (TNF), and IL8 levels were determined in triplicate using the Procartaplex multiplex immunoassay (Affymetrix/eBioscience) according to the manufacturer's recommendations. In parallel, PBMCs bearing the *IL12B*_{rs3212227A/A} ($n = 13$), *IL12B*_{rs3212227A/C} ($n = 3$), and *IL12B*_{rs3212227C/C} ($n = 1$) genotypes were treated for 24 h and 48 h with zymosan (5 μ g/ml) alone or in combination with LPS (100 ng/ml), and the correlation of cytokine levels with the *IL12B*_{rs3212227} or *IL8*_{rs3212227} SNP also was analyzed. After the incubation period, supernatants were collected and stored at -80°C until cytokine measurement.

Analysis of *IL4R* and *IFN γ* mRNA expression. We measured *IL4R* and *IFN γ* mRNA gene expression in blood samples collected from healthy blood donors but also from monocyte-derived macrophages at baseline and after stimulation with conidia from *A. fumigatus* at an effector-to-target ratio of 1:2 for 8 h. Total RNA from blood or monocyte-derived macrophages was extracted using an RNeasy minikit (Qiagen) and reverse transcribed with the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR was performed in an Applied Biosystems 7500HT fast system using TaqMan probe-based gene expression technology (Life Technologies) according to the manufactur-

TABLE 1 Selected SNPs within immune-modulating genes

| Gene name | Gene designation (_SNP formatting) | dbSNP no. | Nucleotide substitution | Amino acid change/location | Reported association(s) with infectious diseases/ reported or potential functionality | Reference(s) |
|---|---------------------------------------|-----------|----------------------------|-------------------------------|---|--------------|
| <i>Interleukin 4 (IL4)</i> | <i>IL4_-1098</i> | rs2243248 | G/T | Promoter | Associated with chronic disseminated candidiasis | 71 |
| | <i>IL4_Ex1-168</i> | rs2070874 | C/T | Intronic | Unknown | |
| | <i>IL4_IVS2-1443</i> | rs2243268 | A/C | Intronic | Unknown | |
| | <i>IL4_IVS3-9</i> | rs2243290 | A/C | Intronic | Unknown | |
| <i>Interleukin 4 receptor (IL4R)</i> | <i>IL4R_-29429(-3223)</i> | rs2057768 | A/G | Promoter | Associated with soluble IL4R protein levels | 72 |
| | <i>IL4R_-28120(-1914)</i> | rs2107356 | A/G | Promoter | Unknown | |
| | <i>IL4R_Ex11+828</i> | rs1801275 | A/G | Q576R | Associated with enhanced responsiveness to IL4 | 73, 74 |
| <i>Interleukin 8 (IL8)</i> | <i>IL8_-251</i> | rs4073 | A/T | Promoter | Associated with increased levels of IL8 and susceptibility to bacterial urinary tract infection, recurrent <i>Clostridium difficile</i> infection, AIDS, <i>Helicobacter pylori</i> -related gastric diseases, and mycetoma | 75–78 |
| | <i>IL8_IVS1+230(+396)</i> | rs2227307 | G/T | Intronic | Associated with susceptibility to periodontitis | |
| <i>CXC-chemokine receptor 1 (IL8RA)</i> | <i>CXCR1_Ex2+860</i> | rs2234671 | G/C | S276T | Associated with chronic hepatitis B virus infection; predicted to affect IL8 signaling (classified as benign by Polyphen ^a) | 80 |
| <i>CXC-chemokine receptor 2 (IL8RB)</i> | <i>CXCR2_Ex3-1010</i> | rs1126580 | A/G | Intronic | Unknown | |
| <i>Interleukin 10 (IL10)</i> | <i>IL10_IVS1-286</i> | rs3024491 | G/T | Intronic | Unknown | 81 |
| | <i>IL10_Ex5+210</i> | rs3024496 | C/T | Intronic | IL10_Ex5+210G allele is associated with decreased production of IL10 by peripheral blood leukocytes in response to helminth infection | |
| <i>Interleukin 12 alpha (IL12A)</i> | <i>IL12A_IVS2-798</i> | rs582054 | A/T | Intronic | Unknown | |
| <i>Interleukin 12 beta (IL12B)</i> | <i>IL12B_Ex8+159(+1188)</i> | rs3212227 | A/C | Intronic | IL12B_+1188C allele is associated with an increased risk of lepromatous leprosy | 82 |
| <i>Interleukin 13 (IL13)</i> | <i>IL13_-1069</i> | rs1800925 | C/T | Promoter | Alters expression of <i>IL13</i> and binding of nuclear factors to the <i>IL13</i> promoter; associated with increased risk of severe respiratory syncytial virus infection | 83, 84 |
| | <i>IL13_Ex4+98</i> | rs20541 | C/T | R144Q | Modifies <i>IL13</i> -mediated Th2 effector functions and correlates with <i>IL13</i> activity and levels (114Q carriers have higher levels of <i>IL13</i> than 144R carriers) | |
| | <i>IL13_IVS3-24</i> | rs1295686 | A/G | Intronic | Unknown | |
| <i>Interferon gamma (IFNγ)</i> | <i>IFNG_-1615</i> | rs2069705 | C/T | Promoter | Associated with a reduced risk of IA | 45 |
| | <i>IFNG_IVS3+284(+2109)</i> | rs1861494 | C/T | Intronic | Unknown | |
| <i>Interferon gamma receptor 2 (IFNγR2)</i> | <i>IFNGR2_Ex7-128</i> | rs1059293 | C/T | Intronic | Unknown | |
| | <i>IFNGR2_Ex2-16</i> | rs9808753 | A/G | Q64R | Predicted to affect <i>IFNγ</i> signaling (possibly damaging according to polymorphism phenotyping) | |
| <i>C-C chemokine receptor type 5 (CCR5)</i> | <i>CCR5_IVS1+246</i> | rs1799987 | A/G | Intronic | Associated with CCR5 protein levels and HIV-1 | 86, 87 |
| | <i>CCR5_IVS1+151</i> | rs2734648 | G/T | Intronic | Part of haplotype associated with HIV-1 | |
| <i>Macrophage migration inhibitory factor (MIF)</i> | <i>MIF_-173</i> | rs755622 | C/G | Promoter | MIF_-173CC is associated with pulmonary tuberculosis | 89, 90 |
| <i>Vascular endothelial growth factor alpha (VEGFA)</i> | <i>VEGFA_-2578</i> | rs699947 | A/C | Promoter | VEGF_-2578CC was associated with higher or lower VEGF expression; associated with urinary tract infection | 91–93 |
| | <i>VEGFA_-7</i> | rs25648 | C/T | Promoter | Associated with higher levels of VEGFA mRNA | |
| | <i>VEGFA_IVS2+1378</i> | rs3024994 | C/T | Intronic | Unknown | |
| | <i>VEGFA_IVS7-919</i> | rs3025035 | C/T | Intronic | Unknown | |
| | <i>VEGFA_6112</i> | rs2146323 | A/C | | Unknown | |
| | <i>VEGFA_IVS-99</i> | rs3024997 | A/G | Intronic | Unknown | |
| | <i>VEGFA_IVS7+763</i> | rs3025030 | C/G | Intronic | Unknown | |
| | <i>VEGFA_5530</i> | rs998584 | G/T | | Unknown | |
| | <i>VEGFA_5958bp 3' of STP</i> | rs6899540 | A/C | | Unknown | |
| | <i>VEGFA_6119bp 3' of STP</i> | rs6900017 | C/T | | Unknown | |
| | <i>VEGFA_Near gene</i> | rs6905288 | A/G | | | |

^a Polyphen is a tool that predicts the possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein using straightforward physical and comparative considerations (publicly available at <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/data/>).

TABLE 2 Baseline and clinical characteristics of patients with or without IA^a

| Phase and characteristic | | aspBIOmics consortium and UHS-GHV-PCRAGA | | | | CSC-MO and VNH | | | | aspBIOmics consortium, UHS-GHV-PCRAGA, and CSC-MO | | | |
|---|----------------|--|--------------------------|------------------------------|----------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|---------|---|--------------------------|------------------------------|---------|
| | | Overall (n = 593) | IA patients (n = 113) | Non-IA patients (n = 480) | P value | Overall (n = 188) | IA patients (n = 36) | Non-IA patients (n = 152) | P value | Overall (n = 781) | IA patients (n = 149) | Non-IA patients (n = 632) | P value |
| Phase 1 | | | | | | | | | | | | | |
| Demographic variables | | | | | | | | | | | | | |
| Age (yr [avg ± SD]) | 51.46 ± 15.08 | 51.70 ± 13.20 | 51.40 ± 15.51 | 0.834 | | | | | | | | | |
| Sex ratio (no. male/no. female) | 1.27 (332/261) | 1.90 (74/39) | 1.16 (258/222) | 0.031 | | | | | | | | | |
| Hematological disease (no. [%]) | | | | | | | | | | | | | |
| AML | 412 (69.48) | 66 (58.41) | 346 (72.08) | 0.006 | | | | | | | | | |
| ALL | 73 (12.31) | 23 (20.35) | 50 (10.42) | 0.006 | | | | | | | | | |
| Other | 108 (18.21) | 24 (21.24) | 84 (17.50) | 0.429 | | | | | | | | | |
| Allo-HSCT (no. [%]) | 299 (50.42) | 65 (57.52) | 234 (48.75) | 0.116 | | | | | | | | | |
| Prophylaxis received ^b (no. [%]) | | | | | | | | | | | | | |
| Posaconazole | 73 (12.31) | 10 (8.85) | 63 (13.13) | 0.277 | | | | | | | | | |
| Itraconazole | 49 (8.26) | 13 (11.50) | 36 (7.50) | 0.230 | | | | | | | | | |
| Echinocandins | 30 (5.06) | 2 (1.77) | 28 (5.83) | 0.125 | | | | | | | | | |
| Voriconazole | 21 (3.54) | 6 (5.31) | 15 (3.13) | 0.397 | | | | | | | | | |
| Amphotericin B | 4 (0.67) | 0 (0.00) | 4 (0.83) | 0.738 | | | | | | | | | |
| Never received prophylaxis (no. [%]) | 450 (75.89) | 87 (76.99) | 363 (75.63) | 0.855 | | | | | | | | | |
| Phase 2 | | | | | | | | | | | | | |
| Demographic variables | | | | | | | | | | | | | |
| Age (yr [avg ± SD]) | | | | | 56.93 ± 18.12 | 55.75 ± 19.50 | 57.21 ± 17.84 | 0.665 | | | | | |
| Sex ratio (no. male/no. female) | | | | | 1.32 (107/81) | 1.57 (22/14) | 1.27 (85/67) | 0.705 | | | | | |
| Hematological disease (no. [%]) | | | | | | | | | | | | | |
| AML | | | | | 173 (92.02) | 34 (94.44) | 139 (91.45) | 0.799 | | | | | |
| ALL | | | | | 3 (1.60) | 1 (2.78) | 2 (1.32) | 0.912 | | | | | |
| Other | | | | | 12 (6.38) | 1 (2.78) | 11 (7.24) | 0.545 | | | | | |
| Allo-HSCT (no. [%]) | | | | | 39 (20.74) | 3 (8.33) | 36 (23.68) | 0.069 | | | | | |
| Prophylaxis ^c received (no. [%]) | | | | | | | | | | | | | |
| Posaconazole | | | | | 40 (40.40) | 3 (11.11) | 37 (51.39) | 0.0007 | | | | | |
| Itraconazole | | | | | 7 (7.07) | 3 (11.11) | 4 (5.56) | 0.603 | | | | | |
| Echinocandins | | | | | 1 (1.01) | 0 (0.00) | 1 (1.39) | 0.608 | | | | | |
| Voriconazole | | | | | 2 (2.02) | 0 (0.00) | 2 (2.78) | 0.942 | | | | | |
| Amphotericin B | | | | | 16 (16.16) | 2 (7.41) | 14 (19.44) | 0.253 | | | | | |
| Never received prophylaxis (no. [%]) | | | | | 69 (69.70) | 24 (88.89) | 45 (62.50) | 0.022 | | | | | |
| Phases 1 and 2 | | | | | | | | | | | | | |
| Demographic variables | | | | | | | | | | | | | |
| Age (yr [avg ± SD]) | | | | | 52.77 ± 16.03 | 52.67 ± 15.00 | 52.79 ± 16.27 | 0.935 | | | | | |
| Sex ratio (no. male/no. female) | | | | | 1.28 (439/342) | 1.81 (96/53) | 1.19 (343/289) | 0.031 | | | | | |
| Hematological disease (no. [%]) | | | | | | | | | | | | | |
| AML | | | | | 585 (74.90) | 100 (67.11) | 485 (76.74) | 0.020 | | | | | |
| ALL | | | | | 76 (9.73) | 24 (16.11) | 52 (8.23) | 0.006 | | | | | |
| Other | | | | | 120 (15.36) | 25 (16.78) | 95 (15.03) | 0.685 | | | | | |

| | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Allo-HSCT (no. [%]) | 338 (43.28) | 68 (45.64) | 270 (42.72) | 0.579 |
| Prophylaxis received (no. [%]) | | | | |
| Posaconazole | 113 (16.33) | 13 (9.29) | 100 (18.12) | 0.017 |
| Itraconazole | 56 (8.09) | 16 (11.43) | 40 (7.25) | 0.148 |
| Echinocandins | 31 (4.48) | 2 (1.43) | 29 (5.25) | 0.085 |
| Voriconazole | 23 (3.32) | 6 (4.29) | 17 (3.08) | 0.655 |
| Amphotericin B | 20 (2.89) | 2 (1.43) | 18 (3.26) | 0.383 |
| Never received prophylaxis ^d (no. [%]) | 519 (75.00) | 111 (79.29) | 408 (73.91) | 0.229 |

^a Abbreviations: HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; AML, acute myeloid leukemia; ALL, acute lymphoid leukemia; UHS, University Hospital of Salamanca (Spain); GHV, General Hospital of Valencia (Spain); PCRAGA, clinical trial (EU clinical trial number 2010-019406-17); CSC, Università Cattolica del S. Cuore, Rome (Italy); MO, University of Modena and Reggio Emilia, Modena (Italy); VNH, Virgen de las Nieves University Hospital. *P* values of ≤ 0.05 were considered significant and are shown in boldface.

^b Some patients received several prophylactic drugs.

^c Prophylaxis status was available for only 99 subjects (15 IA and 72 non-IA patients).

^d Percentage calculated according to the number of patients with prophylaxis data available.

er's instructions. Statistical significance in gene expression changes was determined by unpaired *t* test with Welch's correction (assuming unequal variances between groups).

Analysis of *IL4R* protein expression on T and B lymphocytes and monocytes by flow cytometry. *IL4R* protein levels were determined in PBMCs carrying wild-type *IL4R*_{rs2107356G/G} ($n = 13$), heterozygous *IL4R*_{rs2107356A/G} ($n = 24$), or mutant *IL4R*_{rs2107356A/A} genotypes ($n = 6$) by flow cytometry by following a slightly modified version of a previously reported protocol (54). Briefly, PBMCs (1×10^6) were preincubated with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) plus 2 mM EDTA for 10 min to block Fc receptors. Subsequently, cells were stained for 45 min at ambient temperature with mouse anti-human antibodies to determine the levels of IL4R protein expression on CD3⁺ T cells, CD19⁺ B cells, and CD14⁺ monocytes. The negative control consisted of cells incubated with mouse phycoerythrin (PE)-IgG1 kappa (BD Pharmingen). The analysis was performed according to the flow-cytometric cell surface staining method, and the following antibodies were used: PE-conjugated CD124⁺, peridinin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated CD14⁺, allophycocyanin (APC)-eFluor780-conjugated CD3⁺, and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated CD19⁺ antibodies (BD Pharmingen). Cells were acquired on a BD FACSVerser flow cytometer (BD Biosciences), and the data were analyzed using FlowJo software (TreeStar Inc.). The median fluorescence intensity (MFI) of the positive population was recorded for each cell type, and statistical differences were evaluated using an unpaired *t* test with Welch's correction (two-tailed *P* value).

Predictive models and discriminative accuracy. The value of immune-modulating polymorphisms for the prediction of IA was examined using stepwise logistic regression analysis. A prediction model was built that included age, gender, allo-HSCT status, and antifungal prophylactic status, as well as those genetic variants that showed significant associations with IA in the single-SNP analysis ($P < 0.05$ for phases 1 and 2). Using *P* values as a selection criterion, variables with the highest *P* value then were dropped and analyses were finalized when all variables reached statistical significance ($P < 0.05$). A predictive model with a similar number of nonsignificant SNPs ($P > 0.10$) also was built. The area under the curve (AUC) of a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to assess the discriminative accuracy of each model compared with a reference model including only demographic and clinical variables as covariates (age, gender, and allo-HSCT and antifungal prophylaxis status). A -2 -log likelihood ratio (LR) test was used to determine whether predictive models including genetic information were statistically different from the reference model. Finally, we ran a randomization test to confirm whether the improved predictive ability of the model including genetic variants significantly associated with IA was consistent after 50,000 iterations. Further details are included in the supplemental material. All analyses were performed using R (<http://www.r-project.org/>).

RESULTS

A total of 781 patients were enrolled in this case-control study, and among them, 149 were diagnosed with proven or probable IA according to the revised EORTC/MSG definitions. The remaining 632 patients showed no evidence for proven or probable IA. Baseline and clinical characteristics of IA and non-IA patient groups are summarized in Table 2. Overall, IA and non-IA patients had a similar mean age (52.67 versus 52.79 years; $P = 0.935$), but IA patients showed a significantly higher male-to-female gender ratio than patients with no evidence of IA (1.81 versus 1.19; $P = 0.031$). In addition, the percentage of patients diagnosed with ALL was significantly higher in IA than in non-IA patients (16.11% versus 8.23%; $P = 0.006$), whereas the percentage of patients with AML was significantly lower in IA than non-IA cases (67.11% versus 76.74%; $P = 0.020$). Interestingly, we also observed a significantly

TABLE 3 Associations found between immunoregulatory polymorphisms and invasive aspergillosis^b

| Variant dbSNP | Gene | Results for: | | Overall ^b | |
|---------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------------|--------------|
| | | Phase 1 ^a | | OR (95% CI) | P value |
| rs2243248 | <i>IL4</i> | 1.19 (0.63–2.26) | 0.59 | | |
| rs2070874 | <i>IL4</i> | 0.91 (0.53–1.55) | 0.72 | | |
| rs2243268 | <i>IL4</i> | 0.85 (0.52–1.38) | 0.50 | | |
| rs2243290 | <i>IL4</i> | 0.67 (0.39–1.16) | 0.14 | | |
| rs2057768 | <i>IL4R</i> | 1.20 (0.75–1.92) | 0.44 | | |
| rs2107356 | <i>IL4R</i> | 2.05 (1.24–3.40)^c | 0.0063 | 1.92 (1.20–3.09)^c | 0.008 |
| rs1801275 | <i>IL4R</i> | 1.00 (0.63–1.59) | 0.99 | | |
| rs4073 | <i>IL8</i> | 1.02 (0.64–1.61) | 0.95 | | |
| rs2227307 | <i>IL8</i> | 1.72 (1.00–2.94) ^c | 0.049 | 1.73 (1.06–2.81)^c | 0.031 |
| rs2234671 | <i>IL8RA</i> | 1.57 (0.80–3.08) | 0.20 | | |
| rs1126580 | <i>IL8RB</i> | 1.50 (0.88–2.54) | 0.13 | | |
| rs3024491 | <i>IL10</i> | 1.09 (0.67–1.78) | 0.72 | | |
| rs3024496 | <i>IL10</i> | 1.16 (0.71–1.90) | 0.55 | | |
| rs582054 | <i>IL12A</i> | 1.09 (0.64–1.84) | 0.76 | | |
| rs3212227 | <i>IL12B</i> | 0.57 (0.35–0.93) | 0.021 | 0.60 (0.38–0.96)^g | 0.029 |
| rs20541 | <i>IL13</i> | 0.76 (0.46–1.24) | 0.26 | | |
| rs1800925 | <i>IL13</i> | 0.85 (0.54–1.36) | 0.51 | | |
| rs1295686 | <i>IL13</i> | 0.73 (0.45–1.16) | 0.18 | | |
| rs2069705 | <i>IFNγ</i> | 0.56 (0.36–0.88)^d | 0.012 | 0.63 (0.41–0.97) | 0.035 |
| rs1861494 | <i>IFNγ</i> | 0.74 (0.47–1.17) | 0.20 | | |
| rs1059293 | <i>IFNγR2</i> | 0.98 (0.57–1.67) | 0.93 | | |
| rs9808753 | <i>IFNγR2</i> | 1.10 (0.65–1.85) | 0.72 | | |
| rs1799987 | <i>CCR5</i> | 1.40 (0.83–2.36) | 0.20 | | |
| rs2734648 | <i>CCR5</i> | 1.07 (0.67–1.71) | 0.76 | | |
| rs755622 | <i>MIF</i> | 1.38 (0.84–2.25) | 0.20 | | |
| rs25648 | <i>VEGFA</i> | 1.11 (0.63–1.97) | 0.72 | | |
| rs699947 | <i>VEGFA</i> | 1.28 (0.75–2.18) | 0.35 | | |
| rs3024994 | <i>VEGFA</i> | 1.61 (0.86–3.03) | 0.15 | | |
| rs3025035 | <i>VEGFA</i> | 1.31 (0.78–2.22) | 0.31 | | |
| rs2146323 | <i>VEGFA</i> | 1.63 (1.02–2.61)^e | 0.040 | 1.46 (0.95–2.27) | 0.085 |
| rs3024997 | <i>VEGFA</i> | 1.04 (0.67–1.61) | 0.87 | | |
| rs3025030 | <i>VEGFA</i> | 1.00 (0.58–1.70) | 0.99 | | |
| rs998584 | <i>VEGFA</i> | 0.66 (0.41–1.06) | 0.088 | | |
| rs6899540 | <i>VEGFA</i> | 0.84 (0.51–1.40) | 0.50 | | |
| rs6900017 | <i>VEGFA</i> | 1.76 (1.02–3.03)^f | 0.046 | 1.47 (0.87–2.47) | 0.16 |
| rs6905288 | <i>VEGFA</i> | 0.83 (0.52–1.31) | 0.42 | | |

^a Phase 1 included aspBIOmics, PCRAGA, Valencia, and Salamanca populations ($n = 593$ hematological patients).

^b Overall included patients ($n = 781$) after extension with 188 high-risk patients (39 HSCT and 149 non-HSCT patients), with prophylaxis data for 87 of them.

^c Estimated according to a recessive model of inheritance.

^d *IFN γ* _{rs2069705} per-allele OR, 0.69; 95% CI, 0.49 to 0.97; $P_{\text{trend}} = 0.032$ (log-additive model of inheritance).

^e *VEGFA*_{rs2146323} per-allele OR, 1.45; 95% CI, 1.04 to 2.03; $P_{\text{trend}} = 0.029$ (log-additive model of inheritance).

^f *VEGFA*_{rs6900017} per-allele OR, 1.73; 95% CI, 1.08 to 2.77; $P_{\text{trend}} = 0.027$ (log-additive model of inheritance).

^g *IL12B*_{rs3212227} per-allele OR, 0.67; 95% CI, 0.45 to 0.99; $P_{\text{trend}} = 0.040$ (log-additive model of inheritance).

^h Estimates were adjusted for age, sex, country of origin, and allo-HSCT and prophylaxis status (i.e., prior use of prophylaxis). $P < 0.05$ for values in boldface. $P < 0.0004$ was defined as the multiple-testing significance threshold.

smaller proportion of IA cases among those receiving posaconazole prophylaxis ($P = 0.017$).

Thirty-six genetic variants within 14 immune-modulating genes initially were genotyped in 593 high-risk patients (113 IA and 480 non-IA patients). Logistic regression analysis revealed that patients carrying the *IL4R*_{rs2107356A/A}, *VEGFA*_{rs2146323A}, and *VEGFA*_{rs6900017T} alleles had a significantly increased risk of IA (odds ratio [OR] of 2.05 and 95% confidence interval [CI] of 1.24 to 3.40, OR of 1.63 and 95% CI of 1.02 to 2.61, and OR of 1.76 and 95% CI of 1.02 to 3.03, respectively), whereas patients carrying the *IL12B*_{rs3212227C} and *IFN γ* _{rs2069705C} alleles showed a significantly decreased risk of developing the disease (OR of 0.57 [95% CI of

0.35 to 0.93] and OR of 0.56 [95% CI of 0.36 to 0.88], respectively) (Table 3). When a log-additive model was assumed, we also found a significant association between the *VEGFA*_{rs2146323} and *VEGFA*_{rs6900017} SNPs and an increased risk of IA (per-allele OR of 1.45 [95% CI of 1.04 to 2.03] and per-allele OR of 1.73 [95% CI of 1.08 to 2.77], respectively) and a statistically significant association of the *IFN γ* _{rs2069705} SNP with a decreased risk of developing IA (per-allele OR of 0.69 and 95% CI of 0.49 to 0.97).

To further confirm these significant associations, the study cohort was extended by recruiting 188 additional patients, 36 of whom were diagnosed with proven or probable IA. Given the small number of proven and probable IA cases, we could not con-

sider this second population an independent population for replication. An overall association analysis including 781 patients (149 IA and 632 non-IA patients) confirmed that carriers of the *IL4*_{rs2107356A/A} and *IL8*_{rs2227307G/G} genotypes had a significantly increased risk of IA compared to those carrying the wild-type allele (OR of 1.92 [95% CI of 1.20 to 3.09] and OR of 1.73 [95% CI of 1.06 to 2.81], respectively), whereas those subjects harboring the *IL12B*_{rs3212227C} and *IFN γ* _{rs2069705C} alleles showed a decreased risk of developing the infection (OR of 0.60 [95% CI of 0.38 to 0.96] and OR of 0.63 [95% CI of 0.41 to 0.97], respectively). When we tested the allele dose effect of significant SNPs, we found that the *IL12B*_{rs3212227} polymorphism was significantly associated with a reduced risk of getting the infection (per-allele OR of 0.67 and 95% CI of 0.45 to 0.99) (Table 3). As part of these association analyses, we also performed haplotype analysis that confirmed that none of these polymorphisms were part of risk haplotypes. We observed a significant association with IA only for a relatively rare *IFN γ* _{TC} haplotype whose effect likely was due to the *IFN γ* _{rs2069705} SNP (OR of 0.34 and 95% CI of 0.13 to 0.88; see Table S1 in the supplemental material).

Interestingly, a logistic regression analysis restricted to allo-HSCT patients and considering only donor genotypes and episodes of IA that occurred after transplantation ($n = 171$) also showed that the effect of the *IL4*_{rs2107356} and *IFN γ* _{rs2069705} SNPs on the risk of IA was considerably stronger in allo-HSCT patients than in patients who did not undergo transplantation (for *IL4*_{rs2107356}, OR of 5.63 [95% CI of 1.98 to 16.05] versus OR of 1.48 [95% CI of 0.81 to 2.71]; for *IFN γ* _{rs2069705}, OR of 0.24 [95% CI of 0.10 to 0.59] versus OR of 0.86 [95% CI of 0.52 to 1.45]) (Table 4). In this allo-HSCT-stratified analysis, we also found that allo-HSCT patients carrying the *VEGFA*_{rs3024994T} allele showed an increased risk of IA compared with those of allo-HSCT patients carrying the wild-type genotype/allele (OR of 4.48 and 95% CI of 1.25 to 16.08) (Table 4).

Although none of the reported overall, haplotype-stratified, and allo-HSCT-stratified associations remained significant after correction for multiple testing ($P_{\text{Meff_correction}} = 0.0004$), the association of *IL4*_{rs2107356} and *IFN γ* _{rs2069705} polymorphisms showed a marginal level of significance in allo-HSCT patients when recessive (P_{REC}) and dominant (P_{DOM}) models were assumed ($P_{\text{REC}} = 0.0009$ and $P_{\text{DOM}} = 0.0011$). Considering these results and those showing a suggestive association between *IL12B*_{rs3212227} SNP and risk of IA, we decided to evaluate whether the *IL4*_{rs2107356}, *IL8*_{rs2227307}, *IL12B*_{rs3212227}, and *IFN γ* _{rs2069705} variants had a functional effect in modulating the strength of immune responses against specific *Aspergillus* antigens and/or stimulatory molecules. For that purpose, we first investigated whether the presence of *IFN γ* _{rs2069705} and *IL4*_{rs2107356}, as well as *IL12B*_{rs3212227} and *IL8*_{rs2227307}, variants correlated with the ability of monocyte-derived macrophages to efficiently kill fungal conidia. Interestingly, we found that macrophages from donors carrying the *IFN γ* _{rs2069705C} allele showed a significantly increased ability to kill fungal spores compared to that of subjects carrying the wild-type genotype (TT versus TC, $P = 0.0043$; TT versus CC, $P = 0.0012$; and TT versus TC+CC, $P = 0.0003$) (Fig. 1A). No differences in killing ability were observed in macrophages from donors carrying the *IL4*_{rs2107356A/A} and *IL8*_{rs2227307G/G} genotypes or the *IL12B*_{rs3212227C} allele compared with their respective wild-type allele/genotype (Fig. 1B to D).

Motivated by these results, we decided to investigate whether

TABLE 4 Associations found between immunoregulatory SNPs and IA in allo-HSCT patients^a ($n = 171$)

| Variant dbSNP entry | Gene | OR (95% CI) | <i>P</i> value |
|---------------------|---------------------------------|--|----------------|
| rs2243248 | <i>IL4</i> | 0.93 (0.25–3.44) | 0.91 |
| rs2070874 | <i>IL4</i> | 1.40 (0.56–3.52) | 0.47 |
| rs2243268 | <i>IL4</i> | 1.15 (0.49–2.73) | 0.75 |
| rs2243290 | <i>IL4</i> | 0.93 (0.35–2.45) | 0.88 |
| rs2057768 | <i>IL4R</i> | 1.30 (0.56–3.03) | 0.54 |
| rs2107356 | <i>IL4R</i> | 5.63 (1.98–16.05)^{b,c} | 0.0009 |
| rs1801275 | <i>IL4R</i> | 0.50 (0.20–1.24) | 0.12 |
| rs4073 | <i>IL8</i> | 0.76 (0.33–1.73) | 0.51 |
| rs2227307 | <i>IL8</i> | 1.21 (0.51–2.86) | 0.67 |
| rs2234671 | <i>IL8RA</i> | 1.48 (0.42–5.15) | 0.55 |
| rs1126580 | <i>IL8RB</i> | 2.39 (0.92–6.20) ^b | 0.072 |
| rs3024491 | <i>IL10</i> | 1.08 (0.44–2.70) | 0.86 |
| rs3024496 | <i>IL10</i> | 0.74 (0.30–1.83) | 0.52 |
| rs582054 | <i>IL12A</i> | 1.73 (0.61–4.91) | 0.29 |
| rs3212227 | <i>IL12B</i> | 0.64 (0.26–1.57) | 0.32 |
| rs20541 | <i>IL13</i> | 0.80 (0.32–1.99) | 0.63 |
| rs1800925 | <i>IL13</i> | 1.96 (0.84–4.58) | 0.12 |
| rs1295686 | <i>IL13</i> | 0.53 (0.22–1.29) | 0.16 |
| rs2069705 | <i>IFNγ</i> | 0.24 (0.10–0.59)^e | 0.0011 |
| rs1861494 | <i>IFNγ</i> | 0.63 (0.27–1.49) | 0.29 |
| rs1059293 | <i>IFNγR2</i> | 1.53 (0.59–3.97) | 0.37 |
| rs9808753 | <i>IFNγR2</i> | 0.78 (0.29–2.09) | 0.62 |
| rs1799987 | <i>CCR5</i> | 1.75 (0.65–4.69) | 0.26 |
| rs2734648 | <i>CCR5</i> | 1.04 (0.44–2.48) | 0.93 |
| rs755622 | <i>MIF</i> | 0.63 (0.25–1.61) ^d | 0.33 |
| rs25648 | <i>VEGFA</i> | 1.39 (0.53–3.66) | 0.51 |
| rs699947 | <i>VEGFA</i> | 0.51 (0.19–1.36) | 0.18 |
| rs3024994 | <i>VEGFA</i> | 4.48 (1.25–16.08)^f | 0.022 |
| rs3025035 | <i>VEGFA</i> | 1.96 (0.77–4.99) | 0.16 |
| rs2146323 | <i>VEGFA</i> | 0.86 (0.38–1.97) | 0.72 |
| rs3024997 | <i>VEGFA</i> | 0.71 (0.31–1.62) | 0.41 |
| rs3025030 | <i>VEGFA</i> | 1.11 (0.41–3.01) ^d | 0.84 |
| rs998584 | <i>VEGFA</i> | 0.84 (0.32–2.22) | 0.72 |
| rs6899540 | <i>VEGFA</i> | 0.62 (0.23–1.69) | 0.34 |
| rs6900017 | <i>VEGFA</i> | 2.68 (0.97–7.42) | 0.061 |
| rs6905288 | <i>VEGFA</i> | 1.04 (0.43–2.53) | 0.92 |

^a Estimates were adjusted for age, sex, country of origin, severe neutropenia, and prophylactic status (i.e., prior use of prophylaxis). $P < 0.05$ for values in boldface. $P < 0.0004$ was defined as the corrected significance threshold.

^b Estimated according to a recessive model of inheritance.

^c *IL4*_{rs2107356} per-allele OR, 2.17; 95% CI, 1.18 to 3.98; $P_{\text{trend}} = 0.0097$ (log-additive model of inheritance).

^d Estimates calculated according to a codominant model (homozygotes for the rare allele were not found).

^e *IFN γ* _{rs2069705} per-allele OR, 0.50; 95% CI, 0.26 to 0.95; $P_{\text{trend}} = 0.027$ (log-additive model of inheritance).

^f *VEGFA*_{rs3024994} per-allele OR, 3.19; 95% CI, 1.08 to 9.45; $P_{\text{trend}} = 0.033$ (log-additive model of inheritance).

the presence of the above-mentioned SNPs correlated with cytokine levels after stimulation of PBMCs from healthy donors with fungal antigens (zymosan) or stimulatory molecules (LPS and PHA). These *in vitro* stimulation experiments revealed that carriers of the *IFN γ* _{rs2069705C} allele showed an increased production of IFN γ after 4 days of incubation with LPS or PHA and when both stimulating reagents were used in combination ($P_{\text{LPS}} = 0.057$, $P_{\text{PHA}} = 0.036$, and $P_{\text{LPS+PHA}} = 0.030$) (Fig. 2A; also see Table S2 in the supplemental material). We also observed that donors carrying the *IFN γ* _{rs2069705C} allele showed a drastic increase in the production of TNF at almost all time points compared to those bearing the wild-type genotype ($P_{\text{PHA-72h}} = 0.045$, $P_{\text{LPS+PHA-72h}} =$

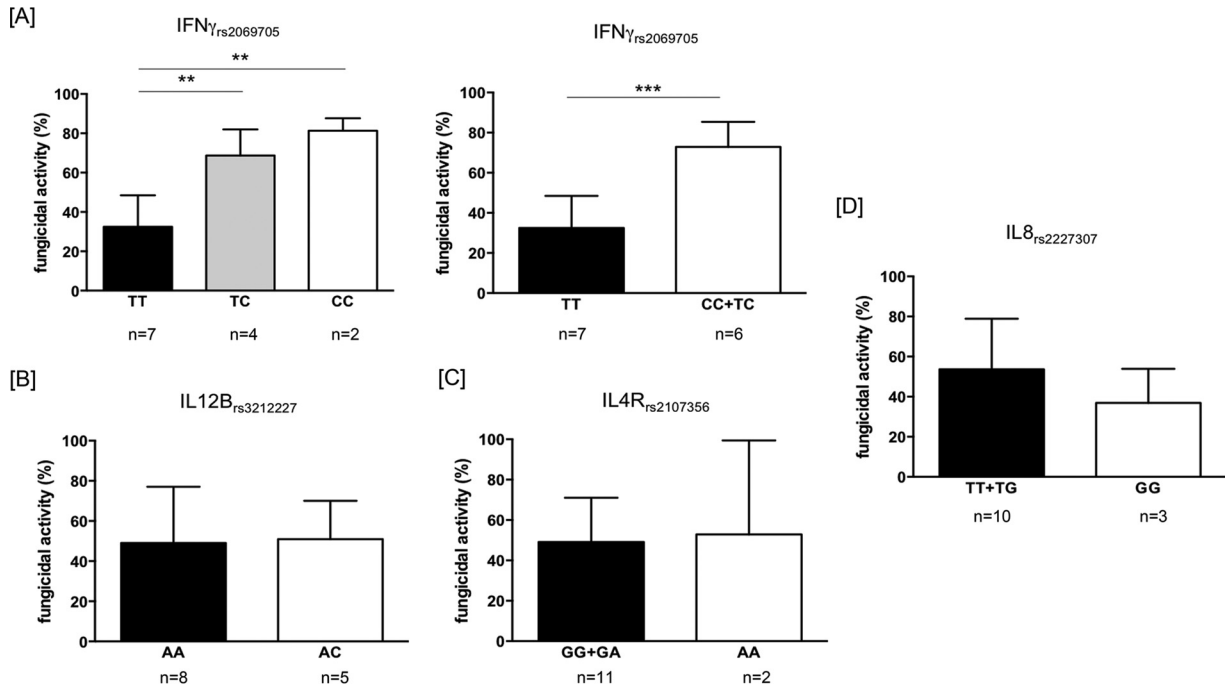


FIG 1 Fungicidal activity of monocyte-derived macrophage according to *IFN γ* (A), *IL12B* (B), *IL4R* (C), and *IL8* (D) genotypes.

0.018, $P_{LPS-96\text{ h}} = 0.058$, and $P_{LPS+PHA-96\text{ h}} = 0.0058$) (Fig. 2B; also see Table S2). In addition, we observed that subjects carrying the *IFN γ* _{rs2069705C} allele tended to have an increased production of IL12p70 compared with that of subjects carrying the wild-type genotype (Fig. 2C; also see Table S2). No correlation between *IL12p70* and *IL8* levels and *IL12B*_{rs3212227} and *IL8*_{rs2227307} genotypes was found. These findings suggest that the *IFN γ* _{rs2069705} SNP contributes to modulating the risk of IA, likely through the regulation of *IFN γ* mRNA levels.

In order to test this hypothesis, we measured *IFN γ* mRNA expression in PBMCs from healthy donors ($n = 21$) that were grouped according to the *IFN γ* _{rs2069705} genotype. Importantly, we found that carriers of the *IFN γ* _{rs2069705C} allele (C/T+CC) showed a significantly increased level of *IFN γ* mRNA compared with those of subjects carrying the wild-type genotype (40.85 ± 11.65 versus 13.87 ± 5.43 ; $P = 0.049$) (Fig. 3A and B). Although this result pointed toward a role of this SNP in modulating *IFN γ* gene expression in PBMCs, we decided to further confirm this result by looking at the publicly available blood expression quantitative trait loci (eQTL) browser (<http://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>). Of note, we found that, in agreement with our gene expression data, this variant, located in the promoter region of the gene (but also those neighboring SNPs within the same linkage disequilibrium block), showed a positive correlation with *IFN γ* mRNA expression level that ranged between $P = 1.01 \cdot 10^{-3}$ and $P = 1.70 \cdot 10^{-3}$ (see Fig. S1 in the supplemental material).

We next analyzed the correlation between the *IL4R*_{rs2107356} SNP and *IL4R* mRNA expression levels in whole-blood samples collected from healthy donors ($n = 43$) and in monocyte-derived macrophages at baseline and after *in vitro* stimulation with *A. fumigatus* conidia ($n = 12$). Gene expression data from blood samples did not show differences in *IL4R* mRNA expression levels between homozygotes (GG versus AA; $P = 0.304$), but they

showed a significantly increased level of expression in heterozygotes compared to those of samples with either wild-type or mutant homozygotes (AG versus GG [$P = 0.0045$] and AG versus AA [$P = 0.031$], respectively) (Fig. 3C). When carriers of the *IL4R*_{rs2107356AA} genotype were compared with those of carriers of the wild-type allele (according to the genetic model used in our genetic analysis), we failed to find statistical differences in *IL4R* mRNA expression levels ($P_{AA\text{ vs }GG+AG} = 0.2937$) (Fig. 3D). These findings did not support our hypothesis suggesting a functional effect for this promoter polymorphism on mRNA expression but were in agreement with data from the blood eQTL browser that reported no association of this promoter variant with *IL4R* mRNA expression levels in PBMCs. In line with these results, we found no correlation between the *IL4R*_{rs2107356} variant and *IL4R* mRNA expression levels in monocyte-derived macrophages at baseline and after stimulation with *A. fumigatus* conidia (Fig. 3E and F). The lack of correlation between this promoter polymorphism and *IL4R* protein level also was confirmed by flow cytometry analysis in different immune cell types (CD19⁺, CD14⁺, and CD3⁺ cells) (Fig. 3G). We found a significantly increased level of *IL4R* in CD19⁺ cells in heterozygotes only compared with those subjects carrying the AA genotype ($P = 0.032$) (Fig. 3G), which was in line with our gene expression data from blood samples from healthy donors and confirmed that the effect attributed to this promoter variant cannot be explained by changes in mRNA or protein expression levels. Given that *IL4R* is internalized in a time-dependent manner after stimulation with *IL4*, we could not confidently measure the correlation of the *IL4R*_{rs2107356} SNP and *IL4R* protein levels under stimulation conditions (data not shown).

Finally, considering the association of some of the immunomodulating SNPs with the risk of developing IA and given the correlation of some of these genetic markers with cytokine levels, we tested the capacity of these variants to confidently predict the disease risk. We assessed the predictive capacity of a model built

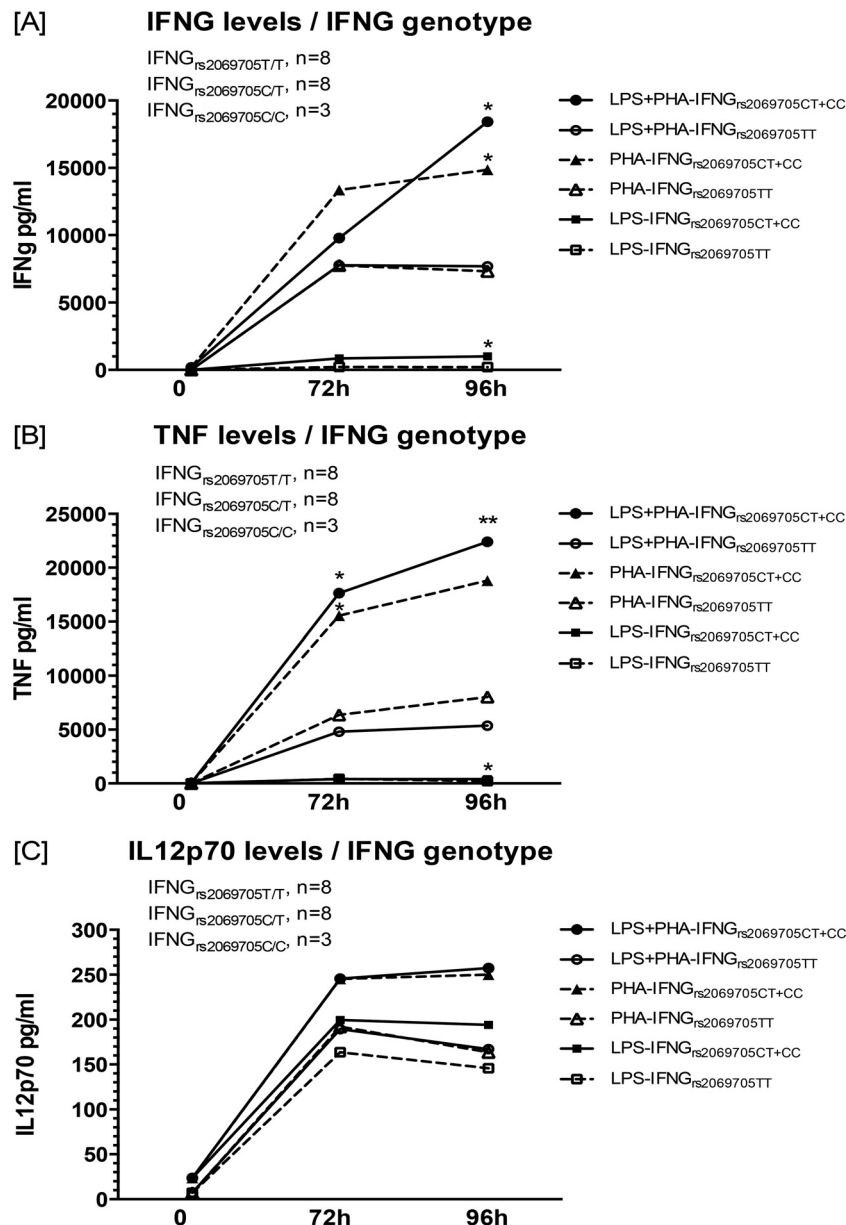


FIG 2 *IFN γ* , *TNF- α* , and *IL12p70* cytokine levels on stimulated PBMCs according to the *IFN γ* _{rs2069705} genotypes. PBMCs from healthy donors were stimulated with Zymosan (5 μ g/ml) and PHA (2 μ g/ml) alone or in combination with LPS (100 ng/ml). Supernatants were harvested for *IFN γ* , *TNF α* , and *IL12p70* analysis at 72 and 96 h.

with significant SNPs and demographic and clinical variables, whereas the reference model included only demographic and clinical variables. Despite the modest population size, we found that a predictive model including 4 variants associated with IA, age, gender, allo-HSCT, and antifungal prophylaxis status showed an improvement in discriminatory ability to predict the disease compared with the ability of the reference model (AUC of 0.659 and 95% CI of 0.596 to 0.722 [$P = 0.000005$] versus AUC of 0.564 and 95% CI of 0.499 to 0.630 [$P = 0.064$; P_{-2} log likelihood ratio test = 0.00052]) (Table 5 and Fig. 4). Importantly, we also observed that a model built with a similar number of nonsignificant SNPs, together with demographic and clinical variables, did not show any significant change in predictive capacity compared with the refer-

ence model (see Table S3 in the supplemental material), which confirmed the utility of significant SNPs in predicting IA. The consistency of the predictive results was supported through a 50,000 permutation test (50,000perm) that showed that none of the 50,000-permuted models had a better prediction capacity than our genetic model built with SNPs significantly associated with IA [AUC_{sort-average} of 0.6001, SD_{sort-AUC} of 0.0158, and Z score of 3.7361; $P_{Z \text{ score value}(50,000\text{perm})} = 9.34 \cdot 10^{-05}$] (Table 5; also see the supplemental material).

DISCUSSION

In this study, we report an association between genetic variants within *IL4R*, *IL8*, *IL12B*, and *IFN γ* genes and the risk of developing

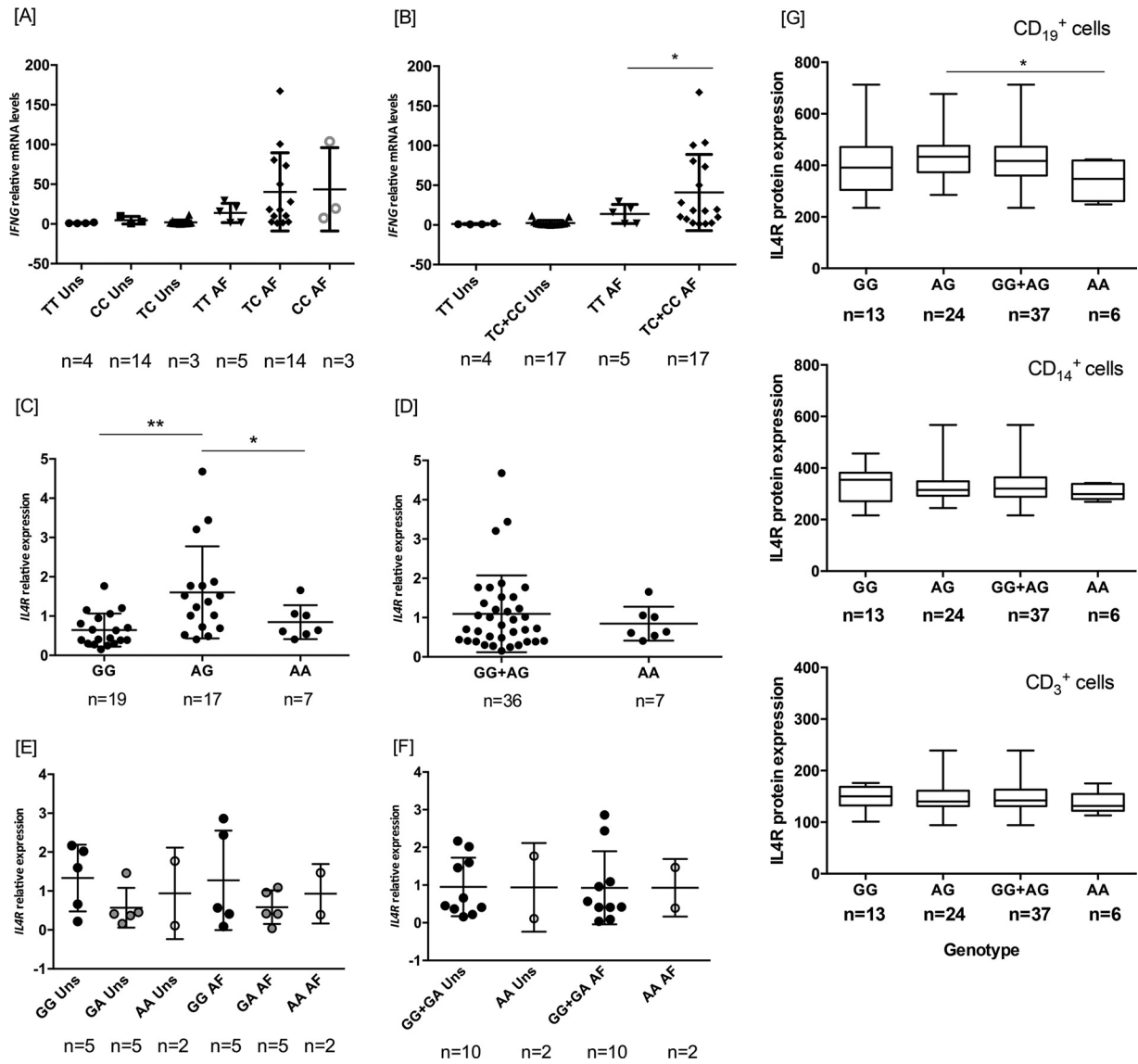


FIG 3 *IFNγ* (A and B) and *IL4R* mRNA (C to F) and protein (G) expression levels according to *IL4R*_{rs2107356} genotypes. (A and B) Correlations between *IFNγ*_{rs2069705} genotypes and *IFNγ* mRNA expression levels were analyzed in PBMCs from healthy donors at baseline or after being stimulated with *Aspergillus* conidia. Correlations between *IL4R*_{rs2107356} genotypes and *IL4R* mRNA expression levels were analyzed in blood samples from healthy donors (C and D) and in monocyte-derived macrophages at baseline or after stimulation with *Aspergillus* conidia (E and F). Correlations between this promoter variant and *IL4R* protein levels also were analyzed in different immune cells (CD19⁺, CD14⁺, and CD3⁺) by flow cytometry (G).

IA. Carriers of the *IL4R*_{rs2107356A/A} and *IL8*_{rs2227307G/G} genotypes had a significantly increased risk of developing the infection, whereas patients carrying the *IL12B*_{rs3212227C} and *IFNγ*_{rs2069705C} alleles showed a substantially decreased risk of IA than those harboring the wild-type allele/genotype. Although none of these associations persisted after a restrictive correction for multiple testing, we found that the association of the *IL4R*_{rs2107356} and *IFNγ*_{rs2069705} polymorphisms reached marginal significance in the allo-HSCT patient population, which pointed toward an impact of these variants in modulating the risk of developing IA, particularly in high-risk populations. Based on these results but also those suggesting overall associations of polymorphisms within the *IL4R*, *IL8*, *IL12B*, and *IFNγ* genes at the conventional significance threshold of $P \leq 0.05$, it seems plausible to suggest that polymor-

phisms within these genes affect gene function and therefore contribute to the pathogenesis of IA. We hypothesized that both *IL4R*_{rs2107356} and *IFNγ*_{rs2069705} polymorphisms, located in the promoter region of their respective genes, affect gene expression and, consequently, have an effect in modulating *IL4*- and *IFNγ*-mediated immune responses against *Aspergillus*. Likewise, we hypothesized that *IL8*_{rs2227307} and *IL12B*_{rs3212227} intronic polymorphisms affect alternative splicing of *IL8* and *IL12B* mRNA and even alter mRNA expression, thereby dysregulating *IL8*- and *IL12*-mediated Th1 immune responses against fungal pathogens. In line with these arguments, a number of previous studies have reported associations of these polymorphisms with immune-related diseases (55, 56) and infections (57–60), including IA (45). In particular, we confirmed an association previously reported by Mezger

TABLE 5 Discriminative-value AUC for models with or without immune-modulating variants

| Model and parameter or SNP | P value | OR (95% CI) | AUC (95% CI) ^a | P value |
|---|---------|---------------------|----------------------------------|----------|
| Reference model | | | | |
| Age | 0.898 | 1.001 (0.985–1.017) | | |
| Gender | 0.033 | 1.721 (1.045–2.835) | | |
| Allo-SCT | 0.785 | 0.934 (0.570–1.529) | | |
| Prophylactic status | 0.790 | 1.080 (0.612–1.906) | 0.564 (0.499–0.630) ^c | 0.064 |
| Predictive model built with 4 significant SNPs ^b | | | | |
| <i>IL8</i> _{rs2227307} | 0.024 | 1.952 (1.093–3.489) | | |
| <i>IL12B</i> _{rs3212227} | 0.016 | 0.508 (0.292–0.884) | | |
| <i>IFN</i> γ _{rs2069705} | 0.031 | 0.583 (0.358–0.952) | | |
| <i>VEGFA</i> _{rs6900017} | 0.040 | 1.814 (1.026–3.207) | | |
| Age | 0.951 | 1.001 (0.984–1.018) | | |
| Gender | 0.064 | 1.626 (0.972–2.719) | | |
| Allo-HSCT | 0.757 | 0.923 (0.557–1.532) | | |
| Prophylactic status | 0.525 | 1.210 (0.672–2.179) | 0.659 (0.596–0.722) ^c | 0.000005 |

^a Including age, gender, and allo-HSCT and prophylactic status as variables never dropped from models.

^b *IL4R*_{rs2107356} and *VEGFA*_{rs2146323} polymorphisms were not significant and were dropped from the model.

^c These models showed a statistically different prediction capacity ($-2 \cdot \log$ likelihood ratio test; $df = 4$; $P = 0.00052$). Residual deviance (reference model), 433.21; residual deviance (significant SNP model), 413.31. After removing missing values, 455 subjects (85 IA and 370 non-IA cases) were available for prediction capacity analysis. The following values were determined by permutation analysis: average AUC of null distribution (50,000 models), 0.6001; $SD_{50,000AUC}$, 0.0158; Z score, 3.7361; $P_{Z \text{ score value}(50,000perm)}$, $9.34 \cdot 10^{-05}$.

et al. between the *IFN*γ_{rs2069705} SNP and the risk of IA (45). This supports our hypothesis that this association is true and that this variant plays a role in modulating the immune response against *Aspergillus*.

Recent studies in humans and animal models have demonstrated that *IL4/IL4R*, *IL8*, *IL12* and *IFN*γ have a central role in IA (19, 61–65). In particular, *IFN*γ seems to be a key factor, as its enhanced production (14, 66) or its therapeutic administration (63) boosts the production of free oxygen radicals and the neutro-

phil-mediated damage of fungal hyphae and promotes resistance to the infection (19, 67). It is also well documented that the production of *IL8* and *IL12p70* by epithelial and dendritic cells in response to conidia enhances Th₁-mediated immune responses (61, 68, 69) and increases resistance to IA (62), whereas its neutralization produces a marked increase in susceptibility to IA (15, 19). *IL12p70* also mediates enhanced cytotoxic activity of NK cells and CD8⁺ T cells and promotes the secretion of *IFN*γ by CD4⁺ T cells, which is an essential process for an efficient clearance of inhaled *Aspergillus fumigatus* spores. Conversely, *IL4* secretion activates Th₂-CD4⁺ T cell immune responses and leads to a significant decrease in Th₁ immune responses and, consequently, increases susceptibility to *Aspergillus* infection (19, 70). Similarly, it also has been demonstrated that the lack of *IL4* cytokine increases Th₁ immune responses characterized by high-level production of *IL12* and an enhanced *IL12*-mediated production of *IFN*γ by T lymphocytes, thereby leading to an increase in resistance to developing the infection (19).

In light of these results and in order to better characterize the role of *IFN*γ, *IL4R*, *IL8*, and *IL12B* polymorphisms in modulating immune responses against fungal antigens and/or specific stimulatory molecules, we proceeded to perform functional assays in PBMCs and monocyte-derived macrophages from healthy donors. Importantly, we found that subjects carrying the *IFN*γ_{rs2069705C} allele showed an increased ability to kill *A. fumigatus* conidia compared to that of subjects carrying the wild-type allele. This important finding supports our genetic findings as well as those from a previous study (45), suggesting that the *IFN*γ_{rs2069705} promoter variant plays a key role in modulating the strength of immune responses against *Aspergillus*, likely through the modulation on *IFN*γ mRNA expression. Importantly, we also observed that, under stimulating conditions, PBMCs from carriers of the *IFN*γ_{rs2069705C} allele showed an increased production of *IFN*γ and TNF cytokines compared to that of individuals carrying the wild-type allele. In addition to this, we found that the *IFN*γ_{rs2069705} SNP correlated with *IFN*γ mRNA levels in PBMCs

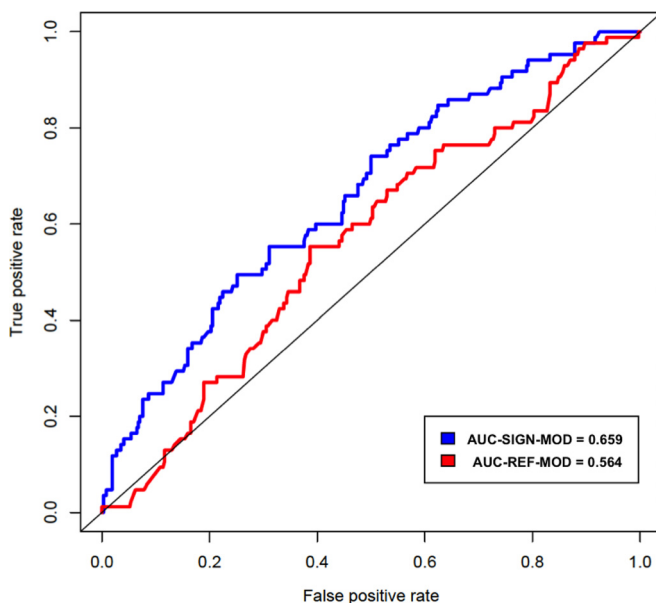


FIG 4 Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis. ROC curves summarize the accuracy of prediction for each model. The model including SNPs significantly associated with IA and demographic and clinical variables (marked in blue) showed a significantly improved predictive capacity compared with that of a reference model including only demographic and clinical variables (marked in red).

from healthy donors, which again suggested that this polymorphism, or another causative polymorphism in strong linkage disequilibrium with it, is involved not only in the control of *IFN* γ production but also in the subsequent induction of *TNF* production. Taking all these findings together, we propose a central role for this variant in determining the risk of IA in allo-HSCT and in leukemia patients undergoing intensive chemotherapy.

Although genetic data suggested that polymorphisms within *IL4R*, *IL8*, and *IL12B* influence the risk of developing IA, functional experiments did not show any correlation between these SNPs and their respective mRNA and/or protein levels. Therefore, we suggest that these variants exert their biological function by modulating other biological processes, such as mRNA processing (splicing or turnover) or mRNA stability, or even act at the post-transcriptional level. Further studies now are warranted to replicate our findings and to experimentally identify the functional role of these SNPs in determining the risk of IA.

Finally, given the genetic and/or functional effect observed for variants within *IFN* γ , *IL4R*, *IL8*, *IL12B*, and *VEGFA* genes, we found it interesting to determine the impact of these variants in predicting the disease risk. We found that a model built with *IL8*_{rs2227307}, *IL12B*_{rs3212227}, *IFN* γ _{rs2069705}, and *VEGFA*_{rs6900017} SNPs showed a significantly improved discriminatory ability to predict the disease compared with a model that included demographic and clinical variables. Importantly, when a similar number of nonsignificant SNPs was added to the reference model, we did not observe any significant change in predictive capacity, which confirmed that only a model built with these significant SNPs could have the capacity to predict the infection. In support of this finding, we also observed that the AUC of this model was systematically higher than the AUC observed for 50,000 iterative models, which emphasizes the importance of considering predictive models to assist in the clinical decision-making process and to improve novel strategies to prevent IA occurrence.

This study has both strengths and limitations. Study strengths include a multicenter population-based design, a relatively large sample size, and the large number of genetic polymorphisms analyzed. This allowed us, for the first time, to perform predictive analyses to assess the potential utility of genetic variants in predicting with confidence the risk of developing IA. Potential weaknesses include limited antifungal prophylaxis data availability for a subset of patients and a relatively small number of proven or probable IA cases that limited the study's statistical power to rule out spurious associations. To minimize this limitation, the most relevant associations were functionally validated.

In conclusion, our data suggest that immune-modulating polymorphisms have an impact on the risk of IA, and that the genotyping of these variants could help to predict the risk of IA and could be useful in establishing a risk-adapted antifungal prophylaxis strategy.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Thomas Rogers (St. James's Hospital, Dublin, Ireland) for reviewing and editing the English language and António Marques (Hospital de Braga, Portugal) for providing the buffy coats.

M.J. and J.S. conceived the study and participated in its design and coordination. C.B.L. performed the genetic analyses. C.B.L., L.M.C., J.S.-C., A.O.-C., A. Carvalho, and J. Sainz performed *in vitro* analyses. L.A.-F., A. Carvalho, J. Springer, M. Lackner, A. Comino, C.O., R.R., M.C.-E., C.S., M.A.L.-N., A.F.-M., C.C., T.V., L.F., J.M.A., L. Pagano, E.L.-F., L.

Potenza, M. Luppi, C.L.-F., J.L., H.E., L.V., and the PCRAGA Study Group coordinated patient's recruitment and provided the clinical data. J.S. analyzed the data. M.J. and J. Sainz drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

This study was supported by grants PI12/02688 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Madrid, Spain), PIM2010EPA-00756 from the ERA-NET PathoGenoMics (0315900A), and the Collaborative Research Center/Transregio 124 FungiNet. C.C. is supported by the Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal (SFRH/BPD/96176/2013). This study also was supported by a donation of Consuelo González Moreno, an acute myeloid leukemia survivor. We thank Astella Pharma Inc. for supporting this work.

FUNDING INFORMATION

ERA-NET Pathogenomics provided funding to Jan Springer, Michaela Lackner, Cornelia Lass-Flörl, Jürgen Löffler, Hermann Einsele, Manuel Jurado, and Juan Sainz under grant number PIM2010EPA-00756. Fondo de Investigaciones Sanitarias provided funding to Carmen Belén Lupiañez, Luz María Canet, Juana Segura-Catena, Rafael Ríos, Manuel Jurado, and Juan Sainz under grant number PI12/02688. The Collaborative Research Center/Transregio 124 FungiNet provided funding to Jan Springer, Jürgen Löffler, and Hermann Einsele. Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal, provided funding to Cristina Cunha under grant number SFRH/BPD/96176/2013. Astellas Pharma (Spain) provided funding to Manuel Jurado and Juan Sainz.

REFERENCES

1. Neofytos D, Lu K, Hatfield-Seung A, Blackford A, Marr KA, Treadway S, Ostrander D, Nussenblatt V, Karp J. 2013. Epidemiology, outcomes, and risk factors of invasive fungal infections in adult patients with acute myelogenous leukemia after induction chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75:144–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.001>.
2. Neofytos D, Treadway S, Ostrander D, Alonso CD, Dierberg KL, Nussenblatt V, Durand CM, Thompson CB, Marr KA. 2013. Epidemiology, outcomes, and mortality predictors of invasive mold infections among transplant recipients: a 10-year, single-center experience. *Transpl Infect Dis* <http://dx.doi.org/10.1111/tid.12060>.
3. Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, Azie N, Quan SP, Meier-Kriesche HU, Apewokin S, Horn DL. 2012. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *J Infect* 65: 453–464. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2012.08.003>.
4. Hammond SP, Marty FM, Bryar JM, DeAngelo DJ, Baden LR. 2010. Invasive fungal disease in patients treated for newly diagnosed acute leukemia. *Am J Hematol* 85:695–699. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.21776>.
5. Baddley JW, Stephens JM, Ji X, Gao X, Schlamm HT, Tarallo M. 2013. Aspergillosis in intensive care unit (ICU) patients: epidemiology and economic outcomes. *BMC Infect Dis* 13:29. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-29>.
6. Gresnigt MS, Netea MG, van de Veerdonk FL. 2012. Pattern recognition receptors and their role in invasive aspergillosis. *Ann N Y Acad Sci* 1273: 60–67. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06759.x>.
7. Balloy V, Chignard M. 2009. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect* 11:919–927. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.07.002>.
8. Serrano-Gomez D, Leal JA, Corbi AL. 2005. DC-SIGN mediates the binding of *Aspergillus fumigatus* and keratinophilic fungi by human dendritic cells. *Immunobiology* 210:175–183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2005.05.011>.
9. Sun WK, Lu X, Li X, Sun QY, Su X, Song Y, Sun HM, Shi Y. 2012. Dectin-1 is inducible and plays a crucial role in *Aspergillus*-induced innate immune responses in human bronchial epithelial cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:2755–2764. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-012-1624-8>.
10. Mambula SS, Sau K, Henneke P, Golenbock DT, Levitz SM. 2002. Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 277:39320–39326. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M201683200>.
11. Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA. 2006. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus*

- tus cellular states. *J Immunol* 176:3717–3724. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3717>.
12. Said-Sadier N, Padilla E, Langsley G, Ojcius DM. 2010. Aspergillus fumigatus stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS One* 5:e10008. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010008>.
 13. Mehrad B, Strieter RM, Standiford TJ. 1999. Role of TNF- α in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *J Immunol* 162: 1633–1640.
 14. Cenci E, Mencacci A, Fe d'Ostiani C, Del Sero G, Mosci P, Montagnoli C, Bacci A, Romani L. 1998. Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 178:1750–1760. <http://dx.doi.org/10.1086/314493>.
 15. Brieland JK, Jackson C, Menzel F, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Halpern J, Hurst S, Muchamuel T, Debets R, Kastelein R, Churakova T, Abrams J, Hare R, O'Garra A. 2001. Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 69:1554–1560. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.3.1554-1560.2001>.
 16. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, Bruijns SC, Geijtenbeek TB. 2009. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- κ B activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol* 10:203–213. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1692>.
 17. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. 2004. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:358–364. <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2003-0388OC>.
 18. Balloy V, Sallenave JM, Wu Y, Touqui L, Latge JP, Si-Tahar M, Chignard M. 2008. Aspergillus fumigatus-induced interleukin-8 synthesis by respiratory epithelial cells is controlled by the phosphatidylinositol 3-kinase, p38 MAPK, and ERK1/2 pathways and not by the toll-like receptor-MyD88 pathway. *J Biol Chem* 283:30513–30521. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M803149200>.
 19. Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, d'Ostiani CF, Mosci P, Bachmann M, Bistoni F, Kopf M, Romani L. 1999. Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses. *J Infect Dis* 180:1957–1968. <http://dx.doi.org/10.1086/315142>.
 20. Clemons KV, Grunig G, Sobel RA, Mirels LF, Rennick DM, Stevens DA. 2000. Role of IL-10 in invasive aspergillosis: increased resistance of IL-10 gene knockout mice to lethal systemic aspergillosis. *Clin Exp Immunol* 122:186–191. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01382.x>.
 21. Mehrad B, Strieter RM, Moore TA, Tsai WC, Lira SA, Standiford TJ. 1999. CXC chemokine receptor-2 ligands are necessary components of neutrophil-mediated host defense in invasive pulmonary aspergillosis. *J Immunol* 163:6086–6094.
 22. Mehrad B, Moore TA, Standiford TJ. 2000. Macrophage inflammatory protein-1 α is a critical mediator of host defense against invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic hosts. *J Immunol* 165:962–968. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.962>.
 23. Morrison BE, Park SJ, Mooney JM, Mehrad B. 2003. Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis. *J Clin Invest* 112:1862–1870. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI18125>.
 24. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. 1997. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor α -dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 17:4015–4023. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.17.7.4015>.
 25. Park SJ, Mehrad B. 2009. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev* 22:535–551. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00014-09>.
 26. Romani L. 2011. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 11: 275–288. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2939>.
 27. Crosdale DJ, Poulton KV, Ollier WE, Thomson W, Denning DW. 2001. Mannose-binding lectin gene polymorphisms as a susceptibility factor for chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 184:653–656. <http://dx.doi.org/10.1086/322791>.
 28. Sainz J, Lupianez CB, Segura-Catena J, Vazquez L, Rios R, Oyonarte S, Hemminki K, Forsti A, Jurado M. 2012. Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection. *PLoS One* 7:e32273. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032273>.
 29. Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, Jaffe D, Hsu K, O'Reilly R, VDB M, Pamer E, Satagopan J, Papanicolaou GA. 2005. TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 1062:95–103. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1358.012>.
 30. Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, Janer M, Rodrigues SD, Li S, Hansen JA, Zhao LP, Aderem A, Boeckh M. 2008. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 359:1766–1777. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0802629>.
 31. Carvalho A, Cunha C, Carotti A, Aloisi T, Guarrera O, Di Ianni M, Falzetti F, Bistoni F, Aversa F, Pitzurra L, Rodrigues F, Romani L. 2009. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and susceptibility to infections in allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 37:1022–1029. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2009.06.004>.
 32. de Boer MG, Jolink H, Halkes CJ, van der Heiden PL, Kremer D, Falkenburg JH, van de Vosse E, van Dissel JT. 2011. Influence of polymorphisms in innate immunity genes on susceptibility to invasive aspergillosis after stem cell transplantation. *PLoS One* 6:e18403. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018403>.
 33. Carvalho A, Pasqualotto AC, Pitzurra L, Romani L, Denning DW, Rodrigues F. 2008. Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 197:618–621. <http://dx.doi.org/10.1086/526500>.
 34. Chai LY, de Boer MG, van der Velden WJ, Plantinga TS, van Spriel AB, Jacobs C, Halkes CJ, Vonk AG, Blijlevens NM, van Dissel JT, Donnelly PJ, Kullberg BJ, Maertens J, Netea MG. 2011. The Y238X stop codon polymorphism in the human beta-2-mac receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *J Infect Dis* 203:736–743. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiq102>.
 35. Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, Zelante T, D'Angelo C, Pierini A, Pitzurra L, Falzetti F, Carotti A, Perruccio K, Latge JP, Rodrigues F, Velardi A, Aversa F, Romani L, Carvalho A. 2010. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood* 116:5394–5402. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-04-279307>.
 36. Granell M, Urbano-Ispizua A, Suarez B, Rovira M, Fernandez-Aviles F, Martinez C, Ortega M, Uriburu C, Gaya A, Roncero JM, Navarro A, Carreras E, Mensa J, Vives J, Rozman C, Montserrat E, Lozano F. 2006. Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 34: 1435–1441. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2006.06.005>.
 37. Grube M, Loeffler J, Mezger M, Kruger B, Echtenacher B, Hoffmann P, Edinger M, Einsele H, Andreesen R, Holler E. 2013. TLR5 stop codon polymorphism is associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Med Mycol* 51:818–825. <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2013.809630>.
 38. Cunha C, Giovannini G, Pierini A, Bell AS, Sorci G, Riuzzi F, Donato R, Rodrigues F, Velardi A, Aversa F, Romani L, Carvalho A. 2011. Genetically-determined hyperfunction of the S100B/RAGE axis is a risk factor for aspergillosis in stem cell transplant recipients. *PLoS One* 6:e27962. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027962>.
 39. Cunha C, Aversa F, Lacerda JF, Busca A, Kurzai O, Grube M, Loffler J, Maertens JA, Bell AS, Inforzato A, Barbati E, Almeida B, Santos e Sousa P, Barbui A, Potenza L, Caira M, Rodrigues F, Salvatori G, Pagano L, Luppi M, Mantovani A, Velardi A, Romani L, Carvalho A. 2014. Genetic PTX3 deficiency and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 370:421–432. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1211161>.
 40. Koldehoff M, Beelen DW, Elmaagacli AH. 2013. Increased susceptibility for aspergillosis and post-transplant immune deficiency in patients with gene variants of TLR4 after stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 15:533–539.
 41. Sainz J, Perez E, Gomez-Lopera S, Jurado M. 2008. IL1 gene cluster polymorphisms and its haplotypes may predict the risk to develop invasive pulmonary aspergillosis and modulate C-reactive protein level. *J Clin Immunol* 28:473–485. <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-008-9197-0>.
 42. Sainz J, Hassan L, Perez E, Romero A, Moratalla A, Lopez-Fernandez E, Oyonarte S, Jurado M. 2007. Interleukin-10 promoter polymorphism as risk factor to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Immunol Lett* 109: 76–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2007.01.005>.
 43. Seo KW, Kim DH, Sohn SK, Lee NY, Chang HH, Kim SW, Jeon SB, Baek JH, Kim JG, Suh JS, Lee KB. 2005. Protective role of interleukin-10

- promoter gene polymorphism in the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 36:1089–1095. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1705181>.
44. Johnson MD, Plantinga TS, van de Vosse E, Velez Edwards DR, Smith PB, Alexander BD, Yang JC, Kremer D, Laird GM, Oosting M, Joosten LA, van der Meer JW, van Dissel JT, Walsh TJ, Perfect JR, Kullberg BJ, Scott WK, Netea MG. 2012. Cytokine gene polymorphisms and the outcome of invasive candidiasis: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 54:502–510. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir827>.
 45. Mezger M, Steffens M, Beyer M, Manger C, Eberle J, Toliat MR, Wienker TF, Ljungman P, Hebart H, Dornbusch HJ, Einsele H, Loeffler J. 2008. Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 111:534–536. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-05-090928>.
 46. Sainz J, Salas-Alvarado I, Lopez-Fernandez E, Olmedo C, Comino A, Garcia F, Blanco A, Gomez-Lopera S, Oyonarte S, Bueno P, Jurado M. 2010. TNFR1 mRNA expression level and TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23:423–436.
 47. Sainz J, Perez E, Hassan L, Moratalla A, Romero A, Collado MD, Jurado M. 2007. Variable number of tandem repeats of TNF receptor type 2 promoter as genetic biomarker of susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Hum Immunol* 68:41–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2006.10.011>.
 48. Aguado JM, Vazquez L, Fernandez-Ruiz M, Villaescusa T, Ruiz-Camps I, Barba P, Silva JT, Batlle M, Solano C, Gallardo D, Heras I, Polo M, Varela R, Vallejo C, Olave T, Lopez-Jimenez J, Rovira M, Parody R, Cuenca-Estrella M, PCRAGA Study Group, Spanish Stem Cell Transplantation Group, Study Group of Medical Mycology of the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Spanish Network for Research in Infectious Diseases. 2015. Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based Aspergillus DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 60:405–414. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu833>.
 49. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Giffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Munoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE, European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group, National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46:1813–1821. <http://dx.doi.org/10.1086/588660>.
 50. Chen B, Wilkening S, Drechsel M, Hemminki K. 2009. SNP_tools: a compact tool package for analysis and conversion of genotype data for MS-Excel. *BMC Res Notes* 2:214. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-2-214>.
 51. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. 2002. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225–2229. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1069424>.
 52. Nyholt DR. 2004. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* 74:765–769. <http://dx.doi.org/10.1086/383251>.
 53. Byrnes HD, Kaminski H, Mirza A, Deno G, Lundell D, Fine JS. 1999. Macrophage inflammatory protein-3 beta enhances IL-10 production by activated human peripheral blood monocytes and T cells. *J Immunol* 163:4715–4720.
 54. Mozo L, Gayo A, Suarez A, Rivas D, Zamorano J, Gutierrez C. 1998. Glucocorticoids inhibit IL-4 and mitogen-induced IL-4R alpha chain expression by different posttranscriptional mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 102:968–976. [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70335-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70335-5).
 55. Hesselmar B, Bergin AM, Park H, Hahn-Zoric M, Eriksson B, Hanson LA, Padyukov L. 2010. Interleukin-4 receptor polymorphisms in asthma and allergy: relation to different disease phenotypes. *Acta Paediatr* 99:399–403. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01631.x>.
 56. Kim K, Cho SK, Sestak A, Namjou B, Kang C, Bae SC. 2010. Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 69:1247–1250. <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2009.117572>.
 57. Stappers MH, Thys Y, Oosting M, Plantinga TS, Ioana M, Reimnitz P, Mouton JW, Netea MG, Joosten LA, Gyssens IC. 2014. Polymorphisms in cytokine genes IL6, TNF, IL10, IL17A and IFNG influence susceptibility to complicated skin and skin structure infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:2267–2274. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-014-2201-0>.
 58. Wang D, Zhong X, Huang D, Chen R, Bai G, Li Q, Yu B, Fan Y, Sun X. 2014. Functional polymorphisms of interferon-gamma affect pneumonia-induced sepsis. *PLoS One* 9:e87049. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087049>.
 59. Morris GA, Edwards DR, Hill PC, Wejse C, Bisseye C, Olesen R, Edwards TL, Gilbert JR, Myers JL, Stryjewski ME, Abbate E, Estevan R, Hamilton CD, Tacconelli A, Novelli G, Brunetti E, Aaby P, Sodemann M, Ostergaard L, Adegbola R, Williams SM, Scott WK, Sirugo G. 2011. Interleukin 12B (IL12B) genetic variation and pulmonary tuberculosis: a study of cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. *PLoS One* 6:e16656. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016656>.
 60. Zhang N, Xu Y, Zhang B, Zhang T, Yang H, Zhang B, Feng Z, Zhong D. 2014. Analysis of interleukin-8 gene variants reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for chronic periodontitis in the Han population. *PLoS One* 9:e104436. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0104436>.
 61. Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, di Francesco P, Romani L. 2002. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol* 168:1362–1371. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1362>.
 62. Cenci E, Perito S, Enssle KH, Mosci P, Latge JP, Romani L, Bistoni F. 1997. Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infect Immun* 65:564–570.
 63. Nagai H, Guo J, Choi H, Kurup V. 1995. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha protect mice from invasive aspergillosis. *J Infect Dis* 172:1554–1560. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/172.6.1554>.
 64. Bellochio S, Bozza S, Montagnoli C, Perruccio K, Gaziano R, Pizzurra L, Romani L. 2005. Immunity to *Aspergillus fumigatus*: the basis for immunotherapy and vaccination. *Med Mycol* 43(Suppl 1):S181–S188.
 65. Phadke AP, Mehrad B. 2005. Cytokines in host defense against *Aspergillus*: recent advances. *Med Mycol* 43(Suppl 1):S173–S176.
 66. Park SJ, Hughes MA, Burdick M, Strieter RM, Mehrad B. 2009. Early NK cell-derived IFN-gamma is essential to host defense in neutropenic invasive aspergillosis. *J Immunol* 182:4306–4312. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803462>.
 67. Roilides E, Uhlig K, Venzon D, Pizzo PA, Walsh TJ. 1993. Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infect Immun* 61:1185–1193.
 68. Bellanger AP, Millon L, Khoufache K, Rivollet D, Bieche I, Laurendeau I, Vidaud M, Botterel F, Bretagne S. 2009. *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. *J Med Microbiol* 58:174–179. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.005488-0>.
 69. Chiang LY, Sheppard DC, Gravelat FN, Patterson TF, Filler SG. 2008. *Aspergillus fumigatus* stimulates leukocyte adhesion molecules and cytokine production by endothelial cells in vitro and during invasive pulmonary disease. *Infect Immun* 76:3429–3438. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01510-07>.
 70. Mencacci A, Perruccio K, Bacci A, Cenci E, Benedetti R, Martelli MF, Bistoni F, Coffman R, Velardi A, Romani L. 2001. Defective antifungal T-helper 1 (TH1) immunity in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation and its restoration by treatment with TH2 cytokine antagonists. *Blood* 97:1483–1490. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V97.5.1483>.
 71. Choi EH, Foster CB, Taylor JG, Erichsen HC, Chen RA, Walsh TJ, Anttila VJ, Ruutu T, Palotie A, Chanock SJ. 2003. Association between chronic disseminated candidiasis in adult acute leukemia and common IL4 promoter haplotypes. *J Infect Dis* 187:1153–1156. <http://dx.doi.org/10.1086/368345>.

72. Hackstein H, Hecker M, Kruse S, Bohnert A, Ober C, Deichmann KA, Bein G. 2001. A novel polymorphism in the 5' promoter region of the human interleukin-4 receptor alpha-chain gene is associated with decreased soluble interleukin-4 receptor protein levels. *Immunogenetics* 53: 264–269. <http://dx.doi.org/10.1007/s002510100324>.
73. Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA. 1999. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* 96:365–371. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00705.x>.
74. Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. 1997. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* 337:1720–1725. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199712113372403>.
75. Cheng CH, Lee YS, Tsau YK, Lin TY. 2011. Genetic polymorphisms and susceptibility to parenchymal renal infection among pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 30:309–314. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e3181ff84ff>.
76. van de Sande WW, Fahal A, Verbrugh H, van Belkum A. 2007. Polymorphisms in genes involved in innate immunity predispose toward mycetoma susceptibility. *J Immunol* 179:3065–3074. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3065>.
77. van der Kuyl AC, Polstra AM, Weverling GJ, Zorgdrager F, van den Burg R, Cornelissen M. 2004. An IL-8 gene promoter polymorphism is associated with the risk of the development of AIDS-related Kaposi's sarcoma: a case-control study. *AIDS* 18:1206–1208. <http://dx.doi.org/10.1097/00002030-200405210-00016>.
78. Garey KW, Jiang ZD, Ghantaji S, Tam VH, Arora V, Dupont HL. 2010. A common polymorphism in the interleukin-8 gene promoter is associated with an increased risk for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 51:1406–1410. <http://dx.doi.org/10.1086/657398>.
79. Scarel-Caminaga RM, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Corbi SC, Sogumo PM, Orrico SR, Cirelli JA. 2011. Haplotypes in the interleukin 8 gene and their association with chronic periodontitis susceptibility. *Biochem Genet* 49:292–302. <http://dx.doi.org/10.1007/s10528-010-9407-3>.
80. Almajhdi FN, Al-Ahdal M, Abdo AA, Sanai FM, Al-Anazi M, Khalaf N, Viswan NA, Al-Ashgar H, Al-Kahtani K, Al-Humaidan H, Al-Swayeh R, Hussain Z, Alarifi S, Al-Okail M, Al-Qahtani A. 2013. Single nucleotide polymorphisms in CXCR1 gene and its association with hepatitis B infected patients in Saudi Arabia. *Ann Hepatol* 12:220–227.
81. Figueiredo CA, Barreto ML, Alcantara-Neves NM, Rodrigues LC, Cooper PJ, Cruz AA, Pontes-de-Carvalho LC, Lemaire DC, Dos Santos Costa R, Amorim LD, Vergara C, Rafaels N, Gao L, Foster C, Campbell M, Mathias RA, Barnes KC. 2012. Coassociations between IL10 polymorphisms, IL-10 production, helminth infection, and asthma/wheeze in an urban tropical population in Brazil. *J Allergy Clin Immunol* 131:1683–1690.
82. Alvarado-Navarro A, Montoya-Buelna M, Munoz-Valle JF, Lopez-Roa RI, Guillen-Vargas C, Fafutis-Morris M. 2008. The 3'UTR 1188 A/C polymorphism in the interleukin-12p40 gene (IL-12B) is associated with lepromatous leprosy in the west of Mexico. *Immunol Lett* 118:148–151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2008.03.015>.
83. Puthothu B, Krueger M, Forster J, Heinzmann A. 2006. Association between severe respiratory syncytial virus infection and IL13/IL4 haplotypes. *J Infect Dis* 193:438–441. <http://dx.doi.org/10.1086/499316>.
84. van der Pouw Kraan TC, van Veen A, Boeije LC, van Tuyl SA, de Groot ER, Stapel SO, Bakker A, Verweij CL, Aarden LA, van der Zee JS. 1999. An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes Immun* 1:61–65. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gen.6363630>.
85. Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, Akaiwa M, Mao XQ, Enomoto T, Dake Y, Shimazu S, Yamashita T, Sugawara N, Brodeur S, Geha R, Puri RK, Sayegh MH, Adra CN, Hamasaki N, Hopkin JM, Shirakawa T, Izuhara K. 2002. Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109: 980–987. <http://dx.doi.org/10.1067/mai.2002.124656>.
86. Martin MP, Dean M, Smith MW, Winkler C, Gerrard B, Michael NL, Lee B, Doms RW, Margolick J, Buchbinder S, Goedert JJ, O'Brien TR, Hilgartner MW, Vlahov D, O'Brien SJ, Carrington M. 1998. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* 282:1907–1911. <http://dx.doi.org/10.1126/science.282.5395.1907>.
87. McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. 1998. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet* 352: 866–870.
88. Carrington M, Dean M, Martin MP, O'Brien SJ. 1999. Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and its consequences. *Hum Mol Genet* 8:1939–1945. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/8.10.1939>.
89. Sadki K, Lamsyah H, Rueda B, Akil E, Sadak A, Martin J, El Aouad R. 2010. Analysis of MIF, FCGR2A and FCGR3A gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Moroccan population. *J Genet Genomics* 37:257–264. [http://dx.doi.org/10.1016/S1673-8527\(09\)60044-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1673-8527(09)60044-8).
90. Gomez LM, Sanchez E, Ruiz-Narvaez EA, Lopez-Nevot MA, Anaya JM, Martin J. 2007. Macrophage migration inhibitory factor gene influences the risk of developing tuberculosis in northwestern Colombian population. *Tissue Antigens* 70:28–33. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0039.2007.00843.x>.
91. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. 2004. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 46:293–298. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2004.04.037>.
92. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan JJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN. 2002. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 13:260–264.
93. Szeto CC, Chow KM, Poon P, Szeto CY, Wong TY, Li PK. 2004. Genetic polymorphism of VEGF: impact on longitudinal change of peritoneal transport and survival of peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 65:1947–1955. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00605.x>.
94. Yamamori M, Sakaeda T, Nakamura T, Okamura N, Tamura T, Aoyama N, Kamigaki T, Ohno M, Shirakawa T, Gotoh A, Kuroda Y, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K. 2004. Association of VEGF genotype with mRNA level in colorectal adenocarcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 325:144–150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.005>.

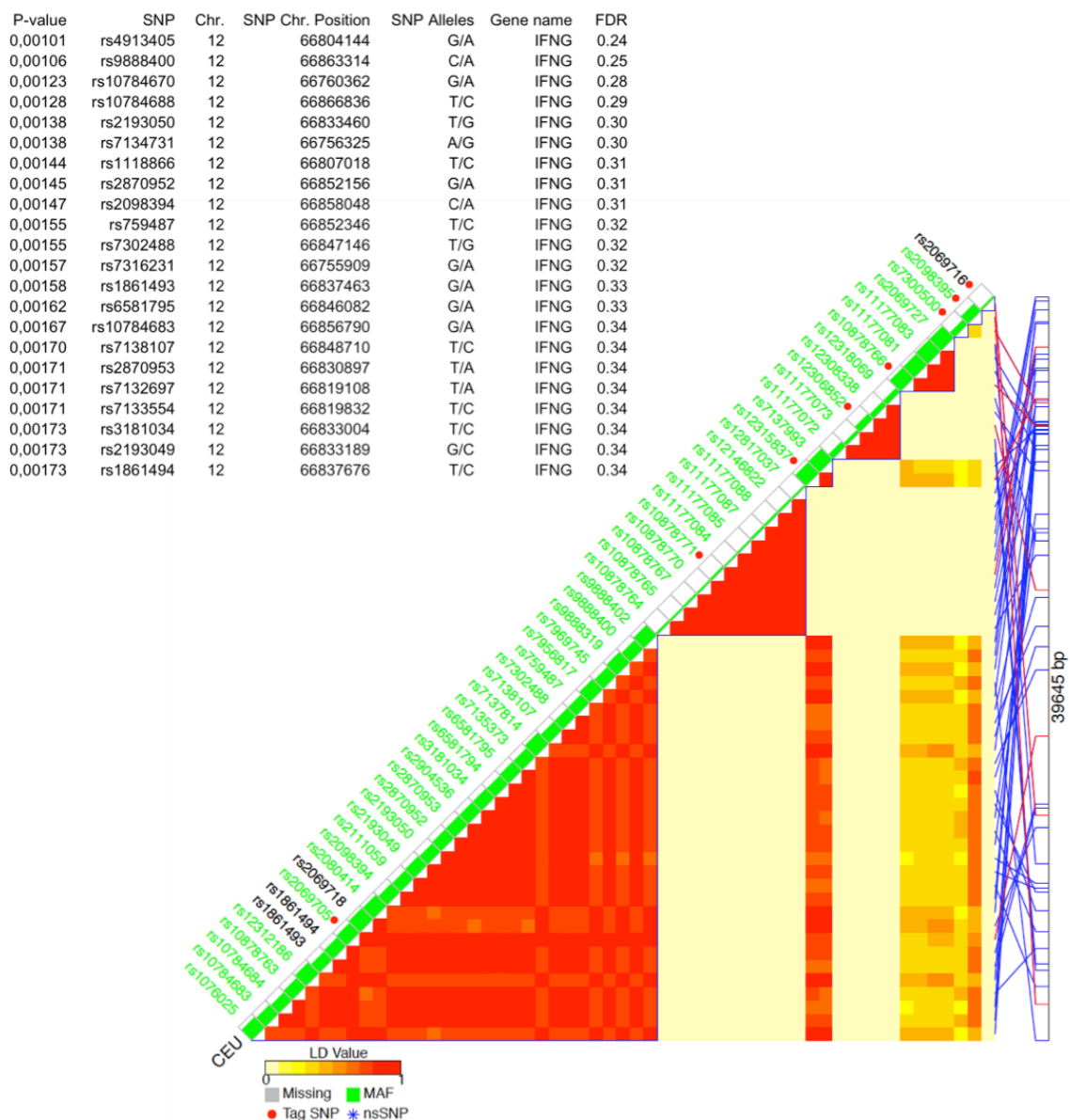
MATERIAL SUPLEMENTARIO

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Meff method for correction of multiple testing: SNPSpDlite software

SNPSpDlite calculates a multiple testing correction for SNPs that in LD with one another, by calculating the LD correlation matrix for given SNPs, then estimating the number of independent tests within the sample. The estimation of independency was performed with our data set in MERLIN/GOLD format (family ID, ID, father and mother ID, sex and genotypes). After uploading our data and according to the format proposed by Li and Ji (2005), the analysis estimated that there were 31 independent variants, resulting in a corrected significance level of $\alpha=0.0016$. After considering the number of inheritance models tested (co-dominant, dominant, recessive and log-additive), we came up with a final study-wide significance threshold of 0.0004. Detailed information about this user-friendly interface for performing this correction is available online <http://neurogenetics.qimrberghofer.edu.au/SNPSpDlite>.

Supplementary Figure 1. Correlation of IFN γ mRNA expression levels and IFN γ SNPs.



Data downloaded from the blood eQTL browser freely available at: <http://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>.

Supplementary Table 1. Overall haplotype association analysis.

| <i>IL4R</i> _rs2057768 | <i>IL4R</i> _rs2107356 | <i>IL4R</i> _rs1801275 | Haplotype Frequency | OR (95% CI) ^a | P-value |
|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|---------------------------|--------------|
| G | A | A | 0.3857 | 1.00 | --- |
| A | G | A | 0.2383 | 0.90 (0.59 - 1.39) | 0.65 |
| G | G | A | 0.1620 | 0.66 (0.38 - 1.13) | 0.13 |
| G | G | G | 0.1242 | 0.73 (0.42 - 1.27) | 0.26 |
| A | A | G | 0.0463 | 1.15 (0.41 - 3.19) | 0.79 |
| <i>IL8</i> _rs4073 | <i>IL8</i> _rs2227307 | | Haplotype Frequency | OR (95% CI) ^a | P-value |
| T | T | | 0.5549 | 1.00 | --- |
| A | G | | 0.3864 | 1.22 (0.89 - 1.66) | 0.22 |
| A | T | | 0.0452 | 1.45 (0.77 - 2.73) | 0.25 |
| T | G | | 0.0135 | 2.50 (0.86 - 7.20) | 0.091 |
| <i>IFNG</i> _rs1861494 | <i>IFNG</i> _rs2069705 | | Haplotype Frequency | OR (95% CI) ^a | P-value |
| T | T | | 0.644 | 1.00 | --- |
| C | C | | 0.2763 | 0.72 (0.50 - 1.03) | 0.072 |
| T | C | | 0.0616 | 0.34 (0.13 - 0.88) | 0.026 |
| C | T | | 0.018 | 1.24 (0.39 - 3.96) | 0.72 |

^aEstimates adjusted for age, gender, country of origin, allo-SCT and prophylaxis status.

Supplementary Table 2. Correlation of *IFN*_γ*rs2069705* and *IL12B**rs3212227* polymorphisms and production of IFN_γ, TNF and IL12p70 cytokines (under stimulation conditions).

| | WT: <i>IFN</i> _γ <i>rs2069705</i> T/T | C carriers: <i>IFN</i> _γ <i>rs2069705</i> T/C+C/C | P-value |
|-----------------------------------|--|--|--------------|
| IFNG | | | |
| <i>LPS</i> _{96h} | 210.60±72.86 | 1012.77±370.29 | 0.057 |
| <i>PHA</i> _{96h} | 7333.21±1491.07 | 14863.50±2880.94 | 0.036 |
| <i>LPS+PHA</i> _{96h} | 7685.79±809.65 | 18422.73±4226.69 | 0.030 |
| TNF | | | |
| <i>LPS</i> _{96h} | 216.34±49.61 | 404.11±76.64 | 0.058 |
| <i>PHA</i> _{96h} | 8031.21±5069.69 | 18808.08±3697.35 | 0.112 |
| <i>LPS+PHA</i> _{96h} | 5360.22±1787.63 | 22402.75±4822.59 | 0.006 |
| IL12p70 | | | |
| <i>LPS</i> _{96h} | 145.77±56.64 | 194.02±37.01 | 0.491 |
| <i>PHA</i> _{96h} | 163.62±68.01 | 250.03±26.47 | 0.271 |
| <i>LPS+PHA</i> _{96h} | 167.12±47.04 | 257.32±29.20 | 0.129 |
| | WT: <i>IL12B</i> <i>rs3212227</i> A/A | C carriers: <i>IL12B</i> <i>rs3212227</i> A/C+CC | P-value |
| IL12p70 | | | |
| <i>LPS</i> _{48h} | 119.99±21.13 | 197.27±19.31 | 0.049 |
| <i>Zymosan</i> _{48h} | 162.77±31.77 | 174.74±26.87 | 0.778 |
| <i>LPS+Zymosan</i> _{48h} | 165.60±28.37 | 166.63±34.59 | 0.928 |
| IFNG | | | |
| <i>LPS</i> _{48h} | 164.18±71.44 | 567.88±371.03 | 0.346 |
| <i>Zymosan</i> _{48h} | 299.89±128.45 | 557.81±152.10 | 0.224 |
| <i>LPS+Zymosan</i> _{48h} | 250.08±92.04 | 810.77±524.30 | 0.348 |
| TNF | | | |
| <i>LPS</i> _{48h} | 721.43±181.74 | 2913.76±1138.89 | 0.130 |
| <i>Zymosan</i> _{48h} | 12324.37±4449.39 | 23549.48±8754.77 | 0.295 |
| <i>LPS+Zymosan</i> _{48h} | 16353.00±9218.36 | 19064.97±7972.86 | 0.747 |

Abbreviations: WT, wild type; IFNG, interferon gamma.

Data expressed as Average±SEM; P-values according a t-test with Welch's correction. *P*<0.05 in bold.

Supplementary Table 3. Discriminative value *AUC* for models including immune-modulating variants.

| Reference model | | | | |
|---|---------|---------------------|----------------------------------|----------------------|
| SNPs | P-value | OR 95%CI | AUC 95%CI ^a | P-value ^b |
| age | 0.789 | 1.002 (0.985-1.019) | | |
| gender | 0.085 | 1.562 (0.941-2.592) | | |
| allo-SCT | 0.806 | 0.938 (0.564-1.561) | | |
| antifungal prophylaxis | 0.277 | 1.394 (0.766-2.535) | 0.564 (0.499-0.629) [∂] | 0.073 |
| Predictive model built with 4 non-significant SNPs | | | | |
| SNPs | P-value | OR 95%CI | AUC 95%CI ^a | P-value |
| <i>IL8</i> _{rs4073} | 0.589 | 1.154 (0.686-1.940) | | |
| <i>MIF</i> _{rs755622} | 0.386 | 1.268 (0.741-2.170) | | |
| <i>IL4R</i> _{rs2057768} | 0.775 | 1.075 (0.654-1.768) | | |
| <i>IL8RB</i> _{rs2234671} | 0.435 | 0.696 (0.280-1.729) | | |
| age | 0.798 | 1.002 (0.985-1.019) | | |
| gender | 0.081 | 1.581 (0.946-2.641) | | |
| allo-SCT | 0.900 | 0.968 (0.579-1.617) | | |
| antifungal prophylaxis | 0.272 | 1.400 (0.768-2.552) | 0.597 (0.530-0.664) [∂] | 0.0065 |

^aIncluding age, gender, allo-SCT and prophylactic status as variables never dropped from models.

[∂] These models did not show a statistically different prediction capacity (-2log likelihood ratio test, df=4, *P*=0.7707).

Residual deviance (Reference model): 417.03

Residual deviance (Significant SNPs model): 415.22

After removing missing values, 451 subjects (80 IA and 371 non-IA cases) were available for prediction capacity analysis.

Randomization test method

We compared the predictive model including significant SNPs, age, gender, allo-SCT, and prophylactic status ("original" model) with 50,000 "randomized" models in which the effect of SNPs on IA risk was neutralized. The neutralization of procedure was as follows: 1) we randomly reassigned genotypes for according the genotype frequencies observed in non-IA patients and kept unchanged affected status (IA/non-IA), age, gender, allo-SCT, and prophylactic status for each particular subject in the data set; 2) we adjust the model with reassigned genotypes including original affected status, age, gender, allo-SCT, and prophylactic status as covariates and; 3) we calculate the AUC for this randomized model. Then, we repeated this three-step process 50,000 times giving rise to 50,000 "randomized" models (null distribution) with an average AUC that was subsequently used to calculate Z score and P_{Z_score} -value.

AUC original model: 0.659

$P_{10.000\text{ iter}}=0.00188$

Average AUC of null distribution (10.000 models)=0.6001

Standard deviation of the AUC=0.0158

Z score=3.7361

P-Z score-value=9.34•10⁻⁰⁵

REFERENCES (Table 1)

1. **Choi EH, Foster CB, Taylor JG, Erichsen HC, Chen RA, Walsh TJ, Anttila VJ, Ruutu T, Palotie A, Chanock SJ.** 2003. Association between chronic disseminated candidiasis in adult acute leukemia and common IL4 promoter haplotypes. *J Infect Dis* **187**:1153-1156.
2. **Hackstein H, Hecker M, Kruse S, Bohnert A, Ober C, Deichmann KA, Bein G.** 2001. A novel polymorphism in the 5' promoter region of the human interleukin-4 receptor alpha-chain gene is associated with decreased soluble interleukin-4 receptor protein levels. *Immunogenetics* **53**:264-269.
3. **Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA.** 1999. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* **96**:365-371.
4. **Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA.** 1997. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* **337**:1720-1725.
5. **Cheng CH, Lee YS, Tsau YK, Lin TY.** 2011. Genetic polymorphisms and susceptibility to parenchymal renal infection among pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* **30**:309-314.
6. **van de Sande WW, Fahal A, Verbrugh H, van Belkum A.** 2007. Polymorphisms in genes involved in innate immunity predispose toward mycetoma susceptibility. *J Immunol* **179**:3065-3074.
7. **van der Kuyl AC, Polstra AM, Weverling GJ, Zorgdrager F, van den Burg R, Cornelissen M.** 2004. An IL-8 gene promoter polymorphism is associated with the risk of the development of AIDS-related Kaposi's sarcoma: a case-control study. *AIDS* **18**:1206-1208.
8. **Garey KW, Jiang ZD, Ghantaji S, Tam VH, Arora V, Dupont HL.** 2010. A common polymorphism in the interleukin-8 gene promoter is associated with an increased risk for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* **51**:1406-1410.
9. **Scarel-Caminaga RM, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Corbi SC, Sogumo PM, Orrico SR, Cirelli JA.** 2011. Haplotypes in the interleukin 8 gene and their association with chronic periodontitis susceptibility. *Biochem Genet* **49**:292-302.
10. **Almajhdi FN, Al-Ahdal M, Abdo AA, Sanai FM, Al-Anazi M, Khalaf N, Viswan NA, Al-Ashgar H, Al-Kahtani K, Al-Humaidan H, Al-Swayeh R, Hussain Z, Alarifi S, Al-Okail M, Al-Qahtani**

- A. 2013. Single nucleotide polymorphisms in CXCR1 gene and its association with hepatitis B infected patients in Saudi Arabia. *Ann Hepatol* **12**:220-227.
11. **Figueiredo CA, Barreto ML, Alcantara-Neves NM, Rodrigues LC, Cooper PJ, Cruz AA, Pontes-de-Carvalho LC, Lemaire DC, Dos Santos Costa R, Amorim LD, Vergara C, Rafaels N, Gao L, Foster C, Campbell M, Mathias RA, Barnes KC.** 2012. Coassociations between IL10 polymorphisms, IL-10 production, helminth infection, and asthma/wheeze in an urban tropical population in Brazil. *J Allergy Clin Immunol* doi:S0091-6749(12)01764-2.
 12. **Alvarado-Navarro A, Montoya-Buelna M, Munoz-Valle JF, Lopez-Roa RI, Guillen-Vargas C, Fafutis-Morris M.** 2008. The 3'UTR 1188 A/C polymorphism in the interleukin-12p40 gene (IL-12B) is associated with lepromatous leprosy in the west of Mexico. *Immunol Lett* **118**:148-151.
 13. **Puthothu B, Krueger M, Forster J, Heinzmann A.** 2006. Association between severe respiratory syncytial virus infection and IL13/IL4 haplotypes. *J Infect Dis* **193**:438-441.
 14. **van der Pouw Kraan TC, van Veen A, Boeije LC, van Tuyl SA, de Groot ER, Stapel SO, Bakker A, Verweij CL, Aarden LA, van der Zee JS.** 1999. An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes Immun* **1**:61-65.
 15. **Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, Akaiwa M, Mao XQ, Enomoto T, Dake Y, Shimazu S, Yamashita T, Sugawara N, Brodeur S, Geha R, Puri RK, Sayegh MH, Adra CN, Hamasaki N, Hopkin JM, Shirakawa T, Izuhara K.** 2002. Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* **109**:980-987.
 16. **Mezger M, Steffens M, Beyer M, Manger C, Eberle J, Toliat MR, Wienker TF, Ljungman P, Hebart H, Dornbusch HJ, Einsele H, Loeffler J.** 2008. Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **111**:534-536.
 17. **Martin MP, Dean M, Smith MW, Winkler C, Gerrard B, Michael NL, Lee B, Doms RW, Margolick J, Buchbinder S, Goedert JJ, O'Brien TR, Hilgartner MW, Vlahov D, O'Brien SJ, Carrington M.** 1998. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* **282**:1907-1911.
 18. **McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM.** 1998. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet* **352**:866-870.

19. **Carrington M, Dean M, Martin MP, O'Brien SJ.** 1999. Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and its consequences. *Hum Mol Genet* **8**:1939-1945.
20. **Sadki K, Lamsyah H, Rueda B, Akil E, Sadak A, Martin J, El Aouad R.** 2010. Analysis of MIF, FCGR2A and FCGR3A gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Moroccan population. *J Genet Genomics* **37**:257-264.
21. **Gomez LM, Sanchez E, Ruiz-Narvaez EA, Lopez-Nevot MA, Anaya JM, Martin J.** 2007. Macrophage migration inhibitory factor gene influences the risk of developing tuberculosis in northwestern Colombian population. *Tissue Antigens* **70**:28-33.
22. **Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E.** 2004. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **46**:293-298.
23. **Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN.** 2002. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* **13**:260-264.
24. **Szeto CC, Chow KM, Poon P, Szeto CY, Wong TY, Li PK.** 2004. Genetic polymorphism of VEGF: Impact on longitudinal change of peritoneal transport and survival of peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* **65**:1947-1955.
25. **Yamamori M, Sakaeda T, Nakamura T, Okamura N, Tamura T, Aoyama N, Kamigaki T, Ohno M, Shirakawa T, Gotoh A, Kuroda Y, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K.** 2004. Association of VEGF genotype with mRNA level in colorectal adenocarcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* **325**:144-150.

ARTÍCULO TERCERO

Common Genetic Polymorphisms within NFκB-Related Genes and the Risk of Developing Invasive Aspergillosis

Introducción. la Aspergilosis Invasiva (AI) es una infección oportunista causada por *Aspergillus*, un hongo patógeno presente de forma ubicua en el medio ambiente. En los últimos años un número creciente de publicaciones sugieren que el componente genético del hospedador es una de las principales causas de susceptibilidad a la enfermedad. Este estudio evaluó si 14 polimorfismos en los genes NFκb1, NFκb2, RelA, RelB, Rel e IRF4 influían en el riesgo de AI.

Métodos. La población de estudio consistió en 834 pacientes de alto riesgo (157 AI y 677 no AI) reclutados dentro del consorcio aspBIOmics y cuatro centros clínicos europeos. De los 834 pacientes, 157 fueron diagnosticados como AI probada o probable de acuerdo a los criterios revisados por la EORTC/MSG del 2008. El genotipado de los SNPs seleccionados se llevó a cabo con sondas KASPar[®] de acuerdo a los protocolos establecidos por el fabricante (LGC Genomics, UK) y el efecto de los polimorfismos seleccionados sobre el riesgo a padecer AI se evaluó mediante análisis de regresión logística ajustados por: edad, género, país de origen, TPH-Alo, enfermedad de base y profilaxis. La significación estadística se estableció en 0.001 tras la corrección de múltiples comparaciones de acuerdo al método de Meff. Además realizamos análisis de expresión génica con la base de datos eQTL y análisis de interacción SNP-SNP mediante el software MDR (*multifactor dimensionality reduction*)

Resultados. En nuestra cohorte de 834 pacientes no se encontraron asociaciones significativas entre los SNPs seleccionados y el riesgo a AI. Sin embargo en los análisis estratificados por trasplante encontramos que los portadores del genotipo IRF4_{rs12203592_T/T} presentaban un riesgo seis veces mayor a desarrollar la infección que aquellos pacientes portadores del alelo IRF4_{rs12203592_C} (OR_{REC} = 6.24, IC 95% 1.25 – 31.2, P = 0.026). Sin embargo la asociación de esta variante genética no alcanzó el umbral de significación. Además análisis de haplotipos mostraron los haplotipos IRF4_{AATC} e IRF4_{GGTC} (no incluye el alelo de riesgo IRF4_{rs12203592_T}) asociados a una disminución del riesgo a padecer la enfermedad, pero la magnitud de la asociación fue similar a la variante genética IRF4_{rs12203592}, por lo que debemos pensar que el efecto haplotípico es debido a este SNP.

Conclusiones. Nuestro estudio no muestra evidencias que sugieran un impacto clínico relevante de los marcadores en la vía de NFκB en el riesgo a desarrollar AI.



Common Genetic Polymorphisms within NF κ B-Related Genes and the Risk of Developing Invasive Aspergillosis

OPEN ACCESS

Edited by:

Frederic Lamoth,
Centre Hospitalier Universitaire
Vaudois, Switzerland

Reviewed by:

William J. Steinbach,
Duke University, USA
Pierre-Yves Bochud,
Centre Hospitalier Universitaire
Vaudois, Switzerland

*Correspondence:

Juan Sainz
juan.sainz@genyo.es

Specialty section:

This article was submitted to
Fungi and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 14 April 2016

Accepted: 26 July 2016

Published: 12 August 2016

Citation:

Lupiañez CB, Villaescusa MT,
Carvalho A, Springer J, Lackner M,
Sánchez-Maldonado JM, Canet LM,
Cunha C, Segura-Catena J,
Alcazar-Fuoli L, Solano C, Fianchi L,
Pagano L, Potenza L, Aguado JM,
Luppi M, Cuenca-Estrella M,
Lass-Flörl C, Einsele H, Vázquez L,
PCRAGA Study Group, Ríos-Tamayo
R, Loeffler J, Jurado M and Sainz J
(2016) Common Genetic
Polymorphisms within NF κ B-Related
Genes and the Risk of Developing
Invasive Aspergillosis.
Front. Microbiol. 7:1243.
doi: 10.3389/fmicb.2016.01243

Carmen B. Lupiañez^{1,2}, María T. Villaescusa^{3,4}, Agostinho Carvalho^{5,6}, Jan Springer⁷,
Michaela Lackner⁸, José M. Sánchez-Maldonado¹, Luz M. Canet¹, Cristina Cunha⁵,
Juana Segura-Catena^{1,2}, Laura Alcazar-Fuoli⁹, Carlos Solano¹⁰, Luana Fianchi¹¹,
Livio Pagano¹¹, Leonardo Potenza¹², José M. Aguado¹³, Mario Luppi¹²,
Manuel Cuenca-Estrella⁹, Cornelia Lass-Flörl⁸, Hermann Einsele⁷, Lourdes Vázquez³,
PCRAGA Study Group¹⁴, Rafael Ríos-Tamayo^{1,2}, Jurgen Loeffler⁷, Manuel Jurado^{1,2} and
Juan Sainz^{1,2*}

¹ Genomic Oncology Area, GENYO, Center for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, PTS Granada, Granada, Spain, ² Hematology Department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain, ³ Hematology Department, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain, ⁴ Hematology Department, Jiménez Díaz Foundation, Madrid, Spain, ⁵ Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal, ⁶ ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga, Portugal, ⁷ Universitätsklinikum Würzburg, Medizinische Klinik II, Würzburg, Germany, ⁸ Division of Hygiene and Medical Microbiology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria, ⁹ Mycology Reference Laboratory, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ¹⁰ Hematology Department, Clinic University Hospital of Valencia, Valencia, Spain, ¹¹ Istituto di Ematologia, Università Cattolica del S. Cuore, Rome, Italy, ¹² Department of Medical and Surgical Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, AOU Policlinico, Modena, Italy, ¹³ Unit of Infectious Diseases, University Hospital 12 de Octubre, Research Institute of Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain, ¹⁴ PCRAGA Study Group, Salamanca, Spain

Invasive Aspergillosis (IA) is an opportunistic infection caused by *Aspergillus*, a ubiquitously present airborne pathogenic mold. A growing number of studies suggest a major host genetic component in disease susceptibility. Here, we evaluated whether 14 single-nucleotide polymorphisms within *NF κ B1*, *NF κ B2*, *RelA*, *RelB*, *Rel*, and *IRF4* genes influence the risk of IA in a population of 834 high-risk patients (157 IA and 677 non-IA) recruited through a collaborative effort involving the aspBIOmics consortium and four European clinical institutions. No significant overall associations between selected SNPs and the risk of IA were found in this large cohort. Although a hematopoietic stem cell transplantation (HSCT)-stratified analysis revealed that carriers of the *IRF4*_{rs12203592T/T} genotype had a six-fold increased risk of developing the infection when compared with those carrying the C allele (OR_{REC} = 6.24, 95%CI 1.25–31.2, *P* = 0.026), the association of this variant with IA risk did not reach significance at experiment-wide significant threshold. In addition, we found an association of the *IRF4*_{AATC} and *IRF4*_{GGTG} haplotypes (not including the *IRF4*_{rs12203592T} risk allele) with a decreased risk of IA but the magnitude of the association was similar to the one observed in the single-SNP analysis, which

indicated that the haplotypic effect on IA risk was likely due to the *IRF4*_{rs12203592} SNP. Finally, no evidence of significant interactions among the genetic markers tested and the risk of IA was found. These results suggest that the SNPs on the studied genes do not have a clinically relevant impact on the risk of developing IA.

Keywords: Invasive Aspergillosis, genetic polymorphisms, susceptibility, NFκB-related genes, interaction

INTRODUCTION

Invasive Aspergillosis (IA) is an opportunistic infection often caused by species of *Aspergillus*, a common saprophytic filamentous fungus that is ubiquitously present in the environment. The LIFE initiative has estimated that around 30 million patients worldwide are at high risk of developing IA every year and over 200,000 patients develop the infection annually. Despite the substantial improvement in efficacy of newly developed anti-fungal drugs (mainly azoles alone or in combination with other antifungal drugs), IA continues to be a life-threatening infection in an increasing proportion of immunocompromised or critically ill subjects (Neofytos et al., 2009; Steinbach et al., 2012). IA is frequently encountered in patients of intensive care (Meersseman et al., 2007) and solid organ transplantation units (Singh et al., 2013) but also among those patients who undergo allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) or are diagnosed either with acute myeloid leukemia (AML) or acute lymphoid leukemia (ALL) and receive high-dose chemotherapy regimens (Steinbach et al., 2012; Neofytos et al., 2013a,b).

Although major clinical risk factors for IA have been identified (Kousha et al., 2011) and the management of high-risk patients has been improved through the optimization of prevention strategies and early initiation of anti-fungal prophylaxis, mortality rates for IA remain still today unacceptably high (up to 30–60%; Neofytos et al., 2009; Steinbach et al., 2012; Karthaus and Buchheidt, 2013). These observational findings suggest that additional factors may contribute to the risk of developing IA. In this regard, a growing number of studies have suggested that host genetic polymorphisms within or near immune-related genes may contribute to determine the risk of developing the infection (Kesh et al., 2005; Sainz et al., 2007a,b, 2008a,b, 2010, 2012; Bochud et al., 2008; Mezger et al., 2008; Ramaprakash et al., 2009; Cunha et al., 2010, 2011, 2014; Chai et al., 2011; Grube et al., 2013; Stappers et al., 2014; Wojtowicz et al., 2015a,b). Interestingly, a substantial proportion of the susceptibility markers identified to date for IA are located in genes directly or indirectly implicated in the activation of the nuclear factor-kappa B (NFκB) signaling pathway, which suggests a relevant role of this biological route in determining the risk of developing this fungal infection. In particular, it has been reported that single nucleotide polymorphisms (SNPs) within toll-like receptors (TLRs; Mambula et al., 2002; Kesh et al., 2005; Bochud et al., 2008; Pamer, 2008; Ramaprakash et al., 2009; Carvalho et al., 2012; Grube et al., 2013), C-type lectins (Cunha et al., 2010; Chai et al., 2011; Sainz et al., 2012), PTX3 (Cunha et al., 2014), and tumor necrosis factor receptors (TNFRs; Sainz et al., 2007b, 2010), which are pathogen recognition receptors

(PRRs) that often culminate in the activation of NFκB pathway, may render patients more susceptible to develop IA.

Based on these findings but also those that have demonstrated that *NFκB1* (p105/p50), *NFκB2* (p100/p52), Rel A (p65), RelB, c-Rel genes may form homo- and hetero-dimers to regulate the activation of the canonical and non-canonical NFκB pathways (Moynagh, 2005; Gilmore, 2006; Hoffmann et al., 2006; Schlitzer et al., 2013; Bajaan et al., 2016) but also IRF4-dependent immune responses (Boddicker et al., 2015), we hypothesized that the presence of common genetic polymorphisms within *NFκB1*, *NFκB2*, *RelA*, *RelB*, *Rel*, and *IRF4* genes might influence the risk of developing IA in high-risk patients. Thus, the aim of the present study was to investigate the relationship between 14 single nucleotide polymorphisms within these genes and the risk of IA but also to determine whether these variants could interact with each other to modify the risk of developing the infection.

MATERIAL AND METHODS

Study Population

Eight hundred and thirty-four high-risk European Caucasian patients undergoing allo-HSCT or being diagnosed with acute myeloid leukemia (AML) or acute lymphoid leukemia (ALL) and receiving intensive remission-induction chemotherapy were recruited in this case-control population-based study (Lupiañez et al., 2015). Three hundred and thirty-five patients were ascertained from the aspBIOmics consortium (<http://www.aspbioomics.eu>) whereas 341 patients were collected from two Spanish medical institutions (University Hospital of Salamanca and Clinic University Hospital of Valencia) and through a Spanish multicenter clinical trial (PCRAGA, EU clinical trial number: 2010-019406-17; Aguado et al., 2015). In addition, 148 patients were recruited from two Italian medical institutions (Università Cattolica del S. Cuore, Rome; and University of Modena and Reggio Emilia, AOU Policlinico, Modena). Of those 834 patients, a total of 157 patients were diagnosed with proven or probable IA according to the updated EORTC/MSG criteria (De Pauw et al., 2008) whereas the remaining 677 patients did not show any sign of fungal infection.

SNP Selection and Genotyping

Fourteen polymorphisms within the *NFκB1*, *NFκB2*, *RelA*, *RelB*, *Rel*, and *IRF4* genes were selected to be genotyped in the whole population (Table 1). SNP selection was based on previously reported associations with cancer (Curtin et al., 2010; Do et al., 2010; Han et al., 2011; Slattery et al., 2011; Seufert et al., 2013; Wang et al., 2014) and immune-related diseases including infections (Chen et al., 2006, 2016; Gregersen et al., 2009; Trynka et al., 2009; Eyre et al., 2010; Varadé et al., 2011; Bowes et al.,

TABLE 1 | NFκB-related polymorphisms.

| Gene | dbSNP rs# | Chr. | Location/Aa change | Nucleotide substitution | Effect-allele |
|-------|------------|------|--------------------|-------------------------|---------------|
| NFκB1 | rs4648110 | 4 | Intronic | A/T | A |
| NFκB2 | rs12769316 | 10 | Near gene | A/G | A |
| | rs1056890 | 10 | Near gene | C/T | T |
| | rs11574851 | 10 | N698N | C/T | T |
| REL | rs13031237 | 2 | Intronic | G/T | T |
| | rs842647 | 2 | Intronic | A/G | G |
| | rs13017599 | 2 | Near gene | A/G | A |
| RELA | rs7119750 | 11 | Intronic | C/T | T |
| RELB | rs2288918 | 19 | Intronic | C/T | C |
| IRF4 | rs872071 | 6 | 3'-UTR | A/G | G |
| | rs1877175 | 6 | 3'-UTR | A/G | A |
| | rs1050975 | 6 | 3'-UTR | A/G | G |
| | rs7768807 | 6 | 3'-UTR | C/T | C |
| | rs12203592 | 6 | Intronic | C/T | T |

SNP, Single Nucleotide Polymorphism; Aa, Aminoacid.

2012; Ellinghaus et al., 2012; Ali et al., 2013; Leung et al., 2014; Pan et al., 2015) but also because their potential functionality according to the Haploreg (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) and ENCODE annotation data (<https://genome.ucsc.edu/ENCODE/>). The genotyping of the selected polymorphisms was carried out at GENYO (Center for Genomics and Oncological Research: Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, Granada, Spain) using KASPar[®] assays (LGC Genomics, Hoddesdon, UK) according to manufacturer's instructions. For internal quality control, 5% of samples were randomly selected and included as duplicates. Concordance between the original and the duplicate samples for the 14 SNPs was $\geq 99.0\%$. Call rates for all SNPs were $\geq 90.0\%$ with the exception of the *IRF4*_{rs872071} SNP that was excluded from further analysis.

Statistical Analysis

The Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) test was performed in the control group (non-IA patients) by a standard observed-expected chi-square (χ^2). Logistic regression analysis adjusted for age, sex, country of origin, allo-HSCT, underlying disease and prophylaxis status was used to assess the main effects of the selected SNPs on IA risk. We also performed gene-HSCT interaction analyses to determine whether the association between SNPs and IA was of similar magnitude in HSCT (at highest risk) and non-HSCT patients. Although the selection of variables for adjustment was based on well-established risk factors for IA, the partial availability of data regarding prophylaxis status, type of chemotherapy, immunosuppressive drugs (HSCT), HLA mismatch (HSCT), or CMV status did not allow us to assess the impact of these factors on the genetic

associations tested. Statistical power of the overall and HSCT-stratified analyses was estimated using Quanto software (<http://hydra.usc.edu/gxe/>). All tests were conducted using the statistical software SPSS (v.20) and STATA (v.12) for MAC.

In order to account for multiple comparisons, we calculated an adjusted significance level using the Meff method (Nyholt, 2004) but also considering the number of inheritance models tested (codominant, dominant, recessive, and log-additive). Thus, the significant threshold used for the main effect analysis was 0.001 ($[0.05]/13$ independent genetic markers)/4 inheritance models).

Linkage Disequilibrium (LD) and Haplotype Analysis

Haplotype blocks were constructed from the genotyping data of the non-IA control group using the SNPtool (http://www.dkfz.de/de/molgen_epidemiology/tools/SNPtool.html; Chen et al., 2009) and the Haploview software (v.4.2). Selected polymorphisms within the same locus were not in linkage disequilibrium ensuring that these variants represented independent variability signals (Supplementary Figure 1). In addition to the analysis based on a single SNP, we performed haplotype frequency estimation and haplotype association analysis using SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). Haplotype frequencies were determined using the Expectation-maximization (EM) algorithm and the minimum haplotype frequency was set at 0.01, therefore assessing association for common haplotypes.

eQTL Analysis

We also assessed whether selected polymorphisms correlated with mRNA expression in the publicly available eQTL IGV browser for primary cells (<http://www.gtexportal.org/home/>) or using the Haploreg data.

SNP-SNP Interaction Analysis

We also were interested in testing whether NFκB-related SNPs could interact with each other to modify the risk of IA using the multifactor dimensionality reduction (MDR) software. A detailed description of the MDR method has been reported elsewhere (Ritchie et al., 2003; Moore, 2004). A 10-fold cross-validation analysis (exhaustive search) and permutation testing were used to confirm the best interaction models. MDR models were considered statistically significant at $P < 0.05$ (P sign). Statistical significance of each particular model was then re-evaluated using a 1.000-fold permutation test to compare observed testing balanced accuracies with those expected under the null hypothesis of no association (using the MDR permutation testing module 0.4.9 alpha). Interactions were visualized by constructing an interaction dendrogram according to the method described by Moore et al. (Moore, 2004). MDR software and MDR permutation testing module are open-source and freely available from <http://www.epistasis.org>.

RESULTS

In this population-based case-control study a total of 834 hematological patients were recruited. Demographic and clinical

TABLE 2 | Demographic and clinical characteristic of IA and non-IA patients.

| aspBIOmics consortium + UHS-GHV-PCR-AGA-UCSC-MORE populations | | | | |
|---|-------------------|-----------------------|---------------------------|--------------|
| | Overall (n = 834) | IA patients (n = 157) | Non-IA patients (n = 677) | P-value |
| DEMOGRAPHIC VARIABLES | | | | |
| Age | 52.89 ± 15.95 | 53.78 ± 15.37 | 52.69 ± 16.07 | NS |
| Sex ratio (male/female) | 1.28 (466/362) | 1.86 (99/53) | 1.18 (367/309) | 0.015 |
| HEMATOLOGICAL DISEASE | | | | |
| AML | 571 (68.62) | 112 (71.33) | 459 (68.00) | NS |
| ALL | 77 (09.25) | 18 (11.46) | 59 (08.74) | NS |
| Other | 184 (22.11) | 27 (17.19) | 157 (23.25) | NS |
| HSCT | 380 (45.56) | 72 (45.85) | 308 (45.49) | NS |
| PROPHYLAXIS* | | | | |
| Ever use of prophylaxis | 386 (46.28) | 56 (35.67) | 330 (48.74) | 0.006 |
| Never use of prophylaxis | 232 (27.81) | 54 (34.39) | 178 (26.29) | 0.006 |

HSCT, Hematopoietic stem cell transplantation; AML, acute myeloid leukemia; ALL, acute lymphoid leukemia; UHS, University hospital of Salamanca (Spain); GHV, General hospital of Valencia (Spain); PCRAGA clinical trial (EU clinical trial number: 2010-019406-17); UCSC, Università Cattolica del S. Cuore, Rome; MORE, University of Modena and Reggio Emilia, AOU Policlinico, Modena (Italy). P values ≤ 0.05 were considered significant and are highlighted in bold.

*Some patients had several prophylactic drugs.

Data on underlying disease and sex was not available for 2 and 6 patients, respectively. Prophylaxis status was unknown for 216 patients.

characteristics of these patients are summarized in **Table 2**. IA and non-IA patients had similar age but male patients were more prone to develop IA than females (male/female ratio = 1.86 vs. 1.18, $P = 0.015$). HSCT was common and equally distributed between IA and non-IA groups (45.85 vs. 45.49%) and the underlying disease (hematological disorder) was also uniform between both groups (**Table 2**). As expected, patients without prophylaxis were more prone to develop IA compared to those patients who take antifungal drugs (23.28 vs. 14.51%; **Table 2**).

All SNPs were in Hardy-Weinberg in the control group with the exception of the *REL*_{rs13031237} that was excluded from further analyses (non-IA; $P < 0.001$). Allele and genotype frequencies of selected SNPs were in line with those reported in Hapmap. Logistic regression analysis adjusted for age, sex, country of origin, allo-HSCT, and underlying disease showed that none of the selected SNPs was significantly associated with the risk of IA according to codominant, dominant, recessive and log-additive models of inheritance (**Table 3**). In addition, although prophylaxis status was only partially available in our population ($n = 618$), no significant changes in association estimates were observed when this clinical variable was included as covariate for adjustment (data not shown). No significant associations between the *NFκB1*, *NFκB2*, *cRel*, *RelB*, and *IRF4* polymorphisms and IA risk were also found in an allo-HSCT-restricted analysis considering donor genotypes and IA episodes occurred after transplantation (**Table 4**). Although our statistical power was limited (**Supplementary Table 1**), we found a fairly weak association of the *IRF4*_{rs12203592T/T} genotype with the risk of developing the infection at the nominal significance level of $P < 0.05$. Carriers of the *IRF4*_{rs12203592T/T} genotype showed a six-fold increased risk of developing IA when compared with patients carrying the wild type C-allele (OR_{REC} = 6.24, 95%CI 1.25–31.2, $P = 0.026$). Interestingly, we found that the presence

of the minor allele of the rs12203592 (T) strongly correlated with *IRF4* mRNA expression levels in whole blood samples and Epstein-Barr virus (EBV)-transformed lymphocytes ($P = 6.0 \bullet 10^{-7}$ and $P = 3.0 \bullet 10^{-7}$, respectively), which suggested a possible functional role of this polymorphism. Based on these interesting results, we decided to explore the potential functional impact of this polymorphism using Haploreg and ENCODE annotation data. This analysis revealed that the *IRF4*_{rs12203592} SNP resides on a strong enhancer and near of an active promoter that might constitute a regulatory element for IRF4. In addition, this analysis showed that this intronic polymorphism was predicted to change binding motifs for NFκB, HDAC2, and HMG-IY, which are proteins implicated in the transcriptional regulation of multiple innate and adaptive immune-related genes (Liu et al., 2001; Hayden et al., 2006; Falkenberg and Johnstone, 2014). In line with the findings suggesting a functional role of this variant, we also found that the rs12203592 SNP mapped among promoter and enhancer histone marks in different primary T-cell subtypes (TCD8+, TCD4+, Treg, and Th17) of different origin (peripheral blood, hematopoietic stem cells, cord blood, etc.) but also in primary B-cells, natural killer cells and monocytes. Although at this point it was tempting to speculate that the *IRF4*_{rs12203592} SNP might play a role in modulating the risk of developing IA likely through the regulation of *IRF4* mRNA expression levels, the association of this SNP with IA risk did not remained significant after correction for multiple testing ($P = 0.001$; **Table 4**) and, therefore, requires further confirmation. In agreement with the single-SNP analysis, haplotype association analysis showed fairly weak associations of the *IRF4*_{AATC} and *IRF4*_{GGTC} haplotypes (not including the *IRF4*_{rs12203592T} risk allele) with a decreased risk of IA. However, these associations were of similar magnitude to the one observed for the *IRF4*_{rs12203592} SNP in the single-SNP analysis (OR = 0.28, 95%CI

TABLE 3 | Association estimates for NFκB-related polymorphisms and IA.

| Variant_dbSNP | Gene | Effect-allele | OR (95% CI) ^a | P _{value} | OR (95% CI) ^b | P _{value} | OR (95% CI) ^c | P _{value} |
|---------------|-------|---------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| rs4648110 | NFκB1 | A | 0.69 (0.46–1.03) | 0.07 | 0.73 (0.30–1.81) | 0.50 | 0.74 (0.53–1.04) | 0.08 |
| rs12769316 | NFκB2 | A | 0.87 (0.57–1.31) | 0.50 | 0.79 (0.23–2.73) | 0.70 | 0.87 (0.61–1.26) | 0.48 |
| rs1056890 | NFκB2 | T | 1.41 (0.94–2.10) | 0.10 | 1.01 (0.58–1.76) | 0.96 | 1.19 (0.90–1.57) | 0.23 |
| rs11574851 | NFκB2 | T | 1.52 (0.89–2.60) | 0.13 | 1.47 (0.15–14.5) | 0.74 | 1.46 (0.89–2.40) | 0.14 |
| rs842647 | cREL | G | 0.92 (0.63–1.34) | 0.67 | 1.03 (0.50–2.14) | 0.93 | 0.95 (0.71–1.29) | 0.77 |
| rs13017599 | cREL | A | 0.78 (0.54–1.13) | 0.18 | 1.12 (0.67–1.88) | 0.66 | 0.90 (0.69–1.18) | 0.47 |
| rs7119750 | RELA | T | 0.94 (0.61–1.46) | 0.80 | 0.90 (0.19–4.26) | 0.89 | 0.95 (0.64–1.41) | 0.79 |
| rs2288918 | RELB | C | 1.18 (0.80–1.73) | 0.40 | 0.57 (0.30–1.09) | 0.09 | 0.97 (0.73–1.28) | 0.81 |
| rs1877175 | IRF4 | A | 0.82 (0.56–1.22) | 0.34 | 0.59 (0.22–1.58) | 0.30 | 0.82 (0.59–1.14) | 0.24 |
| rs1050975 | IRF4 | G | 1.00 (0.61–1.63) | 0.99 | 2.69 (0.75–9.61) | 0.13 | 1.10 (0.72–1.68) | 0.67 |
| rs7768807 | IRF4 | C | 1.33 (0.92–1.94) | 0.13 | 1.26 (0.66–2.40) | 0.48 | 1.24 (0.93–1.65) | 0.14 |
| rs12203592 | IRF4 | T | 1.01 (0.66–1.53) | 0.97 | 2.14 (0.64–7.19) | 0.22 | 1.07 (0.74–1.56) | 0.72 |

OR, odds ratio; CI, confidence interval; SNP, single nucleotide polymorphism. Estimates were adjusted for age, sex, country of origin, allo-SCT, and underlying disease. $P < 0.0011$ was defined as multiple testing significance threshold.

^aEstimates according to a dominant model of inheritance.

^bEstimates according to a recessive model of inheritance.

^cEstimates according to an additive model of inheritance.

TABLE 4 | Association estimates for NFκB-related polymorphisms and IA in HSCT patients (n = 239).

| Variant_dbSNP | Gene | Effect-allele | OR (95% CI) ^a | P _{value} | OR (95% CI) ^b | P _{value} | OR (95% CI) ^c | P _{value} |
|---------------|-------|---------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| rs4648110 | NFκB1 | A | 1.04 (0.51–2.12) | 0.92 | 2.99 (0.65–13.7) | 0.16 | 1.19 (0.65–2.18) | 0.57 |
| rs12769316 | NFκB2 | A | 1.29 (0.60–2.76) | 0.51 | NA (NA–NA) | NA | 1.16 (0.57–2.37) | 0.67 |
| rs1056890 | NFκB2 | T | 1.42 (0.67–3.00) | 0.36 | 1.32 (0.44–3.96) | 0.63 | 1.29 (0.75–2.24) | 0.36 |
| rs11574851 | NFκB2 | T | 1.59 (0.56–4.53)* | 0.38 | NA (NA–NA) | NA | NA (NA–NA) | NA |
| rs842647 | cREL | G | 0.81 (0.40–1.64) | 0.55 | 0.94 (0.23–3.74) | 0.93 | 0.86 (0.48–1.53) | 0.61 |
| rs13017599 | cREL | A | 0.84 (0.42–1.68) | 0.62 | 1.50 (0.61–3.67) | 0.38 | 1.03 (0.63–1.68) | 0.91 |
| rs7119750 | RELA | T | 0.53 (0.22–1.24) | 0.14 | NA (NA–NA) | NA | 0.52 (0.23–1.18) | 0.12 |
| rs2288918 | RELB | C | 1.17 (0.58–2.36) | 0.66 | 0.86 (0.33–2.26) | 0.76 | 1.04 (0.64–1.68) | 0.88 |
| rs1877175 | IRF4 | A | 0.68 (0.32–1.44) | 0.32 | 0.69 (0.08–6.00) | 0.74 | 0.72 (0.37–1.40) | 0.33 |
| rs1050975 | IRF4 | G | 0.65 (0.26–1.66) | 0.37 | 2.60 (0.37–18.4) | 0.34 | 0.84 (0.39–1.80) | 0.66 |
| rs7768807 | IRF4 | C | 0.73 (0.35–1.51) | 0.39 | 0.95 (0.30–3.03) | 0.93 | 0.82 (0.47–1.44) | 0.49 |
| rs12203592 | IRF4 | T | 1.04 (0.49–2.20) | 0.91 | 6.24 (1.25–31.2) | 0.026 | 1.33 (0.72–2.47) | 0.36 |

OR, odds ratio; CI, confidence interval; SNP, single nucleotide polymorphism; NA, not applicable. Estimates were adjusted for age, sex, country of origin, and underlying disease. $P < 0.05$ in bold. $P < 0.0011$ was defined as multiple testing significance threshold.

^aEstimates calculated according to a dominant model of inheritance.

^bEstimates calculated according to a recessive model of inheritance.

^cEstimates calculated according to an additive model of inheritance.

*Association estimates are referred to heterozygotes. Homozygotes for the rare allele were not found in the HSCT cohort.

0.08–0.95, $P = 0.042$ and OR = 0.04, 95%CI 0.00–0.71; **Table 5**) suggesting that the haplotypic effect was due to this intronic variant.

Finally, given the involvement of physiological complexes (p50/p65, p52/RelB, and p65-c-Rel) in the activation of the NFκB signaling pathway and the role of the p52/RelB complex in the transcriptional activation of the IRF4 (Boddicker et al., 2015), we also decided to investigate whether NFκB-related SNPs might interact to each other to modify the risk of IA. Results of the MDR analysis evaluating all possible combinations among the NFκB-related SNPs are shown in **Table 6** and **Figure 1**. The best model suggested an interaction between the $REL_{rs842647}$, $NFκB2_{rs1056890}$,

$IRF4_{rs7768807}$, and $REL_{rs13017599}$ SNPs to synergistically increase the risk of developing IA (TA = 0.5488, $P_{Sign} = 0.0010$). Although this model was the best to predict IA and presented a high cross validation consistency (CVC) (9/10), it did not remain statistically significant following 1000-fold permutation test ($P = 0.31$). In addition, we found a significant 2-locus interaction model including the $NFκB2_{rs1056890}$ and $IRF4_{rs7768807}$ SNPs to increase the risk of getting the infection (TA = 0.5353, $P_{Sign} = 0.0010$) but this interaction model also failed to retain statistical significance after 1000-fold permutation test ($P = 0.47$; **Table 6**). None of the best models included the $IRF4_{rs12203592}$ SNP.

TABLE 5 | Haplotype association analysis and risk of IA.

| Overall population (N = 834) | | | | | | HSCT population (N = 239) | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------|------|------------------------|---------------------------|------------------|--------|------------------|------|------------------------|------------------------|------------------|------|--------|-------------------|-------|
| NFκB ₂ rs1056890 | NFκB ₂ rs11574851 | NFκB ₂ rs12769316 | | Freq | OR(95%CI) ^a | P-value | | | | Freq | OR(95%CI) ^b | P-value | | | | | |
| | | | C | C | G | 0.4708 | 1.00 | – | C | C | G | 0.4827 | 1.00 | – | | | |
| | | | T | C | G | 0.3507 | 1.22 (0.91–1.64) | 0.19 | T | C | G | 0.3443 | 1.58 (0.87–2.85) | 0.13 | | | |
| | | | C | C | A | 0.1115 | 0.74 (0.45–1.23) | 0.25 | C | C | A | 0.1106 | 1.45 (0.58–3.62) | 0.43 | | | |
| | | | C | T | A | 0.0517 | 1.70 (0.99–2.90) | 0.053 | C | T | A | 0.0458 | 2.26 (0.73–7.02) | 0.16 | | | |
| RELrs842647 | RELrs13017599 | | | Freq | OR(95%CI) ^a | P-value | | | | Freq | OR(95%CI) ^b | P-value | | | | | |
| | | A | G | | 0.3786 | 1.00 | – | A | A | | 0.3685 | 1.00 | – | | | | |
| | | A | A | | 0.3640 | 0.76 (0.55–1.05) | 0.10 | A | G | | 0.3526 | 1.46 (0.78–2.74) | 0.24 | | | | |
| | | G | G | | 0.2473 | 0.76 (0.53–1.09) | 0.14 | G | G | | 0.2595 | 0.83 (0.41–1.68) | 0.61 | | | | |
| IRF4rs1050975 | IRF4rs1877175 | IRF4rs7768807 | IRF4rs12203592 | | Freq | OR(95%CI) ^a | P-value | | | | Freq | OR(95%CI) ^b | P-value | | | | |
| | | | | A | G | T | C | 0.4034 | 1.00 | – | A | G | T | C | 0.3536 | 1.00 | – |
| | | | | A | G | C | C | 0.1948 | 1.32 (0.90–1.95) | 0.16 | A | G | C | C | 0.2236 | 0.73 (0.34–1.56) | 0.41 |
| | | | | A | G | T | T | 0.1094 | 1.12 (0.64–1.93) | 0.70 | A | A | T | C | 0.1240 | 0.28 (0.08–0.95) | 0.042 |
| | | | | A | A | T | C | 0.1075 | 0.76 (0.42–1.40) | 0.39 | A | G | T | T | 0.1214 | 0.95 (0.38–2.37) | 0.92 |
| | | | | A | A | C | C | 0.0718 | 0.89 (0.48–1.65) | 0.71 | G | G | T | C | 0.0726 | 0.04 (0.00–0.71) | 0.029 |
| | | | | G | G | T | C | 0.0716 | 0.74 (0.36–1.52) | 0.41 | A | A | C | C | 0.0456 | 0.04 (0.00–111.9) | 0.42 |

^aEstimates calculated according to a dominant model of inheritance and adjusted for age, sex, country of origin, allo-SCT and underlying disease.

^bEstimates calculated according to a dominant model of inheritance and adjusted for age, sex, country of origin and underlying disease.

DISCUSSION

The NFκB pathway is implicated in fostering a wide variety of physiological processes such as immune cell turnover (Hayden et al., 2006), inflammation (Karin and Greten, 2005), T-cell differentiation (Th1, Th2, Th17, and Treg subsets; Oh and Ghosh, 2013), DC maturation (Burkly et al., 1995; Abe et al., 2003), cell apoptosis (Wang et al., 1998; Karin and Greten, 2005), cell adhesion (Chen et al., 1995; Lockyer et al., 1998; Chiang et al., 2008), and angiogenesis (Beinke and Ley, 2004). In the presence of fungal pathogens such as *Aspergillus fumigatus*, the canonical NFκB pathway involving NEMO-IKKα-IKKβ and NFκB-p50/p65 complexes can be activated by membrane pattern recognition receptors (PRRs) such as toll-like receptors (TLRs; Mambula et al., 2002; Bellochio et al., 2004; Roeder et al., 2004), C-type lectin receptors (CLRs; Serrano-Gómez et al., 2004; LeibundGut-Landmann et al., 2007; Gringhuis et al., 2009; Rivera et al., 2011; Saijo and Iwakura, 2011), cytokine receptors (IL1R, TNFRs) (Bozza et al., 2014), or

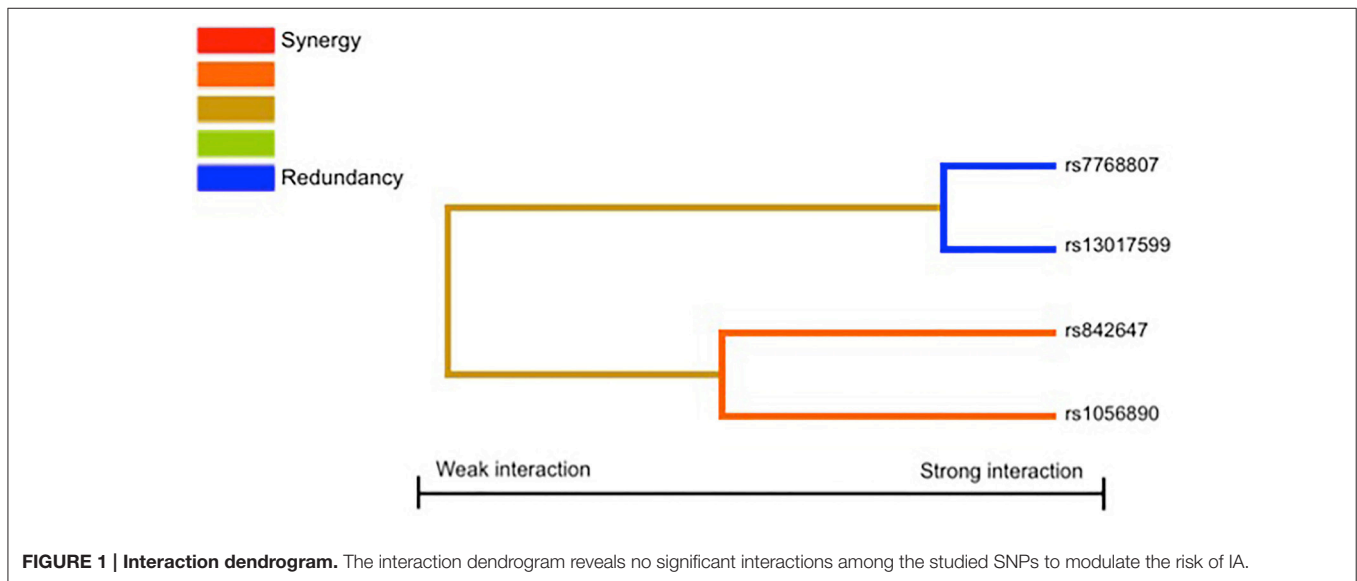
soluble PRRs like pentraxins (PTX3; Garlanda et al., 2002) that leads to the immediate secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF, IL1α, IL1β, IL6, IL12; Nicholson et al., 1996; Roeder et al., 2004), chemokines (CCL2, CCL3, CXCL2 and CXCL10; Shahan et al., 1998; Phadke and Mehrad, 2005; Reid et al., 2009), and reactive oxygen species (ROS; superoxide, hydroxyl radical, nitric oxide; Philippe et al., 2003; Chiang et al., 2008) but also to the expression of specific immune receptors and cell surface adhesion molecules (VCAM-1, E-Selectin; Akira et al., 2001; Chiang et al., 2008; Gringhuis et al., 2009). In addition, binding of fungal compounds to C-type lectins (Dectin-1 and Dectin-2) and the activation of certain TNF family cytokines (CD40L, BAFF, or LT-β) observed during fungal infections leads to the activation of the non-canonical NFκB pathway (p52/RelB), which is implicated in B-cell and DC maturation (Hu et al., 2011; Sun, 2012) and γδTh17 cell development (Powolny-Budnicka et al., 2011) but also in the control of the expression of a wide range of immune-related genes (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009; Vallabhapurapu and

TABLE 6 | Multifactor dimensionality reduction analysis summary.

| | Model | TA | Sign test (P-value) | P-value* | CVC |
|---|--|--------|---------------------|----------|------|
| 1 | <i>IRF4</i> _{rs7768807} | 0.5408 | 9 (0.0107) | 0.39 | 9/10 |
| 2 | <i>NFκB2</i> _{rs1056890} , <i>IRF4</i> _{rs7768807} | 0.5353 | 10 (0.0010) | 0.47 | 8/10 |
| 3 | <i>REL</i> _{rs842647} , <i>NFκB2</i> _{rs1056890} , <i>IRF4</i> _{rs7768807} | 0.4996 | 6 (0.0547) | 0.84 | 4/10 |
| 4 | <i>REL</i> _{rs842647} , <i>NFκB2</i> _{rs1056890} , <i>IRF4</i> _{rs7768807} , <i>REL</i> _{rs13017599} | 0.5488 | 10 (0.0010) | 0.31 | 9/10 |

TA, Testing accuracy; CVC, Cross-validation consistency.

Cross-validation and permutation testing were used to identify the best models. All possible two-way SNP interactions were tested using 10-fold cross-validation and the exhaustive search. The model with the highest testing balanced accuracy (TA) and cross validation consistency (CVC) was selected as "best model." Statistical significance was evaluated by the Sign test and confirmed using a 1,000-fold permutation test to compare observed testing balanced accuracies with those expected under the null hypothesis of no association (using the MDR permutation testing module 0.4.9 alpha). *1000-fold permutation test ($\alpha = 0.001$, TA = 0.6370; $\alpha = 0.01$, TA = 0.5984; $\alpha = 0.05$, TA = 0.5830; $\alpha = 0.10$, TA = 0.5717).



Karin, 2009; Plato et al., 2013). On the other hand, it has recently been suggested the existence of a CD30-p52/Relb-IRF4 loop to regulate the NFκB pathway and cell proliferation (Boddicker et al., 2015) and a role of IRF4 in modulating the differentiation of different DC (Bajaña et al., 2016) and Th17-mediated immune responses against *A. fumigatus* (Schlitzer et al., 2013).

Considering the central role of the PRRs-NFκB pathways and IRF4 in the immune responses against *A. fumigatus* (Oh and Ghosh, 2013; Schlitzer et al., 2013; Williams et al., 2013) and those studies suggesting that genetic host factors may account for differences in susceptibility to IA (Ok et al., 2011; van der Velden et al., 2011), we decided to investigate the link between genetic polymorphisms within *NFκB1*, *NFκB2*, *RelA*, *RelB*, *Rel*, and *IRF4* genes and the risk of IA. In spite of the growing number of studies assessing the role of genetic polymorphisms within PRRs (*TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *Dectin-1*, *Dectin-2*, *DC-SIGN*, *PTX3*; Kesh et al., 2005; Bochud et al., 2008; Pamer, 2008; Cunha et al., 2010, 2011, 2014; Chai et al., 2011; Sainz et al., 2012; Grube et al., 2013; Wojtowicz et al., 2015b), cytokines (*IL1*, *IL10*, *IFNG*; Sainz et al., 2007a, 2008a; Lupiañez et al., 2015), and their receptors (*IL4R*, *TNFR1*, and *TNFR2*; Sainz et al., 2007b, 2010; Lupiañez et al., 2015) in determining the susceptibility to invasive fungal infections, this is the first study that attempts to

evaluate the impact of polymorphisms within *NFκB1*, *NFκB2*, *RelA*, *RelB*, *REL*, and *IRF4* genes on the risk of developing IA. Our data showed no significant overall associations between selected SNPs and IA infection. The best result was the association of the *IRF4*_{rs12203592} SNP with an increased risk of IA in HSC T patients that suggested a weak effect of this locus on the risk of IA that might become evident only in those patients with a more profound degree of immunosuppression. However, despite the potential interest of these results and the evidences supporting a functional role of the *IRF4*_{rs12203592} variant in regulating *IRF4* mRNA expression and thereby modulating the NFκB pathway (Boddicker et al., 2015) and IRF4-dependent immune responses (Schlitzer et al., 2013; Bajaña et al., 2016), the association of this variant did not remain significant at the experiment-wide significance threshold, suggesting that the association of this polymorphism with IA could be due to chance. Haplotype analysis showed a small effect of common haplotypes on IA risk but the magnitude of these effects suggested that the observed association was likely due to the *IRF4*_{rs12203592} SNP rather than the combined effect of the *IRF4* SNPs. In addition, when we evaluated whether there was any significant interaction among the SNPs analyzed, we did not observe any consistent interaction model that could affect the risk of developing IA.

In conclusion, this case-control study does not provide strong evidence of a relationship between polymorphisms within *NFκB1*, *NFκB2*, *cRel*, *RelB*, and *IRF4* genes and IA risk. Nonetheless, given the limited statistical power of the HSCT-stratified analysis (80% to detect odds ratio of 2.1 at $\alpha = 0.001$ for a SNP with a frequency of 0.25, dominant model) and the evidences suggesting a functional role of the *IRF4*_{rs12203592} SNP, we cannot dismiss the possibility of a small but still real effect of this variant or its haplotypes on the risk of IA in HSCT patients. Future case-control population-based studies conducted in larger HSCT populations are now warranted to further evaluate whether the *IRF4* locus may have a role in determining the susceptibility to IA.

ETHICS STATEMENT

The study protocol was approved by the local ethics review boards of all participating centers and written informed consent was obtained from each patient before inclusion in accordance with the Declaration of Helsinki. Ethical approval for this study was provided by the Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC) of the Virgen de las Nieves Hospital (Granada), University Hospital of Salamanca (Salamanca), Clinic University Hospital of Valencia (Valencia), and the Centro Nacional de Microbiología (27_2012). The PCRAGA trial is registered with ClinicalTrials.gov (NCT01742026) and EudraCT (2010-019406-17). Ethical approval was also provided by the Subcomissao de Ética para as Ciências da Vida e Saude (SECVS), University of Minho (approval SECVS 125/2014), (23533/16), the Comitato Etico Provinciale di Modena, the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Würzburg (42/06) and the Ethic votum of the Medical University Innsbruck (UN4529).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MJ and JS conceived the study and participated in its design and coordination. CBL performed the genetic analyses. TV, AC, JSp, ML, JMS-M, LMC, CC, JS-C, LA-F, CS, LF, LP, LPo, JMA, MLu, MC-E, CL-F, HE, LV, RR-T, JL, MJ and PCRAGA Study Group coordinated patient's recruitment and provided the clinical data.

REFERENCES

- Abe, K., Yarovinsky, F. O., Murakami, T., Shakhov, A. N., Tumanov, A. V., Ito, D., et al. (2003). Distinct contributions of TNF and LT cytokines to the development of dendritic cells *in vitro* and their recruitment *in vivo*. *Blood* 101, 1477–1483. doi: 10.1182/blood.V101.4.1477
- Aguado, J. M., Vázquez, L., Fernandez-Ruiz, M., Villaescusa, T., Ruiz-Camps, I., Barba, P., et al. (2015). Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based *Aspergillus* DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 60, 405–414. doi: 10.1093/cid/ciu833
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2, 675–680. doi: 10.1038/90609

JS analysed the data. MJ and JS drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This study was supported by grants PI12/02688 from Fondo de Investigaciones Sanitarias (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain), the ERA-NET PathoGenoMics (03159000A; Ministerio de Ciencia e Innovación PIM2010EPA-00756, Madrid, Spain), the Collaborative Research Center / Transregio 124 FungiNet, the Austrian Science Foundation (FWF I-656-B09), the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), cofunded by Programa Operacional Regional do Norte (ON.2—O Novo Norte), the Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN) through the Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) and the Projeto Estratégico – LA 26 – 2013–2014 (PEst-C/SAU/LA0026/2013). Agostinho Carvalho and Cristina Cunha were supported by the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal (IF/00735/2014 and SFRH/BPD/96176/2013, respectively). The PCRAGA trial was supported by an unrestricted grant from Pfizer, which had no involvement or control over the collection, analysis, and interpretation of data; the writing of the report; or the decision to submit the paper for publication. This study was also supported by Astellas Pharma Inc. and a donation from Consuelo González Moreno, an acute myeloid leukemia survivor.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01243>

Supplementary Table 1 | Statistical power calculations for NFκB-related polymorphisms. SNP, Single Nucleotide Polymorphism; MAF, Aa, Aminoacid; ND, not determined; NP, no statistical power. Assumptions: IA incidence of 3.5% (Morgan et al. *Med Mycol* 2005; 43:S49-S58) and an $\alpha = 0.001$ (study-wide significance). *The statistical power was calculated based on genotype frequencies and assuming a dominant model of inheritance. *The statistical power was calculated based on genotype frequencies and assuming a recessive model of inheritance.

Supplementary Figure 1 | Linkage disequilibrium (LD) blocks in the NFκB-related genes calculated in our population. Numbers into squares indicate r^2 values.

- Ali, F. R., Barton, A., Smith, R. L., Bowes, J., Flynn, E., Mangino, M., et al. (2013). An investigation of rheumatoid arthritis loci in patients with early-onset psoriasis validates association of the REL gene. *Br. J. Dermatol.* 168, 864–866. doi: 10.1111/bjd.12106
- Bajaña, S., Turner, S., Paul, J., Ainsua-Enrich, E., and Kovats, S. (2016). IRF4 and IRF8 Act in CD11c+ cells to regulate terminal differentiation of lung tissue dendritic cells. *J. Immunol.* 196, 1666–1677. doi: 10.4049/jimmunol.1501870
- Beinke, S., and Ley, S. C. (2004). Functions of NF-κB1 and NF-κB2 in immune cell biology. *Biochem. J.* 382(Pt 2), 393–409. doi: 10.1042/BJ20040544
- Bellocchio, S., Moretti, S., Perruccio, K., Fallarino, F., Bozza, S., Montagnoli, C., et al. (2004). TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J. Immunol.* 173, 7406–7415. doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7406
- Bochud, P. Y., Chien, J. W., Marr, K. A., Leisenring, W. M., Upton, A., Janer, M., et al. (2008). Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 359, 1766–1777. doi: 10.1056/NEJMoa0802629

- Boddicker, R. L., Kip, N. S., Xing, X., Zeng, Y., Yang, Z. Z., Lee, J. H., et al. (2015). The oncogenic transcription factor IRF4 is regulated by a novel CD30/NF-κB positive feedback loop in peripheral T-cell lymphoma. *Blood* 125, 3118–3127. doi: 10.1182/blood-2014-05-578575
- Bowes, J., Ho, P., Flynn, E., Ali, F., Marzo-Ortega, H., Coates, L. C., et al. (2012). Comprehensive assessment of rheumatoid arthritis susceptibility loci in a large psoriatic arthritis cohort. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1350–1354. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200802
- Bozza, S., Campo, S., Arseni, B., Inforzato, A., Ragnar, L., Bottazzi, B., et al. (2014). PTX3 binds MD-2 and promotes TRIF-dependent immune protection in aspergillosis. *J. Immunol.* 193, 2340–2348. doi: 10.4049/jimmunol.1400814
- Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L. A., Olson, D., et al. (1995). Expression of reB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373, 531–536. doi: 10.1038/373531a0
- Carvalho, A., De Luca, A., Bozza, S., Cunha, C., D'Angelo, C., Moretti, S., et al. (2012). TLR3 essentially promotes protective class I-restricted memory CD8(+) T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients. *Blood* 119, 967–977. doi: 10.1182/blood-2011-06-362582
- Chai, L. Y., de Boer, M. G., van der Velden, W. J., Plantinga, T. S., van Spriel, A. B., Jacobs, C., et al. (2011). The Y238X stop codon polymorphism in the human β-glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *J. Infect. Dis.* 203, 736–743. doi: 10.1093/infdis/jiq102
- Chen, B., Wilkening, S., Drechsel, M., and Hemminki, K. (2009). SNP_tools: A compact tool package for analysis and conversion of genotype data for MS-Excel. *BMC Res. Notes* 2, 214. doi: 10.1186/1756-0500-2-214
- Chen, C. C., Rosenbloom, C. L., Anderson, D. C., and Manning, A. M. (1995). Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I κ B-α phosphorylation. *J. Immunol.* 155, 3538–3545.
- Chen, F., Xu, L., Zhao, T., Xiao, X., Pan, Y., and Hou, S. (2016). Genetic variation in the REL gene increases risk of Behcet's Disease in a Chinese han population but that of PRKQC does not. *PLoS ONE* 11:e0147350. doi: 10.1371/journal.pone.0147350
- Chen, W. J., Yang, J. Y., Lin, J. H., Fann, C. S., Osyetrov, V., King, C. C., et al. (2006). Nasopharyngeal shedding of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus is associated with genetic polymorphisms. *Clin. Infect. Dis.* 42, 1561–1569. doi: 10.1086/503843
- Chiang, L. Y., Sheppard, D. C., Gravelat, F. N., Patterson, T. F., and Filler, S. G. (2008). *Aspergillus fumigatus* stimulates leukocyte adhesion molecules and cytokine production by endothelial cells *in vitro* and during invasive pulmonary disease. *Infect. Immun.* 76, 3429–3438. doi: 10.1128/IAI.01510-07
- Cunha, C., Aversa, F., Lacerda, J. F., Busca, A., Kurzai, O., Grube, M., et al. (2014). Genetic PTX3 deficiency and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 370, 421–432. doi: 10.1056/NEJMoa1211161
- Cunha, C., Di Ianni, M., Bozza, S., Giovannini, G., Zagarella, S., Zelante, T., et al. (2010). Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood* 116, 5394–5402. doi: 10.1182/blood-2010-04-279307
- Cunha, C., Giovannini, G., Pierini, A., Bell, A. S., Sorci, G., Riuizi, F., et al. (2011). Genetically-determined hyperfunction of the S100B/RAGE axis is a risk factor for aspergillosis in stem cell transplant recipients. *PLoS ONE* 6:e27962. doi: 10.1371/journal.pone.0027962
- Curtin, K., Wolff, R. K., Herrick, J. S., Abo, R., and Slattery, M. L. (2010). Exploring multilocus associations of inflammation genes and colorectal cancer risk using hapConstructor. *BMC Med. Genet.* 11:170. doi: 10.1186/1471-2350-11-170
- De Pauw, B., Walsh, T. J., Donnelly, J. P., Stevens, D. A., Edwards, J. E., Calandra, T., et al. (2008). Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin. Infect. Dis.* 46, 1813–1821. doi: 10.1086/588660
- Do, T. N., Ucisik-Akkaya, E., Davis, C. F., Morrison, B. A., and Dorak, M. T. (2010). An intronic polymorphism of IRF4 gene influences gene transcription *in vitro* and shows a risk association with childhood acute lymphoblastic leukemia in males. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 292–300. doi: 10.1016/j.bbdis.2009.10.015
- Ellinghaus, E., Stuart, P. E., Ellinghaus, D., Nair, R. P., Debrus, S., Raelson, J. V., et al. (2012). Genome-wide meta-analysis of psoriatic arthritis identifies susceptibility locus at REL. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1133–1140. doi: 10.1038/jid.2011.415
- Eyre, S., Hinks, A., Flynn, E., Martin, P., Wilson, A. G., Maxwell, J. R., et al. (2010). Confirmation of association of the REL locus with rheumatoid arthritis susceptibility in the UK population. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1572–1573. doi: 10.1136/ard.2009.122887
- Falkenberg, K. J., and Johnstone, R. W. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 673–691. doi: 10.1038/nrd4360
- Garlanda, C., Hirsch, E., Bozza, S., Salustri, A., De Acetis, M., Nota, R., et al. (2002). Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 420, 182–186. doi: 10.1038/nature01195
- Geijtenbeek, T. B., and Gringhuis, S. I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 465–479. doi: 10.1038/nri2569
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680–6684. doi: 10.1038/sj.onc.1209954
- Gregersen, P. K., Amos, C. I., Lee, A. T., Lu, Y., Remmers, E. F., Kastner, D. L., et al. (2009). REL, encoding a member of the NF-κB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 41, 820–823. doi: 10.1038/ng.395
- Gringhuis, S. I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., Wevers, B., Bruijns, S. C., et al. (2009). Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-κB activation through Raf-1 and Syk. *Nat. Immunol.* 10, 203–213. doi: 10.1038/ni.1692
- Grube, M., Loeffler, J., Mezger, M., Krüger, B., Echtenacher, B., Hoffmann, P., et al. (2013). TLR5 stop codon polymorphism is associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Med. Mycol.* 51, 818–825. doi: 10.3109/13693786.2013.809630
- Han, J., Qureshi, A. A., Nan, H., Zhang, J., Song, Y., Guo, Q., et al. (2011). A germline variant in the interferon regulatory factor 4 gene as a novel skin cancer risk locus. *Cancer Res.* 71, 1533–1539. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1818
- Hayden, M. S., West, A. P., and Ghosh, S. (2006). NF-κB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758–6780. doi: 10.1038/sj.onc.1209943
- Hoffmann, A., Natoli, G., and Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-κB signaling module. *Oncogene* 25, 6706–6716. doi: 10.1038/sj.onc.1209933
- Hu, H., Wu, X., Jin, W., Chang, M., Cheng, X., and Sun, S. C. (2011). Noncanonical NF-κB regulates inducible costimulator (ICOS) ligand expression and T follicular helper cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12827–12832. doi: 10.1073/pnas.1105774108
- Karin, M., and Greten, F. R. (2005). NF-κB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749–759. doi: 10.1038/nri1703
- Karthus, M., and Buchheid, D. (2013). Invasive aspergillosis: new insights into disease, diagnostic and treatment. *Curr. Pharm. Des.* 19, 3569–3594. doi: 10.2174/13816128113199990330
- Kesh, S., Mensah, N. Y., Peterlongo, P., Jaffe, D., Hsu, K., Van den Brink, M., et al. (2005). TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1062, 95–103. doi: 10.1196/annals.1358.012
- Kousha, M., Tadi, R., and Soubani, A. O. (2011). Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur. Respir. Rev.* 20, 156–174. doi: 10.1183/09059180.00001011
- LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M. J., Osorio, F., Slack, E. C., Tsoni, S. V., et al. (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat. Immunol.* 8, 630–638. doi: 10.1038/ni1460
- Leung, G., Baggott, C., West, C., Elboim, C., Paul, S. M., Cooper, B. A., et al. (2014). Cytokine candidate genes predict the development of secondary lymphedema following breast cancer surgery. *Lymphat. Res. Biol.* 12, 10–22. doi: 10.1089/lrb.2013.0024
- Liu, F., Chau, K. Y., Arlotta, P., and Ono, S. J. (2001). The HMG I proteins: dynamic roles in gene activation, development, and tumorigenesis. *Immunol. Res.* 24, 13–29. doi: 10.1385/IR:24:1:13
- Lockyer, J. M., Colladay, J. S., Alperin-Lea, W. L., Hammond, T., and Buda, A. J. (1998). Inhibition of nuclear factor-κB-mediated adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Circ. Res.* 82, 314–320. doi: 10.1161/01.RES.82.3.314

- Lupiañez, C. B., Canet, L. M., Carvalho, A., Alcazar-Fuoli, L., Springer, J., Lackner, M., et al. (2015). Polymorphisms in host immunity-modulating genes and risk of invasive aspergillosis: results from the AspBIOmics Consortium. *Infect. Immun.* 84, 643–657. doi: 10.1128/IAI.01359-15
- Mambula, S. S., Sau, K., Henneke, P., Golenbock, D. T., and Levitz, S. M. (2002). Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* 277, 39320–39326. doi: 10.1074/jbc.M201683200
- Meersseman, W., Lagrou, K., Maertens, J., and Van Wijngaerden, E. (2007). Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.* 45, 205–216. doi: 10.1086/518852
- Mezger, M., Steffens, M., Beyer, M., Manger, C., Eberle, J., Toliat, M. R., et al. (2008). Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 111, 534–536. doi: 10.1182/blood-2007-05-090928
- Moore, J. H. (2004). Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4, 795–803. doi: 10.1586/14737159.4.6.795
- Moynagh, P. N. (2005). The NF-κB pathway. *J. Cell Sci.* 118(Pt 20), 4589–4592. doi: 10.1242/jcs.02579
- Neofytos, D., Horn, D., Anaissie, E., Steinbach, W., Olyaei, A., Fishman, J., et al. (2009). Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin. Infect. Dis.* 48, 265–273. doi: 10.1086/595846
- Neofytos, D., Lu, K., Hatfield-Seung, A., Blackford, A., Marr, K. A., Treadway, S., et al. (2013a). Epidemiology, outcomes, and risk factors of invasive fungal infections in adult patients with acute myelogenous leukemia after induction chemotherapy. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75, 144–149. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.001
- Neofytos, D., Treadway, S., Ostrander, D., Alonso, C. D., Dierberg, K. L., Nussenblatt, V., et al. (2013b). Epidemiology, outcomes, and mortality predictors of invasive mold infections among transplant recipients: a 10-year, single-center experience. *Transpl. Infect. Dis.* 15, 233–242. doi: 10.1111/tid.12060
- Nicholson, W. J., Slight, J., and Donaldson, K. (1996). Inhibition of the transcription factors NF-κ B and AP-1 underlies loss of cytokine gene expression in rat alveolar macrophages treated with a diffusible product from the spores of *Aspergillus fumigatus*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15, 88–96. doi: 10.1165/ajrcmb.15.1.8679226
- Nyholt, D. R. (2004). A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 765–769. doi: 10.1086/383251
- Oh, H., and Ghosh, S. (2013). NF-κB: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunol. Rev.* 252, 41–51. doi: 10.1111/imr.12033
- Ok, M., Einsele, H., and Loeffler, J. (2011). Genetic susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infections. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 445–452. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.04.013
- Pamer, E. G. (2008). TLR polymorphisms and the risk of invasive fungal infections. *N. Engl. J. Med.* 359, 1836–1838. doi: 10.1056/NEJMe0806412
- Pan, W., Zhang, A. Q., Gu, W., Gao, J. W., Du, D. Y., Zhang, L. Y., et al. (2015). Identification of haplotype tag single nucleotide polymorphisms within the nuclear factor-κB family genes and their clinical relevance in patients with major trauma. *Crit. Care* 19, 95. doi: 10.1186/s13054-015-0836-6
- Phadke, A. P., and Mehrad, B. (2005). Cytokines in host defense against *Aspergillus*: recent advances. *Med. Mycol.* 43 (Suppl. 1), S173–S176. doi: 10.1080/13693780500052099
- Philippe, B., Ibrahim-Granet, O., Prévost, M. C., Gougerot-Pocidallo, M. A., Sanchez Perez, M., Van der Meeren, A., et al. (2003). Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect. Immun.* 71, 3034–3042. doi: 10.1128/IAI.71.6.3034-3042.2003
- Plato, A., Willment, J. A., and Brown, G. D. (2013). C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. *Int. Rev. Immunol.* 32, 134–156. doi: 10.3109/08830185.2013.777065
- Powolny-Budnicka, I., Riemann, M., Tanzer, S., Schmid, R. M., Hehlhans, T., and Weih, F. (2011). RelA and RelB transcription factors in distinct thymocyte populations control lymphotoxin-dependent interleukin-17 production in gamma delta T cells. *Immunity* 34, 364–374. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.019
- Ramaprakash, H., Ito, T., Standiford, T. J., Kunkel, S. L., and Hogaboam, C. M. (2009). Toll-like receptor 9 modulates immune responses to *Aspergillus fumigatus* conidia in immunodeficient and allergic mice. *Infect. Immun.* 77, 108–119. doi: 10.1128/IAI.00998-08
- Reid, D. M., Gow, N. A., and Brown, G. D. (2009). Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 30–37. doi: 10.1016/j.coi.2009.01.003
- Ritchie, M. D., Hahn, L. W., and Moore, J. H. (2003). Power of multifactor dimensionality reduction for detecting gene-gene interactions in the presence of genotyping error, missing data, phenocopy, and genetic heterogeneity. *Genet. Epidemiol.* 24, 150–157. doi: 10.1002/gepi.10218
- Rivera, A., Hohl, T. M., Collins, N., Leiner, I., Gallegos, A., Saijo, S., et al. (2011). Dectin-1 diversifies *Aspergillus fumigatus*-specific T cell responses by inhibiting T helper type 1 CD4 T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 208, 369–381. doi: 10.1084/jem.20100906
- Roeder, A., Kirschning, C. J., Rupec, R. A., Schaller, M., Weindl, G., and Korting, H. C. (2004). Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med. Mycol.* 42, 485–498. doi: 10.1080/13693780400011112
- Saijo, S., and Iwakura, Y. (2011). Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int. Immunol.* 23, 467–472. doi: 10.1093/intimm/dxr046
- Sainz, J., Hassan, L., Perez, E., Romero, A., Moratalla, A., López-Fernández, E., et al. (2007a). Interleukin-10 promoter polymorphism as risk factor to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Immunol. Lett.* 109, 76–82. doi: 10.1016/j.imlet.2007.01.005
- Sainz, J., Lupiañez, C. B., Segura-Catena, J., Vazquez, L., Ríos, R., Oyonarte, S., et al. (2012). Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary *Aspergillus* infection. *PLoS ONE* 7:e32273. doi: 10.1371/journal.pone.0032273
- Sainz, J., Pérez, E., Gómez-Lopera, S., and Jurado, M. (2008a). IL1 gene cluster polymorphisms and its haplotypes may predict the risk to develop invasive pulmonary aspergillosis and modulate C-reactive protein level. *J. Clin. Immunol.* 28, 473–485. doi: 10.1007/s10875-008-9197-0
- Sainz, J., Perez, E., Gomez-Lopera, S., Lopez-Fernandez, E., Moratalla, L., Oyonarte, S., et al. (2008b). Genetic variants of IL6 gene promoter influence on C-reactive protein levels but are not associated with susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis in haematological patients. *Cytokine* 41, 268–278. doi: 10.1016/j.cyto.2007.11.018
- Sainz, J., Pérez, E., Hassan, L., Moratalla, A., Romero, A., Collado, M. D., et al. (2007b). Variable number of tandem repeats of TNF receptor type 2 promoter as genetic biomarker of susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Hum. Immunol.* 68, 41–50. doi: 10.1016/j.humimm.2006.10.011
- Sainz, J., Salas-Alvarado, I., López-Fernández, E., Olmedo, C., Comino, A., García, F., et al. (2010). TNFR1 mRNA expression level and TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 23, 423–436. doi: 10.1177/039463201002300205
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., et al. (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 38, 970–983. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.011
- Serrano-Gómez, D., Dominguez-Soto, A., Ancochea, J., Jimenez-Heffernan, J. A., Leal, J. A., and Corbi, A. L. (2004). Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J. Immunol.* 173, 5635–5643. doi: 10.4049/jimmunol.173.9.5635
- Seufert, B. L., Poole, E. M., Whitton, J., Xiao, L., Makar, K. W., Campbell, P. T., et al. (2013). IkappaBbeta and NFκB1, NSAID use and risk of colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry. *Carcinogenesis* 34, 79–85. doi: 10.1093/carcin/bgs296
- Shahan, T. A., Sorenson, W. G., Paulauskis, J. D., Morey, R., and Lewis, D. M. (1998). Concentration- and time-dependent upregulation and release of the cytokines MIP-2, KC, TNF, and MIP-1alpha in rat alveolar macrophages by fungal spores implicated in airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18, 435–440. doi: 10.1165/ajrcmb.18.3.2856

- Singh, N., Husain, S., and AST Infectious Diseases Community of Practice. (2013). Aspergillosis in solid organ transplantation. *Am. J. Transplant.* 13 (Suppl 4), 228–241. doi: 10.1111/ajt.12115
- Slattery, M. L., Lundgreen, A., Bondurant, K. L., and Wolff, R. K. (2011). Interferon-signaling pathway: associations with colon and rectal cancer risk and subsequent survival. *Carcinogenesis* 32, 1660–1667. doi: 10.1093/carcin/bgr189
- Stappers, M. H., Thys, Y., Oosting, M., Plantinga, T. S., Ioana, M., Reimnitz, P., et al. (2014). Polymorphisms in cytokine genes IL6, TNF, IL10, IL17A and IFNG influence susceptibility to complicated skin and skin structure infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 2267–2274. doi: 10.1007/s10096-014-2201-0
- Steinbach, W. J., Marr, K. A., Anaissie, E. J., Azie, N., Quan, S. P., Meier-Kriesche, H. U., et al. (2012). Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *J. Infect.* 65, 453–464. doi: 10.1016/j.jinf.2012.08.003
- Sun, S. C. (2012). The noncanonical NF-κB pathway. *Immunol. Rev.* 246, 125–140. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x
- Trynka, G., Zhernakova, A., Romanos, J., Franke, L., Hunt, K. A., Turner, G., et al. (2009). Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-κB signalling. *Gut* 58, 1078–1083. doi: 10.1136/gut.2008.169052
- Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-κB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 693–733. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641
- van der Velden, W. J., Blijlevens, N. M., and Donnelly, J. P. (2011). Genetic variants and the risk for invasive mould disease in immunocompromised hematology patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 554–563. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834ab1f4
- Varadé, J., Palomino-Morales, R., Ortego-Centeno, N., Diaz-Rubio, M., Fernandez-Gutierrez, B., Gonzalez-Gay, M. A., et al. (2011). Analysis of the REL polymorphism rs13031237 in autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 711–712. doi: 10.1136/ard.2010.134593
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., and Baldwin, A. S. Jr. (1998). NF-κB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680–1683. doi: 10.1126/science.281.5383.1680
- Wang, S., Yan, Q., Chen, P., Zhao, P., and Gu, A. (2014). Association of interferon regulatory factor 4 gene polymorphisms rs12203592 and rs872071 with skin cancer and haematological malignancies susceptibility: a meta-analysis of 19 case-control studies. *BMC Cancer* 14:410. doi: 10.1186/1471-2407-14-410
- Williams, J. W., Tjota, M. Y., Clay, B. S., Vander Lugt, B., Bandukwala, H. S., Hrusch, C. L., et al. (2013). Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat. Commun.* 4:2990. doi: 10.1038/ncomms3990
- Wójtowicz, A., Gresnigt, M. S., Lecompte, T., Bibert, S., Manuel, O., Joosten, L. A., et al. (2015a). IL1B and DEFB1 polymorphisms increase susceptibility to invasive mold infection after solid-organ transplantation. *J. Infect. Dis.* 211, 1646–1657. doi: 10.1093/infdis/jiu636
- Wójtowicz, A., Lecompte, T. D., Bibert, S., Manuel, O., Rüeger, S., Berger, C., et al. (2015b). PTX3 polymorphisms and invasive mold infections after solid organ transplant. *Clin. Infect. Dis.* 61, 619–622. doi: 10.1093/cid/civ386

Conflict of Interest Statement: Dr. MC has been an advisor/consultant to the Panamerican Health Organization, Astellas Pharma, Gilead Sciences, Merck Sharp & Dohme, Pfizer, and Schering Plough. He has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, Merck Sharp & Dohme, Pfizer, Astellas Pharma, and Schering Plough.

The other authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Lupiañez, Villaescusa, Carvalho, Springer, Lackner, Sánchez-Maldonado, Canet, Cunha, Segura-Catena, Alcazar-Fuoli, Solano, Fianchi, Pagano, Potenza, Aguado, Luppi, Cuenca-Estrella, Lass-Flörl, Einsele, Vázquez, PCRAGA Study Group, Ríos-Tamayo, Loeffler, Jurado and Sainz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Supplementary Table 1. Statistical power calculations for *NFKB*-related polymorphisms.

| Gene | dbSNP rs# | C r. | Location/Aa change | Nucleotide substitution | Effect- allele | MAF | 80% power to detect OR* | 80% power to detect OR [‡] |
|--------------|------------|---------|-----------------------|----------------------------|-------------------|-------|----------------------------|--|
| <i>NFKB1</i> | rs4648110 | 4 | Intronic | A/T | A | 0.197 | 2.10 | 3.95 |
| <i>NFKB2</i> | rs12769316 | 10 | Near gene | A/G | A | 0.159 | 2.15 | 4.90 |
| | rs1056890 | 10 | Near gene | C/T | T | 0.334 | 2.20 | 2.65 |
| | rs11574851 | 10 | N698N | C/T | T | 0.053 | 2.70 | NP |
| <i>REL</i> | rs13031237 | 2 | Intronic | G/T | T | 0.349 | 2.20 | 2.55 |
| | rs842647 | 2 | Intronic | A/G | G | 0.239 | 2.10 | 3.35 |
| | rs13017599 | 2 | Near gene | A/G | A | 0.355 | 2.20 | 2.55 |
| <i>RELA</i> | rs7119750 | 11 | Intronic | C/T | T | 0.123 | 2.20 | 6.65 |
| <i>RELB</i> | rs2288918 | 19 | Intronic | C/T | C | 0.344 | 2.20 | 2.60 |
| <i>IRF4</i> | rs872071 | 6 | 3'-UTR | A/G | G | ND | ND | ND |
| | rs1877175 | 6 | 3'-UTR | A/G | A | 0.200 | 2.10 | 3.90 |
| | rs1050975 | 6 | 3'-UTR | A/G | G | 0.086 | 2.40 | 11.30 |
| | rs7768807 | 6 | 3'-UTR | C/T | C | 0.257 | 2.10 | 3.15 |
| | rs12203592 | 6 | Intronic | C/T | T | 0.135 | 2.20 | 6.00 |

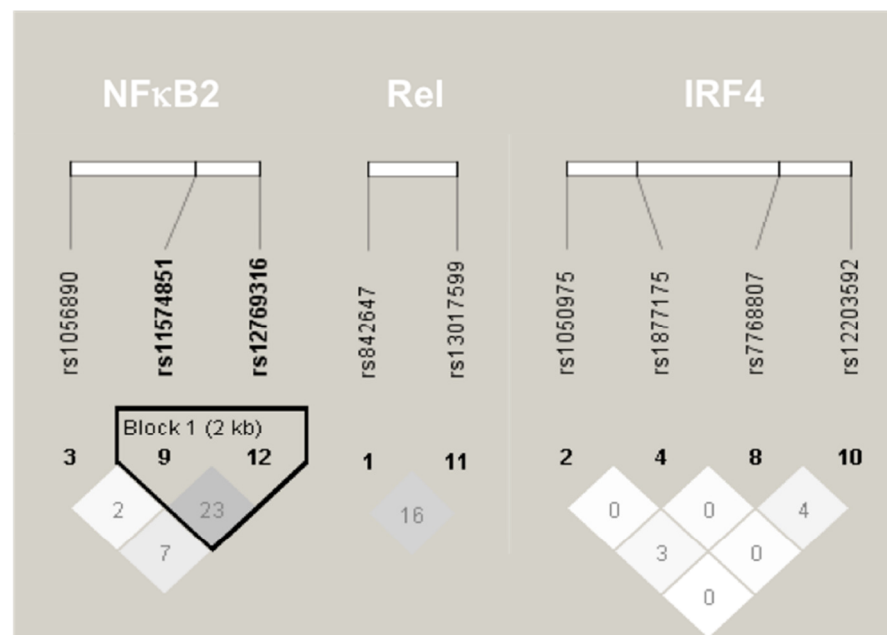
Abbreviations: SNP, Single Nucleotide Polymorphism; MAF, Aa, Aminoacid; ND, not determined; NP, no statistical power.

Assumptions: IA incidence of 3.5% (Morgan *et al.* Med Mycol 2005; 43:S49-S58) and an $\alpha=0.001$ (study-wide significance).

*The statistical power was calculated based on genotype frequencies and assuming a dominant model of inheritance.

*The statistical power was calculated based on genotype frequencies and assuming a recessive model of inheritance.

Supplementary Figure 1. Linkage disequilibrium (LD) blocks in the NFκB-related genes calculated in our population.



Numbers into squares indicate r^2 values.

ARTÍCULO CUARTO (en revisión)

Exploratory high-density genotyping of host immunity genes identifies ARNT2 and CX3CR1 as new susceptibility loci for invasive aspergillosis

Introducción. La Aspergilosis Invasiva (AI) es una infección letal que afecta a un número cada vez mayor de pacientes inmunodeprimidos, tales como los pacientes sometidos a quimioterapia o trasplante de médula y órganos sólidos. Aunque los factores genéticos contribuyen en la susceptibilidad de esta enfermedad, hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio amplio de genes candidatos (GWAS, genome wide association study) para AI

Métodos. Este estudio se realizó en una población de 1.179 sujetos, 423 pacientes hematológicos (66 IA y 357 no IA) y 756 controles procedentes del consorcio aspBIOmics. Evaluamos 124.093 polimorfismos en 186 *loci* del sistema inmune, los cuales pueden influir en el riesgo a desarrollar AI. Y de los resultados obtenidos, los datos potencialmente interesantes fueron confirmados mediante un meta-análisis con una cohorte de 473 pacientes hematológicos (93 AI y 380 no AI).

Resultados. Los resultados del meta-análisis confirmaron que los SNPs ARNT2_{rs1374213} y CX3CR1_{rs9823718} se encontraban fuertemente asociados con un mayor riesgo a desarrollar la infección ($P=9,07 \cdot 10^{-6}$ y $P=1,72 \cdot 10^{-4}$). Curiosamente, también observamos que en macrófagos derivados de monocitos (MDM) de sujetos portadores del genotipo ARNT2_{rs1374213GG} mostraban una actividad fungicida disminuida frente a los portadores del alelo ARNT2_{rs1374213A} (56.6% frente a 47.0%, $P=0,039$) y el lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con AI portadores del genotipo ARNT2_{rs1374213GG} mostraban una menor producción de IL1 β ($P=0,042$) y una mayor liberación de IL8 ($P=0.0061$). Sin embargo, también observamos que bajo condiciones de estimulación con Zymosan durante 24h o 48h, los PBMCs de los individuos portadores del genotipo ARNT2_{rs1374213GG} mostraban una producción significativamente mayor de TNF e IFN en comparación con los sujetos portadores del alelo A ($P_{\text{TNF-LPS}(24\text{h})}=0.017$, $P_{\text{TNF-ZYM}(24\text{h})}=0.068$, $P_{\text{TNF-LPS+ZYM}(24\text{h})}=0.001$ y $P_{\text{IFN-LPS}(48\text{h})}=0.042$, $P_{\text{IFN-ZYM}(48\text{h})}=0.045$, $P_{\text{IFN-LPS+ZYM}(48\text{h})}=0.040$). Por otra parte, aunque no se encontraron diferencias significativas en la capacidad fungicida de macrófagos de acuerdo al genotipo de CX3CR1_{rs9823718}, observamos que las muestras de LBA de pacientes de AI portadores del alelo CX3CR1_{rs9823718A} tenían una cantidad significativamente menor de IL8 y que los MDM de los individuos portadores de este mismo alelo mostraban una disminución significativa en la producción de IL1 β y/o TNF tras el co-cultivo con conidios de aspergillus ($P=0.0012$ y $P=0.0028$, respectivamente). Estos resultados junto con la fuerte correlación encontrada entre el SNP de CX3CR1_{rs9823718} y los niveles de expresión del ARNm en PBMCs ($P=2,46 \cdot 10^{-7}$), sugieren que ARNT2 y CX3CR1 son genes asociados con la susceptibilidad de AI.

Conclusiones. Este estudio identifica por primera vez a ARNT2 y CX3CR1 como genes implicados en la susceptibilidad a desarrollar AI y proporciona información sobre los posibles mecanismos etiopatogénicos de estos genes en la infección.

1
2 **Exploratory high-density genotyping of host immunity**
3 **genes using the ImmunoChip identifies ARTN2 and CX3CR1**
4 **as new susceptibility loci for invasive aspergillosis**
5
6

7 Lupiañez CB^{1,2}, Martínez-Bueno M³, Cunha C^{4,5}, Springer J⁶, Lackner M⁷, Segura-Catena J^{1,2},
8 Ríos R^{1,2}, Alcazar-Fuoli L⁸, Miguel Ángel López-Nevot⁹, Fianchi L¹⁰, Aguado JM¹¹, Pagano L¹⁰,
9 Potenza L¹², Luppi M¹², Solano C¹³, Cuenca-Estrella M⁸, Lass-Flörl C⁷, Einsele H⁶, Vazquez
10 L¹⁴, PCRAGA Study Group¹⁵, Loeffler J⁶, Carvalho A^{4,5}, Jurado M^{1,2}, Sainz J^{1,2}
11
12

13 ¹ Genomic Oncology Area, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / Universi-
14 ty of Granada / Andalusian Regional Government, PTS Granada, Granada, Spain

15 ² Hematology department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

16 ³ Genomic Medicine Area, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / Universi-
17 ty of Granada / Andalusian Regional Government, PTS Granada, Granada, Spain

18 ⁴ Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho,
19 Braga, Portugal

20 ⁵ ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal

21 ⁶ Universitätsklinikum Würzburg, Medizinische Klinik II, Würzburg, Germany

22 ⁷ Division of Hygiene and Medical Microbiology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

23 ⁸ Mycology Reference Laboratory, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ma-
24 drid, Spain

25 ⁹ Immunology department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

26 ¹⁰ Istituto di Ematologia, Università Cattolica del S. Cuore, Rome, Italy.

27 ¹¹ Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario "12 de Octubre", Instituto de Investigación Hospital
28 "12 de Octubre" (i+12), Madrid, Spain

29 ¹² Department of Medical and Surgical Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, AOU Poli-
30 clinico, Modena, Italy

31 ¹³ Hematology department, Clinic University Hospital of Valencia, Valencia, Spain

32 ¹⁴ Hematology department, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

33 ¹⁵ PCRAGA study group
34
35
36
37
38

39 **Running title:** Genotyping using the ImmunoChip identify new susceptibility loci for IA
40
41
42
43

44 **FUNDING**

45 This study was supported by grants PI12/02688 from Fondo de Investigaciones Sanitarias
46 (Madrid, Spain), PIM2010EPA-00756 from the ERA-NET PathoGenoMics (0315900A) and by
47 the Collaborative Research Center / Transregio 124 FungiNet. Cristina Cunha is supported by
48 the Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal (SFRH/BPD/96176/2013). This study was
49 also supported by Astella Pharma Inc. and by a donation of Consuelo González Moreno, an
50 acute myeloid leukemia survivor.
51
52
53
54

55
56 **AUTHOR'S CONTRIBUTIONS**
57 MJ and JS conceived the study and participated in its design and coordination. CBL performed
58 the genetic analyses. CBL, CC, AC and JS performed *in vitro* functional analyses. JSp, ML,
59 JS-C, RR, LA-F, MAL-N, LF, JMA, LP, LPo, MLu, CS, MC-E, CL, HE, JL, LV, AC, JS and the
60 PCRAGA Study Group coordinated patient's recruitment and provided the clinical data. JS and
61 MMB analysed the data. MJ and JS drafted the manuscript. All authors read and approved the
62 final version of the manuscript.

63
64
65 Corresponding author:
66 Juan Sainz, PhD
67 Genomic Oncology department
68 GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of Granada /
69 Andalusian Regional Government
70 PTS Granada
71 Avda. de la Ilustración, 114
72 18016 Granada, Spain
73 Phone: +34-958-715500
74 Fax: +34-958-637071
75 E-mail: juan.sainz@genyo.es

76
77
78 Word Count: Abstract 203, Text 3828, 3 Figures, 2 Tables (+1 supplementary tables)

79 **ABSTRACT**

80 Invasive Aspergillosis (IA) is a lethal infection that affects an increasingly number of subjects
81 undergoing chemotherapy or bone marrow and solid organ transplantation. Although genetic
82 factors contribute to disease susceptibility, up to date, no genome-wide association studies
83 (GWAS) have been conducted for IA. Here, we evaluate whether 124,093 single nucleotide
84 polymorphisms (SNPs) within 186 host immunity loci influence the risk of IA in a population of
85 1179 subjects, 423 haematological patients (66 IA and 357 non-IA) and 756 controls. The meta-
86 analysis of our data for the most promising hits with those from a disease-matched cohort
87 including 473 haematological patients (93 IA and 380 non-IA patients) confirmed that the
88 *ARNT2*_{rs1374213} and *CX3CR1*_{rs9823718} SNPs are strongly associated with an increased risk of
89 developing the infection ($P=9.07\cdot 10^{-6}$ and $1.72\cdot 10^{-4}$). Interestingly, we observed that monocyte-
90 derived macrophages (MDM) from subjects carrying the *ARNT2*_{rs1374213G} allele showed a
91 statistically significant impairment in fungicidal activity (56.6% vs. 47.0%, $P=0.039$) and that
92 carriers of both *ARNT2*_{rs1374213G} and *CX3CR1*_{rs9823718A} alleles showed a pronounced deregulation
93 of innate immune responses mediated by IL-1 β , TNF- α and IL-8. These findings suggest that
94 *ARNT2* and *CX3CR1* are susceptibility loci for IA and provide new insights into the host immune
95 mechanisms involved in protection against fungal pathogens.

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107 **Keywords:** Invasive Aspergillosis, host immunity, immunochip, genetic susceptibility

108 **INTRODUCTION**

109 Invasive Aspergillosis (IA) is a lethal infection in which *Aspergillus* colonizes lung or sinus tissues
110 and spreads through the blood stream to other sites in the body (kidneys, brain, etc.) [1, 2].
111 Despite the effective diagnosis and the frequent use of new generation antifungal drugs, IA is
112 increasing in incidence among immunocompromised [2-5], post-operative [5] and critically ill
113 patients [6-8] and individuals who undergo stem cell or solid organ transplantation [2, 4, 9-11].
114 Following a specific exposure, the risk of developing IA depends on a number of factors such as
115 weakened immune system [2, 4, 9, 10, 12], haematological malignancy [13, 14], long-term
116 corticosteroid and/or immunomodulatory therapies [15, 16], lower respiratory tract and
117 cytomegalovirus infections [11, 17], AIDS [18-20] and lung disorders such as chronic obstructive
118 pulmonary disease [21].

119
120 There is robust evidence that the combination of some of these clinical risk factors and a specific
121 host genetic background may render individuals more vulnerable to IA [22, 23] and increase the
122 risk of infection-related hospitalizations and deaths [24, 25]. During the last two decades,
123 multiple candidate gene association studies have been applied in the search for the genetic
124 component of AI. These studies have pointed out to the role of single nucleotide polymorphisms
125 (SNPs) within *DC-SIGN*, *Dectin-1*, *CXCL10*, *DEFB1*, *IL1 gene cluster*, *IL10*, *IL12*, *IFNG*, *MBL*,
126 *PTX3*, *S100B*, *TLRs* and *TNFRs* genes in determining the risk of developing the infection [26-
127 44]. However, despite the important contribution of these population-based genetic studies to the
128 knowledge of fungal biology, the degree of replication between studies has been relatively poor
129 (*TLR4*, *Dectin-1*, *MBL*, *PTX3*, and *IL10*) [26, 27, 29, 35, 36, 44-47] limiting the clinical utility of
130 genetic markers to design more personalized and risk-adapted prophylaxis strategies and
131 therapeutic interventions.

132
133 Genome-wide association studies (GWAS) have evolved over the last decades into a powerful
134 tool for the identification of susceptibility markers for many complex diseases [48] including
135 infections [49, 50]. However, in spite of the proven success of this technology, there is still lack of

136 genetic studies using genome-wide approaches for the identification of loci associated with IA
137 risk. Taking this under consideration, the main objective of this study was to comprehensively
138 evaluate whether dense genotyping of 186 immune-related genes using the ImmunoChip® array
139 could help us to identify novel susceptibility loci for IA. The use of the ImmunoChip® array has
140 been recently shown to be a successful approach for the identification and replication of
141 susceptibility loci for complex diseases including autoimmune diseases [51-53], immune-
142 mediated syndromes [54], human longevity [55] and haematological malignancies [56] but also
143 opportunistic fungal infections [57]. We also conducted functional assays to determine the effect
144 of the most interesting markers on the immune response to *Aspergillus fumigatus* (AF).

145

146 **MATERIAL AND METHODS**

147 *Study design and discovery populations*

148 The study population consisted in 1251 European subjects organized in three collections: 77
149 haematological patients diagnosed with proven or probable IA according to the revised
150 EORTC/MSG criteria [58], 387 haematological patients with no sign of infection and 787 healthy
151 controls. Haematological patients were allo-transplanted or diagnosed with acute myeloid
152 leukaemia (AML) or acute lymphoid leukaemia (ALL) receiving intensive remission-induction
153 chemotherapy and were recruited through the aspBIOmics consortium (www.aspbiomics.eu) and
154 from two Spanish medical institutions (University Hospital of Salamanca and Clinic University
155 Hospital of Valencia), and a Spanish multicentre clinical trial (PCRAGA, EU clinical trial number:
156 2010-019406-17). All participants signed a written informed consent before their inclusion in the
157 study. In accordance with the Declaration of Helsinki, all participants provided their informed
158 consent to participate in the study and the ethical committees of all participating centres and
159 hospitals approved the study: Virgen de las Nieves University Hospital (Granada, Spain);
160 University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain); University Hospital 12 de Octubre
161 (Madrid, Spain); Clinic University Hospital of Valencia (Valencia, Spain); Centro Nacional de
162 Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Madrid, Spain); University of Minho (Braga,
163 Portugal); University of Würzburg (Würzburg, Germany); and Medical University of Innsbruck

164 (Innsbruck, Austria). The PCRAGA trial is registered with ClinicalTrials.gov (NCT01742026) and
165 EudraCT (2010-019406-17).

166

167 *Genotyping, quality control and filtering*

168 Genomic DNA from haematological patients at high risk of IA and healthy controls were
169 genotyped using the Immunochip®, a custom SNP genotyping array from Illumina that includes
170 196.524 variants and provides a high-density mapping of 186 immune-related genes. Genotypes
171 were called using the GenomeStudio Data Analysis software and according to the NCBI build 36
172 (hg18) mapping. In order to obtain a quality-controlled working dataset satisfying the current
173 state-of-the-art criteria for association studies, data filtering was conducted using PLINK v.107
174 [59] according to the following criteria: 1) minimum call rate per sample of 90% (9 IA and 30 non-
175 IA cases and 5 healthy controls were removed from the analysis); 2) minimum call rate per
176 marker of 98%; 3) minor allele frequency (MAF) threshold of 0.01; 4) Hardy-Weinberg
177 equilibrium (HWE) P value <0.0001 for cases and 0.01 for controls.

178

179 *Replication population*

180 For validation purposes, 473 haematological patients, including 93 proven or probable IA cases
181 were recruited from a Spanish institution (Virgen de las Nieves University hospital) and two
182 Italian medical institutions (Università Cattolica del S. Cuore, Rome; and University of Modena
183 and Reggio Emilia, AOU Policlinico, Modena) as described elsewhere [60]. Ethical approval was
184 also provided by the Ethical review board of Università Cattolica del S. Cuore (Rome, Italy) and
185 University of Modena and Reggio Emilia (Modena, Italy). In order to select the best hits for
186 replication, we calculated a SNP-score for each marker using the following criteria: 1)
187 association with IA risk in the IA vs. non-IA analysis (considering inverse logarithmic p-values); 2)
188 association with IA risk in the AI vs. controls analysis; and 3) potential functionality according to
189 publicly available databases (Regulome and Haploreg). The replication phase was performed
190 using KASP® probes in 384-well plates and Eppendorf Martercycler® Pro PCR machines
191 (Eppendorf, Hamburg, Germany) according to manufacturer's instructions. For internal quality

192 control, approximately 5% of samples were randomly selected and included as duplicates. The
193 genotyping concordance was greater than 99%. Call rates for all SNPs replicated were $\geq 90.0\%$.

194

195 *Association analysis*

196 Markers in linkage equilibrium ($r^2 < 0.2$) with maximum differences in allele frequencies between
197 the HapMap subpopulations CEU, CHB, and YRB were selected for analysis. A first principal
198 component analysis (without sigma threshold) showed that, with the exception of 4 controls that
199 were eliminated, all samples were indeed of European descent. Next, the principal component
200 analysis using the 28,944 independent markers ($r^2 < 0.2$) was performed with smartpca,
201 EIGENSOFT 4.0 beta package 2 [61]. A set of 25 samples (1 IA case and 24 healthy controls)
202 were detected as outliers using a sigma threshold=6.0 and were consequently removed from the
203 analysis. Association analysis was carried out by logistic regression corrected for stratification
204 with the first 2 principal components. Duplicated samples or first-degree relatives were removed
205 from the analysis selecting randomly one sample from each pair, using PLINK v.1.07, $P_i\text{-hat} > 0.4$
206 (3 samples were removed; 1 IA case and 2 healthy controls).

207

208 *Association analysis of the discovery population*

209 The final data set contained 124,093 markers from 1179 individuals, 66 cases of IA, 357
210 aspergillus-free cases and 756 healthy controls. Allelic associations for each marker were tested
211 using an additive logistic regression model, testing for the minor allele as reference and
212 correcting for stratification with the first 2 principal components. Two case-control association
213 analyses were carried out: 1) IA cases vs. non-IA cases and 2) IA cases vs. healthy controls.

214

215 *Meta-analysis*

216 The meta-analysis combining genetic data of the ImmunoChip analysis with those obtained in the
217 replication population was performed following an additive model of inheritance. The I^2 statistic
218 was used to assess heterogeneity between the discovery and replication populations and the
219 pooled OR was computed using the random-effect model since the populations included were

220 based on samples from heterogeneous populations. All statistics were calculated using STATA
221 (v.12) for MAC.

222

223 *Cell isolation and differentiation*

224 Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and monocytes were isolated from whole blood
225 collected from healthy donors after obtaining written informed consent (PI12/02688 and SECVS
226 014/2015 protocols). PBMCs were isolated by gradient centrifugation using Ficoll-Paque PLUS
227 (GE Healthcare Bio-Sciences) and monocytes were isolated by immunomagnetic selection of
228 CD₁₄⁺ cells (Miltenyi Biotec). Purity of the obtained CD₁₄⁺ population was assessed by
229 fluorescence-activated cell sorting analysis. Monocytes were then plated at a density of 5×10⁵
230 cells/mL in 24-well plates, cultivated for 7 days in complete RPMI 1640 medium supplemented
231 with human serum and 20 ng/mL of GM-CSF to allow differentiation into macrophages. The
232 culture medium was replaced every 3 days. Genotyping of significant SNPs was performed and
233 either PBMCs or monocytes were grouped according to the genotype of interest.

234

235 *Assessment of fungicidal activity*

236 Human monocyte-derived macrophages (MDM) from 35 healthy subjects were infected with
237 conidia from *AF* at an effector-to-target ratio of 1:10. To measure the fungicidal ability,
238 macrophages were allowed to kill the ingested conidia for 2 h. Serial dilutions of macrophage
239 lysates were plated on solid growth media and following a 2-day incubation, the number of
240 colony-forming units (CFU) was enumerated and the percentage of CFU inhibition was
241 calculated. In order to avoid a bias due to differences in internalization rates, the supernatants
242 collected after the co-culture were plated and compared among different donors.

243

244 *In vitro PBMCs stimulation assays*

245 Stimulation assays were performed in PBMCs from healthy donors selected according to the
246 *ARNT2*_{rs1374213}, *CX3CR1*_{rs9823718}, and *CX3CR1*_{rs7631529} genotypes and were cultured in 2 ml of
247 culture medium RPMI-1640 supplemented with 10% sterile heat-inactivated fetal bovine serum

248 (FBS) and an antibiotic mixture containing penicillin, streptomycin and neomycin (Gibco®/Life
249 Technologies) at 37°C in 5% CO₂. PBMCs from healthy subjects (n=24) harbouring each specific
250 genotype were incubated for zymosan (5µg/ml) alone or in combination with lipopolysaccharide
251 (LPS, 100ng/ml) and IFN γ , IL12p70, TNF, IL6, IL8 and IL10 levels were determined in triplicate
252 using the Procartaplex, Multiplex Immunoassay (Affymetrix/eBioscience) according to
253 manufacturer's recommendations. After the incubation period, supernatants were collected and
254 stored at -80°C until cytokine measurement.

255

256 *Bronchoalveolar lavage (BAL) specimen collection*

257 Bronchoalveolar lavage (BAL) sample from 28 IA patients were collected using standard
258 techniques when infection was clinically suspected. BALs were obtained by instillation of 2x20
259 mL of 0.9% sterile saline solution to the most peripheral bronchus of the most radiologically
260 involved lobe. BAL samples with comparable recovery rates and from patients that were not
261 long-term smokers, without any other relevant lung-associated diseases and undergoing similar
262 drug regimens were used, according to the standardization rules of the European Respiratory
263 Society to measure acellular components. After careful aspiration, BALs were centrifuged at
264 3,000 rpm for 5 min at 4°C to remove cell debris. All samples were stored at -80°C until use.

265

266 *Statistical analysis for functional analysis*

267 Cytokine levels in BAL samples or cell culture supernatants are reported as the mean \pm standard
268 error. Statistical significance was evaluated using an unpaired t-test with or without Welch's
269 correction (two-tailed P value; depending on the differences in the variance between groups) or
270 Mann-Whitney-U test. A P value \leq 0.05 was considered statistically significant. All analyses were
271 performed using Prim software (Graph Pad Software, San diego, CA).

272

273 *eQTL analysis*

274 Haploreg (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) and ENCODE
275 annotation data (<https://genome.ucsc.edu/ENCODE/>) were also used to predict the functional

276 role of potentially interesting SNPs. We also evaluated whether the SNPs associated with IA risk
277 in the meta-analysis correlated with mRNA expression levels in a public eQTL browser for
278 peripheral blood mononuclear cells (<http://genenetwork.nl/blooddeqtlbrowser/>).

279

280 **RESULTS**

281 *Characteristics of study subjects*

282 This study included 2 stages as shown in Figure 1. The study population consisted of 1179
283 subjects organized in three collections: 66 cases of proven or probable IA, 357 disease-matched
284 individuals with no sign of infection and 756 Caucasian healthy controls of European ancestry.
285 Demographic and clinical characteristics of the patients included in the discovery and replication
286 populations are summarized in Table 1. Demographic characteristics of the control population
287 has been reported elsewhere [62]. As expected, IA and non-IA patients had a very similar age
288 and underlying disease distribution in both discovery and replication cohorts. In addition, both
289 populations showed a similar proportion of patients who underwent allo-SCT and that completed
290 anti-fungal prophylaxis (Table 1). Of note, overall IA was most frequently found in men than in
291 women (2.06 vs. 1.19, $P=0.003$) and among those patients diagnosed with ALL (21.38% vs.
292 13.30%, $P=0.013$; Table 1).

293

294 *Association analysis identifies 12 susceptibility regions for IA*

295 Given the limited statistical power to detect associations at genome-wide level ($p<5.0\cdot 10^{-8}$)
296 when we compared IA and non-IA cohorts, we decided to perform 2 association analyses. First,
297 we compared the cohort of IA cases with a reference set of 756 healthy controls (Stage 1) and,
298 subsequently, we conducted an association analysis comparing 66 IA cases and 357 non-IA
299 cases (Stage 2). This heuristic approach relies on the assumption that SNPs implicated in
300 determining the risk of IA should be enriched in cases of IA when compared with non-infected
301 cases but also with healthy subjects selected from the general population. The most “promising
302 markers” (i.e., those with the lowest P-value in stage 1 and 2 and with a potential function
303 according to publicly available databases) were advanced for replication in an independent

304 population of 473 disease-matched patients (93 IA and 380 non-IA cases).
305
306 After filtering the ImmunoChip data using a standard quality strategy, 124,093 SNPs were
307 available for logistic regression analysis and 96.24% of samples passed quality control criteria.
308 Given the exploratory nature of this study, we could not expect to find SNPs that reached a
309 genome-wide significant association with IA risk neither in Stage 1 nor 2 ($p < 10^{-8}$; Table 2 and
310 Supplementary Table 1). However, we could identify 12 genetic regions encompassing host
311 immunity genes strongly associated with IA risk (Table 2). These regions included several loci
312 with relevant functions in the modulation of cell-mediated immunity (*ARNT2*, *CX3CR1*, *IL2/IL21*,
313 *IL18RAP*, *NOS2A*, *PSMB7*, *SERPINA9* and *TNFSF15*). The association analysis also identified
314 several markers associated with IA risk located within or near loci with unknown function
315 (*HIBCH*, *PSORS1C2*, *RAD51L1* and *TMEM171/TMEM174*). The most significant association
316 with the risk of IA in the discovery analysis was found for markers located within or near the
317 *IL18RAP*, *PSORS1C2*, *TNFSF15*, *TMEM171* and *SERPINA9* genes. According to a log-additive
318 model, each copy of the minor allele for the *IL18RAP*_{rs116260662}, *PSORS1C2*_{rs2233950},
319 *TNFSF15*_{rs10817670}, *TMEM171*_{rs79682341} and *SERPINA9*_{rs7149309} SNPs was associated with a 2- to 6-
320 fold increased risk of developing IA (OR=6.04, 95%CI 2.50-14.58; OR=5.00, 95%CI 2.29-10.97;
321 OR=2.54, 95%CI 1.65-3.91; OR=4.37, 95%CI 2.11-9.02; and OR=4.37, 95%CI 2.11-9.02). In
322 addition, although suggestive at this point, we found several potentially interesting and
323 biologically plausible associations with IA risk for SNPs within or near *ARTN2*, *IL2/IL21*, *NOSA*
324 and *CX3CR1* genes. Each copy of the *ARNT2*_{rs1374213G}, *NOS2A*_{rs2297516C} and *CX3CR1*_{rs9823718C}
325 alleles was associated with a 1.9 to 2.3-fold increased the risk of IA (OR=1.92, 95%CI 1.32-2.78;
326 OR=1.96, 95%CI 1.33-2.91; and OR=2.33, 95%CI 1.46-3.74; Table 2) whereas each copy of the
327 *IL2/IL21*_{rs67143487} allele was associated with a decreased risk of developing the infection
328 (OR=0.43, 95%CI 0.26-0.70). The genomic inflation factor λ estimated in both stage 1 and stage
329 2 was lower than 1.1, which demonstrated that there was no population stratification and that the
330 association of the above mentioned SNPs with IA likely represent true associations
331 (Supplementary Figure 1).

332 *Replication of susceptibility markers within ARNT2 and CX3CR1 genes*

333 To enhance the reliability of these preliminary findings, we attempted to replicate the association
334 of the SNPs included in these 12 genomic regions in an independent population including 473
335 additional haematological patients at high risk of infection (93 IA and 380 non-IA patients).
336 Importantly, we observed that carriers of the *ARNT2*_{rs1374213G} and *CX3CR1*_{rs9823718C} alleles had an
337 increased risk of developing IA when compared with those carrying the most common genotype.
338 The direction of the effect for these SNPs was similar in stage 1 and 2 and the combined
339 analysis including the discovery and replication populations confirmed that each copy of the
340 minor allele for the *ARNT2* and *CX3CR1* SNPs was associated with almost 2-fold increased risk
341 of developing the infection (OR=1.74, 95%CI 1.36-2.23, $P_{\text{Meta}}=9.07 \cdot 10^{-6}$ and OR=1.96, 95%CI
342 1.38-2.79, $P_{\text{Meta}}=1.72 \cdot 10^{-4}$; Table 2). The combined analysis also revealed a weak but potentially
343 interesting association for 2 SNPs within or near *IL18RAP* and *PSMB7* loci (OR=3.64, 95%CI
344 1.30-10.2, $P_{\text{Meta}}=0.014$ and OR=0.60, 95%CI 0.36-0.99, $P_{\text{Meta}}=1.72 \cdot 10^{-4}$; Table 2). None of these
345 genetic markers showed a statistically significant heterogeneity in the meta-analysis confirming
346 the feasibility of the combined analysis. Although the association of *ARNT2* and *CX3CR1* loci
347 was convincing, the associations found for SNPs within the *IL18RAP* and *PSMB7* loci need to be
348 further investigated and validated.

349

350 *Functional evidences of the impact of ARNT2 and CX3CR1 SNPs on the immune response*

351 Considering the novelty and potential interest of the above reported results, we decided to
352 evaluate whether the *ARNT2*_{rs1374213} and *CX3CR1*_{rs9823718} variants could have a functional effect
353 in modulating the strength of immune responses against *AF* conidia or fungal antigens. We first
354 investigated whether MDM from carriers of *ARNT2*_{rs1374213G} and *CX3CR1*_{rs9823718C} alleles
355 influenced on the capacity to kill *AF* conidia. Interestingly, we observed that MDM from subjects
356 carrying the *ARNT2*_{rs1374213GG} genotype showed an impaired capacity to kill *AF* conidia when
357 compared with carriers of the A allele (56.6% vs. 47.0%, $P=0.039$) or the AA genotype (57.9%
358 vs. 43.6%, $P=0.040$; Figure 2A). In support of the role of *ARNT2* in modulating the immune
359 response against *AF*, we also observed that BAL samples from IA patients carrying the

360 *ARNT2*_{rs1374213GG} genotype had significantly decreased release of IL1 β and an exacerbated
361 production of IL8 in comparison with those carrying the A allele ($P=0.042$ and $P=0.0061$,
362 respectively; Figure 2B and 2C). However, intriguingly, we also observed that, after zymosan
363 stimulation for 24h or 48h, PBMCs from carriers of the *ARNT2*_{rs1374213GG} genotype showed a
364 significantly increased production of TNF α and IFN α compared with those subjects carrying the
365 A allele ($P_{\text{TNF-LPS}(24\text{h})}=0.017$, $P_{\text{TNF-ZYM}(24\text{h})}=0.068$ $P_{\text{TNF-LPS+ZYM}(24\text{h})}=0.001$ and $P_{\text{IFN-LPS}(48\text{h})}=0.042$, $P_{\text{IFN-}}$
366 $\text{ZYM}(48\text{h})=0.045$, $P_{\text{IFN-LPS+ZYM}(48\text{h})}=0.040$; Figure 2D and 2E). On the other hand, although we could
367 not detect differences in the capacity to kill *AF* conidia among carriers of the *CX3CR1*_{rs9823718}
368 genotypes, we observed that BAL samples from IA patients carrying the *CX3CR1*_{rs9823718A} allele
369 had significantly decreased release of IL8 ($P=0.019$; Figure 3A) whereas MDM from individuals
370 carrying this allele also showed a significantly decreased production of IL1 α and/or TNF α after
371 co-incubation for 24h with *AF* conidia ($P_{\text{IL1}}=0.0012$ and $P_{\text{TNF}}=0.0028$; Figure 3B and 3C). No
372 significant differences in cytokine production according to the *CX3CR1*_{rs9823718} genotypes were
373 observed in PBMCs from healthy subjects after stimulation with zymosan for 24h or 48h (data
374 not shown). Finally, functional data also revealed that the *CX3CR1*_{rs9823718} SNP (along with other
375 *CX3CR1* SNPs in strong LD) correlates strongly with eQTL data on primary monocytes, NK,
376 neutrophils and B cells from peripheral blood (ranging from $P=2.46\cdot 10^{-7}$ to $P=4.31\cdot 10^{-7}$) and that
377 it maps among histone marks in primary T CD8⁺, B cells, NK and neutrophils.

378

379 **DISCUSSION**

380 To our knowledge this is the first genome-wide association study for IA and despite the relatively
381 modest sample size of the discovery and replication populations, our results show a convincing
382 association of 2 genomic regions encompassing the *ARNT2* and *CX3CR1* genes with the risk of
383 developing the infection. The strongest effect on the risk of IA was observed for the SNP in the
384 *ARTN2* gene that is located on the long arm of the chromosome 15 (15q25.1) and encodes for a
385 member of the basic-helix-loop-Per-Arnt-Sim (bHLH-PAS) superfamily of transcription factors
386 that forms heterodimers with, among others, the aryl hydrocarbon receptor (AHR) [63], a key
387 regulator of the innate and adaptive immunity that has been implicated in the transcriptional

388 regulation of a wide-range of immune-modulating genes including several cytokines (TNF α ,
389 IL1 β , IL2, TGF α , and TGF β) [64, 65]. There has been reported that the ARH/ARNT2 complex
390 influences the activity and differentiation of phagocytic cells and lymphocytes and the shift of the
391 Th1/Th2 balance towards Th1 [66-71]. Early studies have also reported that this protein complex
392 also modulates the cell cycle [72] and the response to chemical compounds [73]. Although the
393 specific role of *ARNT2* in the modulation of antifungal effector function of innate cells remains
394 elusive, a recent study has demonstrated that *ARNT2* is a late phase TNF response gene that is
395 induced by IL10 [74] and that, therefore, might play a role the modulation of disease tolerance
396 defence pathway and host fitness [75]. Although several genetic studies have reported that the
397 presence of polymorphisms within or near *ARNT2* are involved in the pathogenesis of
398 neurological diseases [76], little is known about the relationship between polymorphisms in
399 *ARNT2* and immune-related diseases. In support of the hypothesis suggesting a role of *ARNT2*
400 SNPs in the control of host innate immunity against *Aspergillus*, we observed that the MDM from
401 carriers of the *ARNT2*_{rs1374213GG} genotype showed an impaired capability to kill *Aspergillus*
402 conidia that was likely due, at least in part, to an impaired macrophage-mediated production of
403 the inflammasome-dependent cytokine IL-1 β that undoubtedly leads to a reduced antifungal
404 activity of phagocytes [77, 78]. In this regards, we also observed that MDM from carriers of the
405 *ARNT2*_{rs1374213GG} genotype showed an exacerbated release of IL-8 that might also promote
406 infection by inducing the recruitment of neutrophils to the site of infection and, consequently, the
407 release of TNF α and IFN α that, if prolonged, may cause severe inflammation of the lung tissue
408 and defective fungal clearance. In line with these results we observed that PBMCs from subjects
409 carrying the *ARNT2*_{rs1374213G} allele showed a sustained and significantly increased production of
410 TNF α and IFN γ after stimulation with fungal antigens. These findings along with those from
411 previous studies suggesting that IL-8, besides its chemoattracting activity towards neutrophils
412 and lymphocytes, may also induce the synthesis of metalloproteinase-9 [79], suggest that
413 *ARNT2* might increase susceptibility to IA by depleting the anti-fungal activity of innate immune
414 cells and promoting a sustained adaptive pro-inflammatory response that lead to lung tissue
415 damage and defective fungal clearance.

416 On the other hand, it is well established that CX3CR1 is essential to confer resistance to fungal
417 infections [80]. The CX3CR1 gene is located on the short arm of the chromosome 3 (3p22.2)
418 and encodes the fractalkine receptor, a transmembrane protein and chemokine involved in the
419 adhesion, migration and extravasation of human leukocytes [81, 82] but also in the pathogenesis
420 of several immune-related diseases (such as glomerulonephritis, rheumatoid arthritis and
421 atherosclerosis) and viral, bacterial and fungal infections [83, 84]. Lionakis and co-workers
422 reported that CX3CR1 is mainly expressed in cytotoxic effector lymphocytes (including natural
423 killer cells and cytotoxic T lymphocytes), monocytes, macrophages and specific subsets of
424 dendritic cells and that these cell types interact with fungal pathogens in a CX3CR1-dependent
425 manner [80]. In line with this hypothesis, we observed that the presence of the *CX3CR1*_{rs9823718C}
426 allele, which is strongly associated with an increased expression of the CX3CR1 protein in
427 cytotoxic effector lymphocytes and phagocytes [85, 86], rendered haematological patients more
428 susceptible to the infection likely due to defects in IL8-mediated innate immune responses.
429 These findings, along with those reporting that this chemokine receptor is responsible for
430 promoting macrophage proliferation and survival [80], suggest that, besides its chemotactic
431 function, CX3CR1 is involved in determining macrophage function, cell adhesion, regulation of
432 cytokine production and cell-mediated immune responses against invasive fungal pathogens.
433 This hypothesis was confirmed by a significant reduction in the release of IL1 β and TNF α of
434 MDM from patients carrying the *CX3CR1*_{rs9823718C} allele after co-incubation with *Aspergillus*
435 conidia. These results are in agreement with those previously reported in animal studies and that
436 suggest that CX3CR1 is critical for the recognition and clearance of fungal pathogens [80].

437

438 In conclusion, this study identifies for the first time *ARNT2* and *CX3CR1* as new susceptibility loci
439 for IA and provides new insights about the possible role of these loci to modulate innate and
440 adaptive immune responses against *AF*. Elucidating the mechanisms by which *ARNT2* and
441 *CX3CR1* regulated immune responses against fungal pathogens will provide new clues to
442 design new prophylactic and therapeutic strategies.

443

444 **ACKNOWLEDGMENTS**

445 We thank Dr. Antonio Fernández-Montoya (Centro Regional de Transfuciones Sanguíneas
446 Granada-Almería, Spain) and Dr. António Marques (Hospital de Braga, Portugal) who provided
447 the buffy coats. We also thank Astella Pharma Inc. and Mrs. Consuelo González Moreno (AML
448 survivor) for supporting this work.

449

450 **REFERENCES**

- 451 1. Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest*
452 **2002**; 121(6): 1988-99.
- 453 2. Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, et al. Clinical epidemiology of 960 patients with
454 invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *J Infect* **2012**; 65(5): 453-64.
- 455 3. Neofytos D, Lu K, Hatfield-Seung A, et al. Epidemiology, outcomes, and risk factors of
456 invasive fungal infections in adult patients with acute myelogenous leukemia after
457 induction chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2013**; 75(2): 144-9.
- 458 4. Neofytos D, Treadway S, Ostrander D, et al. Epidemiology, outcomes, and mortality
459 predictors of invasive mold infections among transplant recipients: a 10-year, single-
460 center experience. *Transpl Infect Dis* **2013**.
- 461 5. Baddley JW. Clinical risk factors for invasive aspergillosis. *Med Mycol* **2011**; 49 Suppl 1:
462 S7-S12.
- 463 6. Taccone FS, Van den Abeele AM, Bulpa P, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in
464 critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit Care*
465 **2015**; 19: 7.
- 466 7. Meersseman W, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the ICU: an emerging
467 disease. *Intensive Care Med* **2007**; 33(10): 1679-81.
- 468 8. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the
469 intensive care unit. *Clin Infect Dis* **2007**; 45(2): 205-16.
- 470 9. Singh N, Husain S, Practice ASTIDCo. Aspergillosis in solid organ transplantation. *Am J*
471 *Transplant* **2013**; 13 Suppl 4: 228-41.

- 472 10. Gavalda J, Len O, San Juan R, et al. Risk factors for invasive aspergillosis in solid-organ
473 transplant recipients: a case-control study. *Clin Infect Dis* **2005**; 41(1): 52-9.
- 474 11. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic
475 stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* **2002**;
476 100(13): 4358-66.
- 477 12. Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S, Strom BL, Lusk EJ, Cassileth PA. Prolonged
478 granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients
479 with acute leukemia. *Ann Intern Med* **1984**; 100(3): 345-51.
- 480 13. Yeghen T, Kibbler CC, Prentice HG, et al. Management of invasive pulmonary
481 aspergillosis in hematology patients: a review of 87 consecutive cases at a single
482 institution. *Clin Infect Dis* **2000**; 31(4): 859-68.
- 483 14. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, et al. Invasive fungal infections in patients with
484 hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-
485 year period (1989-2003). *Haematologica* **2006**; 91(7): 986-9.
- 486 15. Palmer LB, Greenberg HE, Schiff MJ. Corticosteroid treatment as a risk factor for
487 invasive aspergillosis in patients with lung disease. *Thorax* **1991**; 46(1): 15-20.
- 488 16. Warris A, Bjorneklett A, Gaustad P. Invasive pulmonary aspergillosis associated with
489 infliximab therapy. *N Engl J Med* **2001**; 344(14): 1099-100.
- 490 17. Martino R, Pinana JL, Parody R, et al. Lower respiratory tract respiratory virus infections
491 increase the risk of invasive aspergillosis after a reduced-intensity allogeneic
492 hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* **2009**; 44(11): 749-56.
- 493 18. Holding KJ, Dworkin MS, Wan PC, et al. Aspergillosis among people infected with human
494 immunodeficiency virus: incidence and survival. Adult and Adolescent Spectrum of HIV
495 Disease Project. *Clin Infect Dis* **2000**; 31(5): 1253-7.
- 496 19. Denning DW, Follansbee SE, Scolaro M, Norris S, Edelstein H, Stevens DA. Pulmonary
497 aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **1991**; 324(10):
498 654-62.
- 499 20. Mylonakis E, Barlam TF, Flanigan T, Rich JD. Pulmonary aspergillosis and invasive

disease in AIDS: review of 342 cases. *Chest* **1998**; 114(1): 251-62.

501 21. Tutar N, Metan G, Koc AN, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic
502 obstructive pulmonary disease. *Multidiscip Respir Med* **2013**; 8(1): 59.

503 22. Cunha C, Aversa F, Romani L, Carvalho A. Human genetic susceptibility to invasive
504 aspergillosis. *PLoS Pathog* **2013**; 9(8): e1003434.

505 23. Maskarinec SA, Johnson MD, Perfect JR. Genetic Susceptibility to Fungal Infections:
506 What is in the Genes? *Curr Clin Microbiol Rep* **2016**; 3(2): 81-91.

507 24. Menzin J, Meyers JL, Friedman M, et al. The economic costs to United States hospitals
508 of invasive fungal infections in transplant patients. *Am J Infect Control* **2011**; 39(4): e15-
509 20.

510 25. Baddley JW, Andes DR, Marr KA, et al. Factors associated with mortality in transplant
511 patients with invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* **2010**; 50(12): 1559-67.

512 26. Bochud PY, Chien JW, Marr KA, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and
513 aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* **2008**; 359(17): 1766-77.

514 27. Chai LY, de Boer MG, van der Velden WJ, et al. The Y238X stop codon polymorphism in
515 the human beta-glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *J*
516 *Infect Dis* **2011**; 203(5): 736-43.

517 28. Cunha C, Aversa F, Lacerda JF, et al. Genetic PTX3 deficiency and aspergillosis in stem-
518 cell transplantation. *N Engl J Med* **2014**; 370(5): 421-32.

519 29. Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, et al. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with
520 susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through
521 impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity.
522 *Blood* **2010**; 116(24): 5394-402.

523 30. Cunha C, Giovannini G, Pierini A, et al. Genetically-determined hyperfunction of the
524 S100B/RAGE axis is a risk factor for aspergillosis in stem cell transplant recipients. *PLoS*
525 *One* **2011**; 6(11): e27962.

526 31. Grube M, Loeffler J, Mezger M, et al. TLR5 stop codon polymorphism is associated with
527 invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Med Mycol* **2013**.

- 528 32. Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, et al. TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated
529 with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann*
530 *N Y Acad Sci* **2005**; 1062: 95-103.
- 531 33. Mezger M, Steffens M, Beyer M, et al. Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif)
532 ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell
533 transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells.
534 *Blood* **2008**; 111(2): 534-6.
- 535 34. Ramaprakash H, Ito T, Standiford TJ, Kunkel SL, Hogaboam CM. Toll-like receptor 9
536 modulates immune responses to *Aspergillus fumigatus* conidia in immunodeficient and
537 allergic mice. *Infect Immun* **2009**; 77(1): 108-19.
- 538 35. Sainz J, Hassan L, Perez E, et al. Interleukin-10 promoter polymorphism as risk factor to
539 develop invasive pulmonary aspergillosis. *Immunol Lett* **2007**; 109(1): 76-82.
- 540 36. Sainz J, Lupianez CB, Segura-Catena J, et al. Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms
541 associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection. *PLoS One* **2012**; 7(2):
542 e32273.
- 543 37. Sainz J, Perez E, Gomez-Lopera S, Jurado M. IL1 gene cluster polymorphisms and its
544 haplotypes may predict the risk to develop invasive pulmonary aspergillosis and
545 modulate C-reactive protein level. *J Clin Immunol* **2008**; 28(5): 473-85.
- 546 38. Sainz J, Perez E, Gomez-Lopera S, et al. Genetic variants of IL6 gene promoter
547 influence on C-reactive protein levels but are not associated with susceptibility to
548 invasive pulmonary aspergillosis in haematological patients. *Cytokine* **2008**; 41(3): 268-
549 78.
- 550 39. Sainz J, Perez E, Hassan L, et al. Variable number of tandem repeats of TNF receptor
551 type 2 promoter as genetic biomarker of susceptibility to develop invasive pulmonary
552 aspergillosis. *Hum Immunol* **2007**; 68(1): 41-50.
- 553 40. Sainz J, Salas-Alvarado I, Lopez-Fernandez E, et al. TNFR1 mRNA expression level and
554 TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive
555 pulmonary aspergillosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* **2010**; 23(2): 423-36.

- 556 41. Stappers MH, Thys Y, Oosting M, et al. Polymorphisms in cytokine genes IL6, TNF, IL10,
557 IL17A and IFNG influence susceptibility to complicated skin and skin structure infections.
558 Eur J Clin Microbiol Infect Dis **2014**; 33(12): 2267-74.
- 559 42. Wojtowicz A, Gresnigt MS, Lecompte T, et al. IL1B and DEFB1 Polymorphisms Increase
560 Susceptibility to Invasive Mold Infection After Solid-Organ Transplantation. J Infect Dis
561 **2015**; 211(10): 1646-57.
- 562 43. Wojtowicz A, Lecompte TD, Bibert S, et al. PTX3 Polymorphisms and Invasive Mold
563 Infections After Solid Organ Transplant. Clin Infect Dis **2015**.
- 564 44. Seo KW, Kim DH, Sohn SK, et al. Protective role of interleukin-10 promoter gene
565 polymorphism in the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis after allogeneic
566 stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant **2005**; 36(12): 1089-95.
- 567 45. Carvalho A, Cunha C, Carotti A, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and
568 susceptibility to infections in allogeneic stem cell transplantation. Exp Hematol **2009**;
569 37(9): 1022-9.
- 570 46. Crosdale DJ, Poulton KV, Ollier WE, Thomson W, Denning DW. Mannose-binding lectin
571 gene polymorphisms as a susceptibility factor for chronic necrotizing pulmonary
572 aspergillosis. J Infect Dis **2001**; 184(5): 653-6.
- 573 47. Granell M, Urbano-Ispizua A, Suarez B, et al. Mannan-binding lectin pathway
574 deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation.
575 Exp Hematol **2006**; 34(10): 1435-41.
- 576 48. Ziv E, Dean E, Hu D, et al. Genome-wide association study identifies variants at 16p13
577 associated with survival in multiple myeloma patients. Nat Commun **2015**; 6: 7539.
- 578 49. Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. Nat Rev Genet
579 **2012**; 13(3): 175-88.
- 580 50. Newport MJ, Finan C. Genome-wide association studies and susceptibility to infectious
581 diseases. Brief Funct Genomics **2011**; 10(2): 98-107.
- 582 51. Bowes J, Budu-Aggrey A, Huffmeier U, et al. Dense genotyping of immune-related
583 susceptibility loci reveals new insights into the genetics of psoriatic arthritis. Nat Commun

- 584 **2015**; 6: 6046.
- 585 52. Hebert HL, Bowes J, Smith RL, et al. Identification of loci associated with late-onset
586 psoriasis using dense genotyping of immune-related regions. *Br J Dermatol* **2015**;
587 172(4): 933-9.
- 588 53. Mayes MD, Bossini-Castillo L, Gorlova O, et al. Immunochip analysis identifies multiple
589 susceptibility loci for systemic sclerosis. *Am J Hum Genet* **2014**; 94(1): 47-61.
- 590 54. Ortiz-Fernandez L, Carmona FD, Montes-Cano MA, et al. Genetic Analysis with the
591 Immunochip Platform in Behcet Disease. Identification of Residues Associated in the
592 HLA Class I Region and New Susceptibility Loci. *PLoS One* **2016**; 11(8): e0161305.
- 593 55. Flachsbart F, Ellinghaus D, Gentschew L, et al. Immunochip analysis identifies
594 association of the RAD50/IL13 region with human longevity. *Aging Cell* **2016**; 15(3): 585-
595 8.
- 596 56. Danjou F, Fozza C, Zoledziewska M, et al. A genome-wide association study by
597 ImmunoChip reveals potential modifiers in myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol*
598 **2016**.
- 599 57. Kumar V, Cheng SC, Johnson MD, et al. Immunochip SNP array identifies novel genetic
600 variants conferring susceptibility to candidaemia. *Nat Commun* **2014**; 5: 4675.
- 601 58. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease
602 from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal
603 Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious
604 Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* **2008**;
605 46(12): 1813-21.
- 606 59. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association
607 and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* **2007**; 81(3): 559-75.
- 608 60. Lupianez CB, Canet LM, Carvalho A, et al. Polymorphisms in Host Immunity-Modulating
609 Genes and Risk of Invasive Aspergillosis: Results from the AspBIOmics Consortium.
610 *Infect Immun* **2016**; 84(3): 643-57.
- 611 61. Patterson N, Price AL, Reich D. Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet*

- 612 **2006**; 2(12): e190.
- 613 62. Cabrera S, Sanchez E, Requena T, et al. Intronic variants in the NFKB1 gene may
614 influence hearing forecast in patients with unilateral sensorineural hearing loss in
615 Meniere's disease. PLoS One **2014**; 9(11): e112171.
- 616 63. Dougherty EJ, Pollenz RS. Analysis of Ah receptor-ARNT and Ah receptor-ARNT2
617 complexes in vitro and in cell culture. Toxicol Sci **2008**; 103(1): 191-206.
- 618 64. Lai ZW, Pineau T, Esser C. Identification of dioxin-responsive elements (DREs) in the 5'
619 regions of putative dioxin-inducible genes. Chem Biol Interact **1996**; 100(2): 97-112.
- 620 65. Jeon MS, Esser C. The murine IL-2 promoter contains distal regulatory elements
621 responsive to the Ah receptor, a member of the evolutionarily conserved bHLH-PAS
622 transcription factor family. J Immunol **2000**; 165(12): 6975-83.
- 623 66. Quintana FJ. Regulation of central nervous system autoimmunity by the aryl hydrocarbon
624 receptor. Semin Immunopathol **2013**; 35(6): 627-35.
- 625 67. Quintana FJ, Sherr DH. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity.
626 Pharmacol Rev **2013**; 65(4): 1148-61.
- 627 68. Quintana FJ. The aryl hydrocarbon receptor: a molecular pathway for the environmental
628 control of the immune response. Immunology **2013**; 138(3): 183-9.
- 629 69. Stockinger B, Di Meglio P, Gialitakis M, Duarte JH. The aryl hydrocarbon receptor:
630 multitasking in the immune system. Annu Rev Immunol **2014**; 32: 403-32.
- 631 70. Nguyen NT, Hanieh H, Nakahama T, Kishimoto T. The roles of aryl hydrocarbon receptor
632 in immune responses. Int Immunol **2013**; 25(6): 335-43.
- 633 71. Hanieh H. Toward understanding the role of aryl hydrocarbon receptor in the immune
634 system: current progress and future trends. Biomed Res Int **2014**; 2014: 520763.
- 635 72. Kolluri SK, Weiss C, Koff A, Gottlicher M. p27(Kip1) induction and inhibition of
636 proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells.
637 Genes Dev **1999**; 13(13): 1742-53.
- 638 73. Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. The PAS superfamily: sensors of environmental
639 and developmental signals. Annu Rev Pharmacol Toxicol **2000**; 40: 519-61.

- 640 74. Antoniv TT, Ivashkiv LB. Interleukin-10-induced gene expression and suppressive
641 function are selectively modulated by the PI3K-Akt-GSK3 pathway. *Immunology* **2011**;
642 132(4): 567-77.
- 643 75. Bessede A, Gargaro M, Pallotta MT, et al. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease
644 tolerance defence pathway. *Nature* **2014**; 511(7508): 184-90.
- 645 76. Hovey D, Zettergren A, Jonsson L, et al. Associations between oxytocin-related genes
646 and autistic-like traits. *Soc Neurosci* **2014**; 9(4): 378-86.
- 647 77. Caffrey AK, Lehmann MM, Zickovich JM, et al. IL-1alpha signaling is critical for leukocyte
648 recruitment after pulmonary *Aspergillus fumigatus* challenge. *PLoS Pathog* **2015**; 11(1):
649 e1004625.
- 650 78. Lass-Flörl C, Roilides E, Löffler J, Wilflingseder D, Romani L. Minireview: host defence in
651 invasive aspergillosis. *Mycoses* **2013**; 56(4): 403-13.
- 652 79. Gibson PG, Wark PA, Simpson JL, et al. Induced sputum IL-8 gene expression,
653 neutrophil influx and MMP-9 in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Eur Respir J*
654 **2003**; 21(4): 582-8.
- 655 80. Lionakis MS, Swamydas M, Fischer BG, et al. CX3CR1-dependent renal macrophage
656 survival promotes *Candida* control and host survival. *J Clin Invest* **2013**; 123(12): 5035-
657 51.
- 658 81. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, et al. International union of pharmacology. XXII.
659 Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **2000**; 52(1): 145-76.
- 660 82. Bachelierie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, et al. International Union of Basic and
661 Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine
662 receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors.
663 *Pharmacol Rev* **2014**; 66(1): 1-79.
- 664 83. Faure S, Meyer L, Costagliola D, et al. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals
665 with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science* **2000**; 287(5461):
666 2274-7.
- 667 84. Break TJ, Jaeger M, Solis NV, et al. CX3CR1 is dispensable for control of mucosal

668 Candida albicans infections in mice and humans. Infect Immun **2015**; 83(3): 958-65.

669 85. Westra HJ, Peters MJ, Esko T, et al. Systematic identification of trans eQTLs as putative
670 drivers of known disease associations. Nat Genet **2013**; 45(10): 1238-43.

671 86. Zeller T, Wild P, Szymczak S, et al. Genetics and beyond--the transcriptome of human
672 monocytes and disease susceptibility. PLoS One **2010**; 5(5): e10693.

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

Figure 1. Summary workflow of the ImmunoChip® approach.

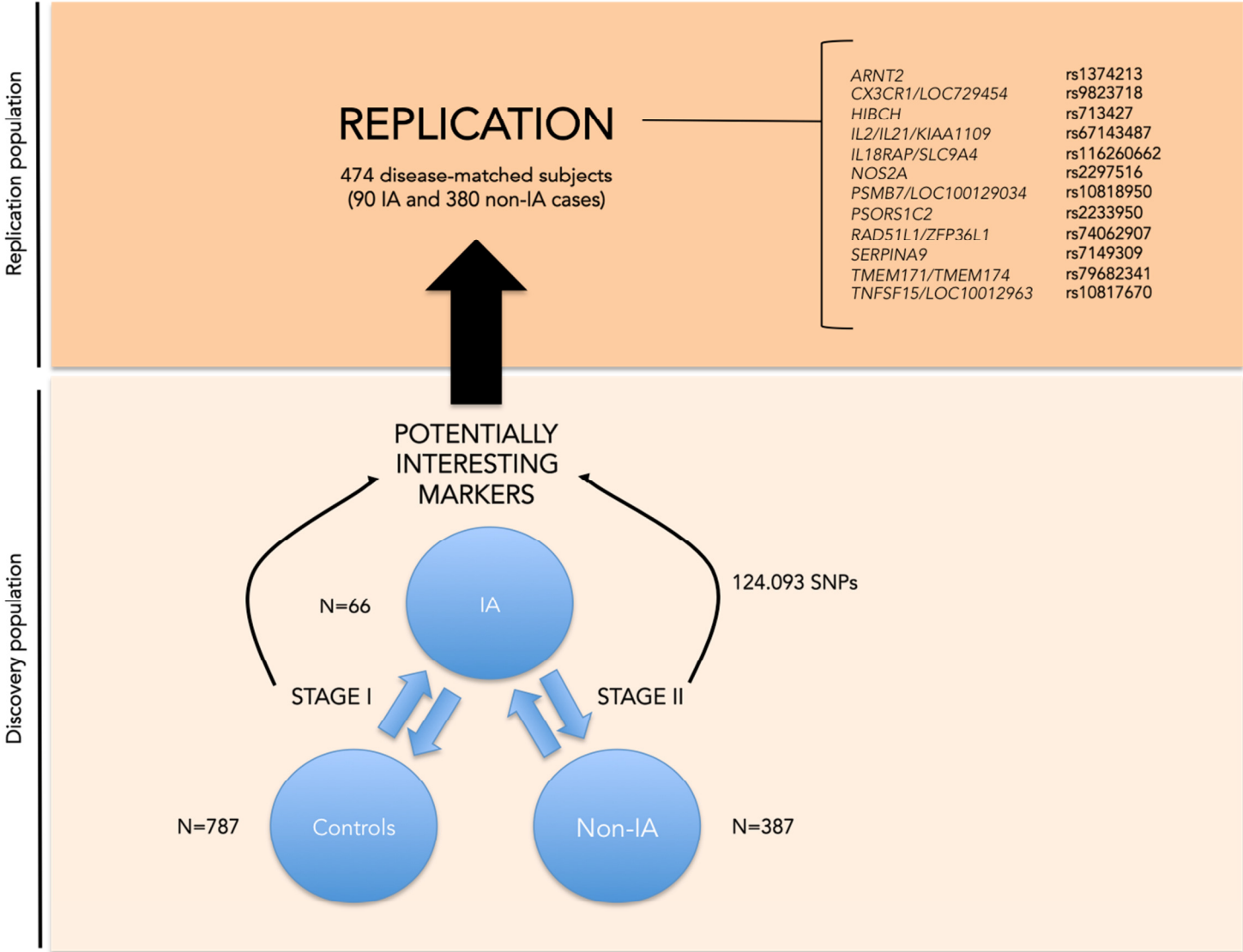


Figure 2.

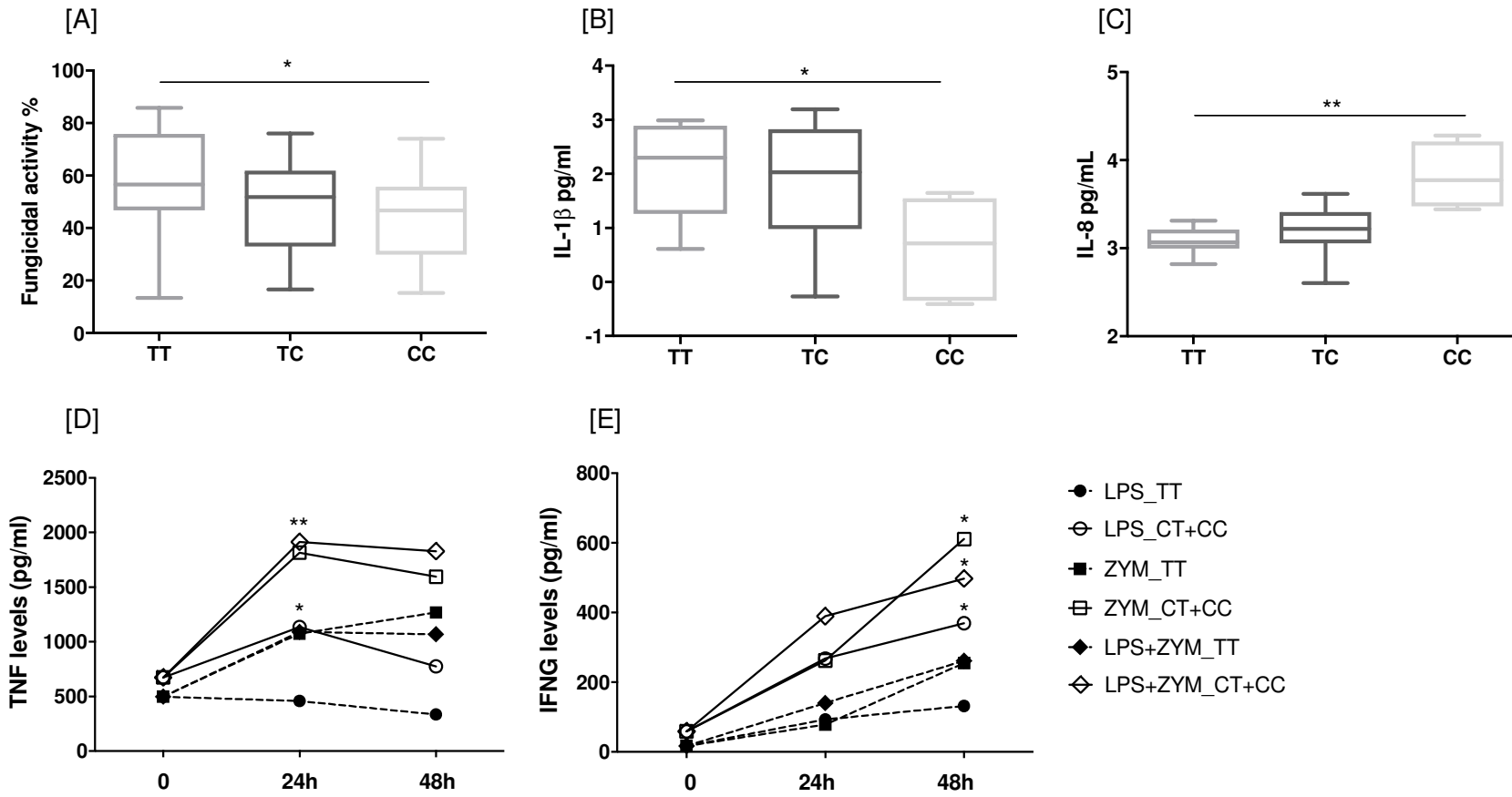


Figure 3.

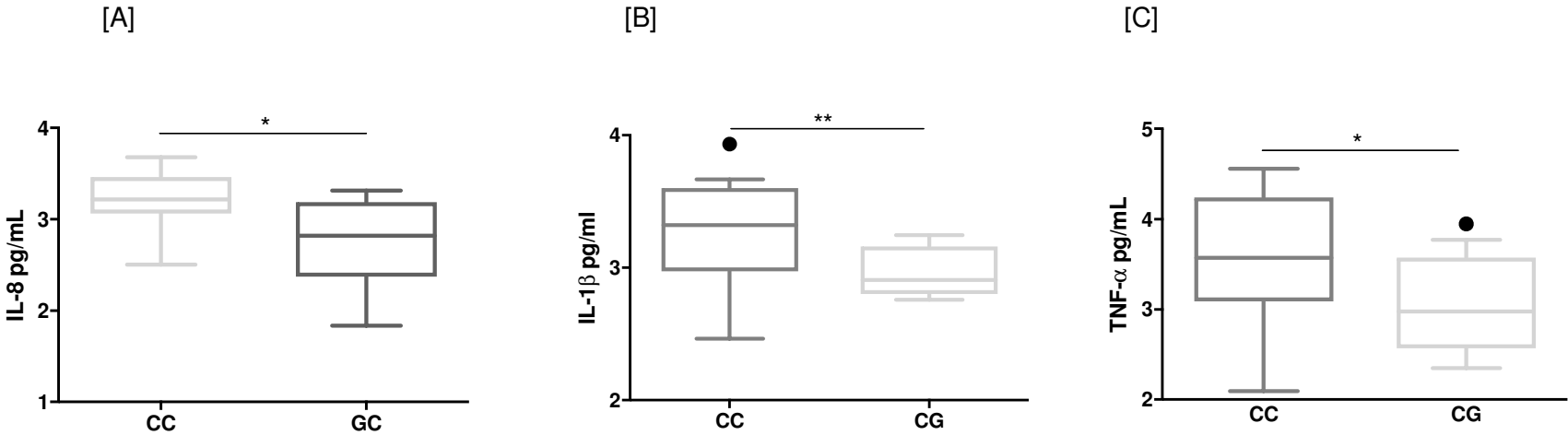


Table 1. Baseline and clinical characteristic of patients with or without invasive aspergillosis (IA).

| Discovery population | | | | |
|---|-----------------|---------------------|-------------------------|----------------|
| | Overall (n=423) | IA patients (n=66) | non-IA patients (n=357) | <i>P</i> value |
| Demographic variables | | | | |
| Age (Average±SD) | 52.37 ± 15.41 | 53.18 ± 12.79 | 52.22 ± 15.86 | 0.589 |
| Sex ratio (male/female) | 1.09 (221/202) | 1.75 (42/24) | 1.01 (179/178) | 0.013 |
| Haematological disease | | | | |
| AML | 329 (77.78) | 49 (74.24) | 280 (78.43) | 0.555 |
| ALL | 57 (13.48) | 13 (19.70) | 44 (12.32) | 0.157 |
| other | 37 (08.75) | 4 (06.06) | 33 (09.24) | 0.546 |
| allo-HSCT | 101 (23.88) | 19 (28.79) | 82 (22.97) | 0.389 |
| Ever received prophylaxis * | 261 (61.70) | 27 (40.91) | 234 (65.55) | 0.0003 |
| Never received prophylaxis [∂] | 84 (19.86) | 20 (30.30) | 64 (17.93) | 0.032 |
| Replication population | | | | |
| | Overall (n=473) | IA patients (n=93) | non-IA patients (n=380) | <i>P</i> value |
| Demographic variables | | | | |
| Age (Average±SD) | 52.50 ± 16.57 | 51.49 ± 17.22 | 52.75 ± 16.43 | 0.512 |
| Sex ratio (male/female) | 1.54 (287/186) | 2.32 (65/28) | 1.41 (222/158) | 0.056 |
| Haematological disease | | | | |
| AML | 252 (53.28) | 49 (52.69) | 203 (53.42) | 0.991 |
| ALL | 75 (15.86) | 21 (22.58) | 54 (14.21) | 0.068 |
| other | 146 (30.87) | 23 (24.73) | 123 (32.37) | 0.192 |
| allo-HSCT | 157 (33.19) | 31 (33.33) | 126 (33.16) | 0.928 |
| Ever received prophylaxis [†] | 215 (45.45) | 46 (49.46) | 169 (44.47) | 0.453 |
| Never received prophylaxis [∂] | 77 (16.28) | 17 (18.28) | 60 (15.79) | 0.670 |
| Overall population | | | | |
| | Overall (n=896) | IA patients (n=159) | non-IA patients (n=737) | <i>P</i> value |
| Demographic variables | | | | |
| Age (Average±SD) | 52.44 ± 16.03 | 52.19 ± 15.51 | 52.49 ± 16.15 | 0.831 |
| Sex ratio (male/female) | 1.31 (508/388) | 2.06 (107/52) | 1.19 (401/336) | 0.003 |
| Haematological disease | | | | |
| AML | 581 (64.84) | 98 (61.64) | 483 (65.54) | 0.399 |
| ALL | 132 (14.73) | 34 (21.38) | 98 (13.30) | 0.013 |
| other | 183 (20.42) | 27 (16.98) | 156 (21.17) | 0.281 |
| allo-HSCT | 258 (28.79) | 50 (31.45) | 208 (28.22) | 0.473 |
| Ever received prophylaxis | 476 (53.13) | 73 (45.91) | 403 (54.68) | 0.054 |
| Never received prophylaxis [∂] | 161 (17.97) | 37 (23.27) | 124 (16.82) | 0.071 |

Abbreviations: HSCT: Haematopoietic stem cell transplantation, AML: acute myeloid leukemia, ALL: acute lymphoid leukemia. *P*≤0.05 was considered significant and shown in bold.

* Some patients had several prophylactic drugs.

† Prophylaxis status was available in 345 subjects from the discovery cohort (47 IA and 298 non-IA patients) and 292 subjects from the replication cohort (63 IA and 229 non-IA patients).

∂ Percentage calculated according to the number of patients with prophylaxis data available.

Table 2. Summary results for SNPs associated with IA risk.

| GENE | SNP_rsID | Risk allele | Discovery analysis (ImmunoChip®) | | Replication | | Meta-analysis ² | | | | | | |
|-----------------------------|-------------|-------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|
| | | | OR | <i>P</i> _{value} | OR | <i>P</i> _{value} | OR (Combined) | <i>P</i> _{Meta} | Weight GWAS | Weight Replication | χ^2 _{Het.} | <i>P</i> _{Het.} | <i>I</i> ² |
| <i>ARNT2</i> | rs1374213 | G | 1.92 (1.32-2.78) | 7.8•10⁻⁴ | 1.63 (1.17-2.25) | 0.003 | 1.74 (1.36-2.23) | 9.07•10⁻⁶ | 43.53 | 56.47 | 0.45 | 0.502 | 0.00% |
| <i>CX3CR1 LOC729454</i> | rs9823718 | C | 2.33 (1.46-3.74) | 5.41•10⁻⁴ | 1.63 (1.00-2.65) | 0.050 | 1.96 (1.38-2.79) | 1.72•10⁻⁴ | 51.64 | 48.36 | 1.08 | 0.299 | 7.40% |
| <i>HIBCH</i> | rs713427 | G | 2.48 (1.58-3.89) | 8.90•10⁻⁵ | 1.04 (0.66-1.64) | 0.87 | 1.61 (0.69-3.76) | 0.275 | 50.07 | 49.93 | 7.06 | 0.008 | 85.80% |
| <i>IL2 IL21 KIAA1109</i> | rs67143487 | G | 0.43 (0.26-0.70) | 5.6•10⁻⁴ | 0.79 (0.55-1.00) | 0.20 | 0.60 (0.33-1.09) | 0.095 | 44.62 | 55.38 | 4.33 | 0.037 | 76.90% |
| <i>IL18RAP SLC9A4</i> | rs116260662 | T | 6.04 (2.50-14.58) | 6.42•10⁻⁵ | 2.11 (0.80-5.50) | 0.13 | 3.64 (1.30-10.2) | 0.014 | 51.79 | 48.21 | 2.49 | 0.115 | 59.80% |
| <i>NOS2A</i> | rs2297516 | C | 1.96 (1.33-2.91) | 8.0•10⁻⁴ | 0.89 (0.64-1.23) | 0.47 | 1.31 (0.60-2.85) | 0.493 | 49.03 | 50.97 | 9.25 | 0.002 | 89.20% |
| <i>PSMB7 LOC100129034</i> | rs10818950 | G | 0.45 (0.29-0.70) | 3.95•10⁻⁵ | 0.76 (0.54-1.06) | 0.11 | 0.60 (0.36-0.99) | 0.047 | 46.11 | 53.89 | 3.36 | 0.067 | 70.20% |
| <i>PSORS1C2</i> | rs2233950 | A | 5.00 (2.29-10.97) | 5.81•10⁻⁵ | 1.45 (0.54-3.90) | 0.47 | 2.80 (0.83-9.41) | 0.096 | 53.08 | 46.92 | 3.71 | 0.054 | 73.00% |
| <i>RAD51L1 ZFP36L1</i> | rs74062907 | A | 2.20 (1.48-3.25) | 7.4•10⁻⁵ | 1.01 (0.70-1.45) | 0.96 | 1.48 (0.69-3.18) | 0.31 | 49.52 | 50.48 | 8.08 | 0.004 | 87.60% |
| <i>SERPINA9</i> | rs7149309 | A | 4.37 (2.11-9.02) | 5.79•10⁻⁵ | 1.53 (0.64-3.64) | 0.33 | 2.66 (0.95-7.42) | 0.062 | 52.7 | 47.3 | 3.29 | 0.07 | 69.60% |
| <i>TMEM171 TMEM174</i> | rs79682341 | A | 4.37 (2.11-9.02) | 6.17•10⁻⁵ | 1.25 (0.54-2.88) | 0.61 | 2.38 (0.70-8.09) | 0.166 | 51.45 | 48.55 | 4.89 | 0.027 | 79.60% |
| <i>TNFSF15 LOC100129633</i> | rs10817670 | A | 2.54 (1.65-3.91) | 2.34•10⁻⁵ | 0.93 (0.63-1.35) | 0.69 | 1.53 (0.57-4.09) | 0.398 | 49.47 | 50.53 | 11.7 | 0.001 | 91.40% |

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; OR, Odds ratio; GWAS, genome-wide association study.

² A random effect model was assumed.

RESULTADOS

1. Artículo Primero

1.1. Justificación del diseño y breve descripción de los resultados

1.1.1. Población del estudio y diagnóstico clínico de AI

Todos los participantes del estudio eran caucásicos y fueron reclutados en el Hospital Universitario Virgen de la Nieves (Granada) y en el Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca). Todas las determinaciones y análisis genéticos en pacientes hematológicos fueron realizados con consentimiento informado y garantizando el anonimato de los pacientes. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. El estudio incluyó 182 pacientes hematológicos reclutados entre Enero del 2004 y Enero del 2011. Todos los pacientes hematológicos incluidos en este estudio habían recibido un tratamiento prolongado de quimioterapia o habían sido trasplantados y por lo tanto eran considerados como pacientes susceptibles a desarrollar AI. Los datos demográficos y clínicos fueron obtenidos mediante una revisión de los registros hospitalarios. Los datos recogidos fueron: criterios del huésped (neutropenia severa > 10 días; fiebre persistente > 96 h refractaria a tratamiento antibacteriano de amplio espectro; signos y síntomas de enfermedad de injerto contra huésped; tratamiento con corticoides > 0,3mg/kg por día; e infección fúngica invasiva durante un episodio previo de neutropenia), criterios microbiológicos (dos o más resultados positivos de GM en muestras de sangre, considerando 0.5 como el threshold positivo o una sola muestras positiva con un threshold mínimo de 0.8), y criterios clínicos del tracto inferior respiratorio (criterios mayores: infiltrados en la imagen de la tomografía computerizada; signo de halo; signo airecrescente; cavitaciones sin área de consolidación; criterios menores: tos; dolor torácico; hemoptisis; sonidos patológicos pulmonares; y evidencias radiológicas de infección). Los datos del laboratorio también fueron recogidos. AI probada p probable fue diagnosticada basándonos en los criterios de la EORTC del 2008⁷⁵.

1.1.2. Metodología empleada

Detección del antígeno GM

La detección del antígeno GM en suero se ha considerado una prueba útil para el diagnóstico precoz y el seguimiento de la AI y actualmente está incluido en los criterios diagnósticos de la AI⁷⁵. En este estudio, las determinaciones de GM se realizaron dos veces por semana en pacientes ingresados en el hospital y en pacientes externos se realizaba la determinación de GM en cada visita hasta el final de su tratamiento inmunodepresivo o quimioterápico. Las concentraciones de GM en suero fueron determinadas con el kit Platelia Aspergillus ELISA (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este kit

comercial ha demostrado una buena sensibilidad para la detección de GM²⁴³ y la concentración de GM correlacionó con la carga fúngica en los tejidos^{93,96}. Se consideró una muestra positiva, cuando el valor del ratio de la densidad óptica del test era $\geq 0,5$ en dos muestras consecutivas o una única muestra con un valor $>0,8$. Se realizó una revisión de tratamientos concomitantes (piperacilina-tazobactam o amoxicilina-ácido clavulánico) en cada paciente para evitar posibles falsos positivos. De igual forma, los test se realizaron en el mismo día para evitar contaminación de la muestra y asegurar una mayor precisión de los resultados.

Selección de SNPs y genotipado

Fueron seleccionados 27 polimorfismos de DC-SIGN, Dectin-1, Dectin-2, CCL2 y CCR2 para su genotipado en la población de estudio (Tabla 1). La selección de los SNPs se realizó mediante una aproximación de tagging y funcionalidad. El tagging nos permitió evaluar la variabilidad completa de estos genes, mientras que la selección funcional nos posibilitó analizar la asociación de aquellos SNPs que tenían una funcionalidad ya conocida. El tagging se realizó incluyendo sólo aquellos SNPs con una frecuencia superior al 0,05 y con un r^2 (equilibrio de ligamiento) de 0,8. Forzamos la inclusión de los SNPs DC-SING_{rs4804803}, CCL2_{rs1024610} y CCL2_{rs1024611} que tenían una funcionalidad conocida.

El genotipado de los SNPs se realizó mediante sondas KASPar® (KBioscience, Hoddesdon, Hertfordshire, UK) mediante una touch-down PCR de acuerdo con los protocolos establecidos por el fabricante y en placas de 384 donde los casos y controles se distribuyeron de forma aleatoria. Los productos de PCRs fueron analizadas con el ABI Prism 7900HT sistema de detección de uso del SDS 2.4 software (Applied Biosystem). Como control de calidad interno, $\geq 5\%$ de las muestras serán seleccionadas al azar y se incluirán por duplicado. La concordancia entre el original y los duplicados de las muestras de los 27 SNPs analizados fue $\geq 99,5\%$. El porcentaje de genotipado para todos los SNPs fue $\geq 97,8\%$, con excepción del SNP Dectin-1_{rs11053599} con una tasa del 94,5%.

Análisis estadísticos

Evaluamos si los SNPs seleccionados se encontraban en equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) en la población de controles mediante un análisis estándar de χ^2 (valores observados-esperados). El análisis de asociación de cada marcador con el riesgo a desarrollar AI se realiza por regresión logística asumiendo los modelos de herencia codominante, dominante y recesiva y ajustada por edad, género, enfermedad hematológica y factores de riesgo de AI (trasplante, neutropenia, enfermedad de injerto contra huésped y tratamiento con corticoides). La significación estadística se estableció en un valor de $p < 0,05$

Debido al gran número de SNPs analizados, se llevó a cabo un ajuste de comparaciones múltiples (multiple testing) mediante un algoritmo basado en una versión modificada del método de Bonferroni. Para cada gen se calculó, el "número de variables independientes efectivas" (Meff) mediante el uso de un algoritmo desarrollado por Stephens y colaboradores en 2005 (<http://gump.qimr.edu.au/general/daleN/SNPSPdsuperlite/>)²⁴⁴. Se obtendrá un valor de Meff global de la suma de los Meff de cada uno de los genes de estudio

Los bloques de LD y los análisis de asociación de haplotipos se realizaron mediante SNPtool (http://www.dkfz.de/de/molgen_epidemiology/tools/SNPtool.html)²⁴⁵ y Haploview v4.2. Los bloques de LD se representaron gráficamente de acuerdo al método descrito por Gabriel y colaboradores²⁴⁶.

Predicción de la funcionalidad de los SNPs de interés

Para la predicción de la funcionalidad de los SNPs asociados con AI utilizamos la herramienta online FASnnp (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw>) que incluye información de otro programa online PolyPhen (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/PolyPhen/>) y de cuatro fuentes de información diferentes (TFsearch, ESEfinder, Rescue-ESE y FAS-ESS). Este análisis nos permite determinar si un SNP en particular podría influir en la unión de determinados factores de transcripción o en procesos como el splicing, la unión de microRNAs o cambios en la secuencia aminoacídica. Esta herramienta nos proporciona un ranking de niveles de riesgo: 0 (ningún efecto), 1 (muy bajo), 2 (bajo), 3 (medio), 4 (alto) y 5 (muy alto).

Extracción de RNA, retrotranscripción y qPCR

La sangre de 21 donantes sanos fue recogida en tubos de PAXGENE RNA y almacenados a -80°C. La extracción del RNA total se llevó a cabo con el kit PAXGENE Blood RNA Isolation (PreAnalytix) y la retrotranscripción a cDNA se realizó con el kit Quantitec reverse transcription (catalog number: 205311; Quiagen). La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó en el sistema ABI PRISM® 7500 HT Applied Biosystem) de acuerdo con la recomendaciones del fabricante. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. La cuantificación relativa de la expresión RNAm de Dectin-1 fue calculada con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Nuestros resultados fueron normalizados con un gen control (GAPDH, Hs_GAPDH_2_SG Quantitec Primer Assay, Catlog number_ QT01192646; Quiagen) y un calibrador (First Choice® Human Brain Reference RNA, catalog number: 6050; Applied Biosystem)

Análisis de interacción SNP-SNP

Las interacciones entre SNPs se analizaron mediante el algoritmo MDR (multifactor dimensionality reduction). Los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando el valor de $P \leq 0.05$ y se validaron mediante un test de permutaciones realizado en R (<http://www.epistasis.org>). Finalmente las interacciones se visualizan por la construcción de un dendograma de acuerdo al método de Moore y colaboradores²⁴⁷.

1.2. Resultados

En este estudio en la Comparación de los casos no-AI y AI se observó que estos últimos fueron más propensos a tener tos y sonidos patológicos pulmonares ($p < 0,001$ y 0.011 , respectivamente) y presentan con mayor frecuencia de radiografías torácicas (Rx) y tomografía axial computerizada (TAC) patológicas ($p < 0.001$). Los factores de riesgo establecidos para la infección por AI (TASPE, neutropenia, uso de terapia corticoide contra la EICH) estaban homogéneamente distribuidos entre casos (pacientes con AI) y controles (pacientes sin AI). Cincuenta y siete pacientes fueron diagnosticados con la infección (probada o probable) de acuerdo con los criterios revisados de la EORTC/MSG (2008).

El análisis de asociación de los 27 SNPs en los genes de lectinas tipo-C y quimiocinas y el riesgo a padecer AI se muestra en la Tabla Suplementaria 1. Todos los polimorfismos analizados se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg para el grupo control (pacientes sin AI).

Varios polimorfismos se encontraron asociados con el riesgo a desarrollar AI (Tabla 3). Los polimorfismos Dectin-1_{rs3901533} y Dectin-1_{rs7309123} y DC-SIGN_{rs4804800} mostraron la asociación más fuerte con el riesgo de infección a AI (OR_{T/T} = 5.59, IC 95% 1.37–22.77; OR_{G/G} = 4.91, IC 95% 1.52–15.89 and OR_{AG+G/G} = 2.75, IC 95% 1.27–5.95, respectivamente). Curiosamente, algunos otros polimorfismos dentro del gen de DC-SIGN también se asociaron con un mayor riesgo de infección con AI. Los portadores de los alelos, DC-SIGN_{rs11465384_T}, DC-SIGN_{rs7248637_A} y DC-SIGN_{rs7252229_C} tenían un riesgo significativamente mayor a desarrollar la infección (OR_{C/T+T/T}=2.70 IC 95% 1.24-5.90, $p=0.012$; OR_{G/A+I/A}=2.39 IC 95% 1.09-5.22, $p=0.028$; OR_{G/C+C/C}=2.05 IC 95% 1.00-4.22, $P=0.049$, respectivamente), mientras que los pacientes portadores del alelo DC-SIGN_{rs2287886_A} mostraron una ligera tendencia a asociarse con un menor riesgo de infección por AI (OR por alelo=0.60 IC 95% 0.34-1.05, $p=0.069$).

A fin de evaluar el grado de correlación de los SNPs significativos y la positividad de GM, se realizó un análisis de regresión lineal. En el conjunto de la población, se realizaron 3784 ensayos por duplicado y fueron considerados como positivos

(14.03%). Curiosamente, se ha observado un mayor porcentaje de GM positivos entre los pacientes portadores del alelo Dectin-1_{rs3901533_T} y entre los pacientes portadores del genotipo Dectin-1_{rs7309123_G/G} que sugiere un papel de estos polimorfismos en la determinación de un reconocimiento y aclaración defectuoso de los conidios de *Aspergillus* (Figura 1). No se observó correlación de los polimorfismos DC-SING y la determinación positiva de GM.

Posteriormente evaluamos los SNPs asociados con AI utilizando el FastSNP. El análisis predictivo de funcionalidad de esta herramienta, nos sugirió una función para el SNP Dectin-1_{rs7309123} debido a su localización en el sitio de unión (GAAAGAC; score 1-2) para el factor de transcripción Cdx4 (*caudal type homeobox transcription factor 1*), lo que sugería que este SNP podía alterar la transcripción de Dectin-1, y por lo tanto tener un papel fundamental en la susceptibilidad a AI. El resto de SNPs asociados con AI no mostraron ningún tipo de funcionalidad predictiva.

Para seguir investigando las posibles consecuencias de este SNP Dectin-1_{rs7309123}, medimos la expresión del RNAm de Dectin-1 en 21 donantes sanos y la correlacionamos con sus genotipos. Obteniendo una disminución significativa en la expresión del RNAm de Dectin-1 en los portadores del genotipo GG en comparación con los portadores del alelo C. Por lo que estos resultados soportaban nuestras hipótesis que sugería que los portadores del alelo Dectin-1_{rs7309123_G} podían ser más susceptibles a la infección debido a una alteración en el sitio de unión a sus factores de transcripción.

2. Artículo segundo

2.1 Justificación del diseño y breve descripción de los resultados

2.1.1 Diseño y población de estudio

Fueron analizados 36 SNPs incluidos en 14 genes inmunomoduladores asociados con AI. La selección de los polimorfismos se basó en: SNPs asociados a genes inmunoreguladores capaces de alterar la respuesta inmune, SNPs cuya funcionalidad había sido demostrada y SNPs asociados a enfermedades infecciosas. El genotipado de los SNPs se realizó mediante sondas KASPar® (KBioscience, Hoddesdon, Hertfordshire, UK)⁴⁹. Un total de 593 pacientes oncohematológicos fueron incluidos en este estudio, reclutados entre Febrero del 2010 y Marzo del 2014 gracias a la colaboración del consorcio AspBiomics (www.aspbionics.eu), dos centros hospitalarios españoles (Hospital Universitario de Salamanca y el Hospital Clínico Universitario de Valencia) y un ensayo clínico multicéntrico español (PCRAGA, número de ensayo clínico de la UE 2010-019406-17)¹⁰⁶. Basándonos en criterios Clínicos y microbiológicos fueron diagnosticados 113 AI probadas/probables según los criterios revisados de la EORTC/MSG del 2008⁷⁵.

Para confirmar las asociaciones significativas observadas en nuestra población, el análisis de nuestro estudio se amplió con un segundo grupo de pacientes de alto riesgo a AI (188 pacientes, 36 pacientes diagnosticados con AI probada / probable y 152 pacientes sin AI) recogidas entre Enero del 2013 y Enero del 2015 en dos instituciones clínicas italianas (Universidad católica del S. Corazón, Roma; Y universidad de Modena y Reggio Emilia, AOU Policlínico, Módena) y el Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, España). Finalmente nuestro estudio contaba con 781 pacientes de alto riesgo para AI, de los cuales 149 fueron diagnosticados con AI probada/probable (19 AI probadas y 130 AI probables). Convirtiéndose de esta forma en una de las poblaciones más grandes reclutadas hasta el momento utilizada para evaluar la susceptibilidad genética a AI. Este estudio fue aprobado por todos los comités éticos de las instituciones participantes.

2.1.2 Metodología empleada

Análisis estadísticos

Realizamos un análisis de HWE en el grupo de controles mediante un análisis estándar de χ^2 (valores observados-esperados). La posible asociación de los marcadores seleccionados con el riesgo a desarrollar AI fue analizada por regresión logística ajustando por: edad, género, país de origen, TPH-Alo y profilaxis antifúngica. Los bloques de LD y los análisis de asociación de haplotipos se realizaron mediante SNPTools (https://www.dkfz.de/de/molgen_epidemiology/tools/SNPtool.html;²⁴⁵) y Haploview. Los bloques de LD se representaron gráficamente de acuerdo al método de Gabriel y colaboradores²⁴⁶. La significación estadística se estableció en 0.0004 de acuerdo al método de corrección de múltiples comparaciones de Meff²⁴⁸ (que considera el número de marcadores independientes analizados).

Aislamiento y diferenciación celular

Fueron aisladas células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y monocitos de sangre de dichos pacientes y se realizaron ensayos de estimulación con conidios de *AF*. Los PBMCs fueron aislados por centrifugación de gradiente usando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences) y a continuación, los monocitos fueron aislados por selección inmunomagnética de células CD14⁺. La pureza de la población CD14⁺, fue medida y comprobada por inmunofluorescencia mediante técnicas de separación por sorting. Una vez asegurada la pureza de los monocitos, estos fueron plaqueados con una densidad de 5×10^5 células/ml en platos de 24 pocillos. Posteriormente fueron cultivados durante 7 días en medio de cultivo RPMI, suplementado con suero humano y 20ng/ml de GM-CSF, de manera que se lleva a cabo la diferenciación de monocitos a macrófagos. Los medios de cultivos

fueron cambiados cada tres días aproximadamente. A continuación se llevó a cabo el genotipado de los polimorfismos asociados con susceptibilidad a AI, y tanto los PBMCs como los macrófagos derivados de monocitos fueron agrupados de acuerdo al genotipo de interés.

Ensayos de actividad fungicida

Los macrófagos obtenidos de la derivación de monocitos humanos, serán infectados con conidios de *Aspergillus fumigatus* con una ratio de 1:10. Para medir la capacidad fungicida de los macrófagos, estos estarán en contacto con los conidios durante 2 horas. A continuación se realizarán diluciones seriadas de los lisados de macrófagos, serán plaqueados en medios de crecimiento sólido y se mantendrán en incubación durante 2 días. Una vez transcurridos los 2 días, se calculará el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y el porcentaje de inhibición de UFC.

Ensayos de estimulación de IL12p70 e IFN γ

Estos ensayos fueron realizados en PBMCs de donantes sanos. Los PBMCs fueron seleccionados en función de los genotipos de IL12p70_{rs3212227} y IFN γ _{rs2069705}, y fueron cultivados a 37°C, 5% de CO₂ y en 2 ml de medio de cultivo RPMI suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado con calor y con una mezcla antibiótica que contiene penicilina, estreptomycin y neomicina (Gibco/Life Technologies). Los PBMCs portadores de IFN γ _{rs2069705_T/T} (n = 8), IFN γ _{rs2069705_C/T} (n = 8) y IFN γ _{rs2069705_C/C} (n = 3) fueron incubados 72 h y 96 h con fitohemaglutinina (PHA; 2 μ g/ml) sola o en combinación con lipopolosacárido (LPS; 100ng/ml). A continuación fueron medidos por triplicado los niveles de las interleuquinas: IFN γ , IL12p70, IL8 y TNF α utilizando el kit Procartaplex multiplex immunoassay (Affymetrix / eBioscience) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En paralelo, los PBMCs de los portadores de IL12B_{rs3212227_A/A} (n = 13), IL12B_{rs3212227_A/C} (n = 3) y IL12B_{rs3212227_C/C} (n = 1), fueron incubados 24 h y 48 h con Zymosan (5 μ g/ml) solo o en combinación con LPS (100 ng/ml), y a continuación se realizó la medición de los niveles de las citoquinas, para más tarde correlacionar con el SNP de IL12B_{rs3212227} o el SNP de IL8_{rs3212227}, el cual también fue analizado. Todos los sobrenadantes tras el periodo de incubación fueron almacenados a -80°C hasta ser procesados para la medición de las citoquinas.

Análisis de expresión de RNAm de IL4R e IFN γ

Una vez obtenidos los macrófagos por derivación de monocitos, serán estimulados con conidios de *Aspergillus fumigatus* con una ratio de 1:2 y esta estimulación durará aproximadamente 8 horas. Una vez finalizada la estimulación extraeremos el RNA de los macrófagos utilizando el RNA_{easy} minikit (Qiagen) y a continuación realizaremos una retrotranscripción con el kit iScript cDNA synthesis (Bio-Rad) de

acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Finalmente fue realizada una PCR con tecnología Taqman (Life Technologies) en el sistema ABI PRISM® 7500HT Applied Biosystems obteniendo los resultados de expresión génica de nuestros genes de interés y realizando los análisis estadísticos con la prueba T con corrección de Welch (que asume varianzas diferentes entre grupos).

Análisis de expresión por citometría de flujo de IL4R en linfocitos B y T

Los niveles de la proteína IL4R fueron medidos en PBMCs portadores de los genotipos IL4R_{rs2107356_G/G} (n=13), IL4R_{rs2107356_A/G} (n=24) y IL4R_{rs2107356_A/A} (n=6) siguiendo una versión modificada de un protocolo de citometría, previamente publicado²⁴⁹. Los PBMCs fueron incubados con PBS suplementado con un 5% de SFB y 2mM de EDTA durante 10 min para bloquear los receptores Fc. Posteriormente, las células fueron incubadas 45 min a temperatura ambiente con anticuerpo de ratón anti-humano para poder medir la expresión de IL4R en las células: T CD3⁺, B CD19⁺ y monocitos CD14⁺. El control negativo o control de isotipo utilizado consistía en PBMCs incubados con ficoeritrina (PE)-IgG1 kappa (BD Pharmigen). El análisis de citometría se realizó en función de la tinción de la superficie celular y los anticuerpos utilizados: anti- CD124⁺ conjugado con PE, anti-CD14⁺ conjugado con proteína de clorofila de peridina (PerCP), anti-CD3⁺ conjugado con alofocianina (APC)-eFluor y anti-CD19⁺ conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC) (BD Biosciences). Las células fueron adquiridas con el citómetro de flujo FACSVersé (BD Biosciences) y los datos fueron analizados con el software FlowJo. La intensidad media de fluorescencia (MFI) fue recogida para cada tipo celular y los análisis estadísticos fueron realizados con la prueba T con corrección de Welch (muestras no paramétricas y dos colas).

Modelo predictivo

Por último analizamos el valor de los polimorfismos inmunomoduladores seleccionados para predecir el riesgo a AI mediante un análisis de regresión logística de Cox. Construimos un modelo de predicción, donde se incluía: edad, género, TPH-Alo, profilaxis antifúngica además las variantes genéticas asociadas a AI (P <0,05 tanto para la fase 1 como la fase 2). Utilizamos el P valor de los polimorfismos como un criterio de selección, los SNPs con mayor P valor fueron eliminados y los análisis finalizaron cuando todas las variables habían alcanzado un valor estadísticamente significativo (P<0.05). También fue construido un modelo predictivo con un número similar de SNPs no significativos (P >0,10). La capacidad discriminativa del modelo se analizó mediante el área bajo la curva (AUC) ROC (receiving operating characteristic). El test de verosimilitud LR (-2log likelihood ratio) nos permitió determinar la diferente capacidad predictiva entre el modelo que incluían variables clínicas y genéticas, y el modelo de referencia. Finalmente, llevamos a cabo una prueba de aleatorización de modelos con 50,000

repeticiones para confirmar que el modelo que obteníamos tenía una mayor capacidad que los modelos aleatorizados. Se incluye más información en el material suplementario. Todos los análisis fueron realizados con el software R (<http://www.r-project.org/>).

2.2 Resultados

Un total de 781 pacientes fueron incluidos en este estudio de casos-controles, de los cuales 149 fueron diagnosticados como AI probada/probable de acuerdo a los criterios definidos por la EORTC/MSG (Tabla 2). En general los pacientes con AI y no AI presentaban una edad media similar (52.67 versus 52.9 años; $P = 0.935$), pero los pacientes con AI mostraban una ratio significativamente más alta de hombres frente a mujeres que en los pacientes que no presentaban AI (1.81 versus 1.19; $P = 0.031$). Además, el porcentaje de pacientes diagnosticados con LAL fue significativamente mayor en pacientes con AI que en los no tenían AI (16.11% versus 8.23%; $P = 0.006$), mientras que el porcentaje de pacientes con LAM fue significativamente más bajo en AI que en los casos de no AI (67.11% versus 76.74%; $P = 0.020$). Curiosamente, también observamos una proporción significativamente menor de casos de AI entre aquellos que recibieron posaconazol como profilaxis ($P = 0.017$).

Inicialmente, 36 variantes genéticas en 14 genes inmunomoduladores fueron genotipadas en 593 pacientes de alto riesgo para AI (113 pacientes con AI y 480 pacientes sin AI). Los análisis de regresión logística mostraron que los pacientes portadores del genotipo IL4R_{rs2107356_A/A} y los alelos VEGFA_{rs214623_A} y VEGFA_{rs6900017_T} tenían un aumento significativo del riesgo a AI (OR = 2.05, IC 95% 1.24-3.40; OR = 1.63 IC 95% 1.02-2.61 y OR = 1.76 IC 95% 1.02-3.03, respectivamente), mientras que los pacientes portadores de los alelos IL12B_{rs3212227_C} e IFN γ _{rs2069705_C} mostraban una disminución significativa del riesgo a desarrollar la infección (OR = 0.57 IC 95% 0.35-0.93 y OR = 0.56 IC 95% 0.36-0.88) (Tabla 3). Cuando asumimos un modelo log-aditivo, también encontramos una asociación significativa a un mayor riesgo de AI entre los SNPs VEGFA_{rs2146323} y VEGFA_{rs6900017} (per-allele OR = 1.45 IC 95% 1.04 - 2.03; per-allele OR = 1.73 IC 95% 1.08 - 2.77) y una asociación significativa del SNP IFN γ _{rs2069705} con un menor riesgo de desarrollar la infección (per-allele OR = 0.69 IC 95% 0.49 -0.97).

Con el fin de confirmar estas asociaciones, el estudio se amplió con 188 pacientes más, de los cuales 36 fueron diagnosticados como AI probada/probable. Pero debido al escaso número de casos, decidimos no considerar esta cohorte como una población de replicación independiente. Por lo tanto, realizamos un análisis global donde incluimos 781 pacientes (149 pacientes AI y 632 pacientes no AI), donde se confirmó que los portadores de los genotipos IL4R_{rs2107356_A/A} e IL8_{rs2227307_G/G} tenían un mayor riesgo a desarrollar AI que aquellos pacientes portadores del alelo

WT (OR = 1.92 IC 95% 1.20-3.09; OR = 1.73 IC 95% 1.06-2.81, respectivamente), mientras que los portadores de los alelos IL12B_{rs3212227_C} e IFN γ _{rs2069705_C} mostraban una asociación significativa a un menor riesgo a desarrollar la enfermedad (OR = 0.60 IC 95% 0.38 – 0.96; OR = 0.63 IC 95% 0.41 – 0.97, respectivamente). Cuando comprobamos el efecto por alelo en los SNPs significativos, encontramos que el polimorfismo IL12B_{rs3212227} estaba significativamente asociado con un menor riesgo de infección (per-allele OR = 0.67 IC 95% 0.45 – 0.99) (Tabla 3). También se realizaron análisis de haplotipos, donde se observó un haplotipo de IFN γ _{TC} asociado al riesgo a AI, sin embargo estos resultados eran algo confusos ya que pensamos que el efecto de este haplotipo de riesgo era debido al SNP IFN γ _{rs2069709} (OR = 0.34 IC 95% 0.13 – 0.88; Tabla S1 en material suplementario).

Cabe destacar que en un análisis de regresión logística estratificado por trasplante, considerando solo a los donantes y por lo tanto, sólo consideramos los episodios de AI tras el trasplante (n = 171), donde observamos que la asociación a riesgo de AI de los SNPs IL4R_{rs2107356} e IFN γ _{rs2069705} era considerablemente más fuerte en pacientes sometidos a TPH-alo que en los no trasplantados (para IL4R_{rs2107356} una OR de 5.63 [OR = 5.63 IC 95% 1.98 – 16.05 versus OR = 1.48 IC 95% 0.81 – 2.71] para IFN γ _{rs2069705} una OR de 0.24 [OR = 0.24 IC 95% 0.10 – 0.59 versus OR = 0.86 IC 95% 0.52 – 1.45]) (Tabla 4). En estos análisis estratificados por TPH-Alo, también encontramos que los pacientes portadores del alelo VEGFA_{rs3024994_T} mostraban un mayor riesgo que los pacientes trasplantados portadores del genotipo o el alelo WT (OR = 4.48 IC 95% 1.25 – 16.08) (Tabla 4).

Aunque ninguno de nuestros resultados superó la corrección del test de múltiples comparaciones ($P_{\text{Meff_corrección}} = 0.0004$). Los polimorfismos IL4R_{rs2107356} e IFN γ _{rs2069705} en los análisis estratificados por trasplante, mostraban una asociación muy cercana al valor marginal de significación cuando se asumían modelos de herencia recesivo y dominante ($P_{\text{REC}} = 0.0009$ y $P_{\text{DOM}} = 0.0011$). Considerando estos resultados y también la asociación sugerente del polimorfismo IL12B_{rs3212227} a un mayor riesgo de infección a AI, decidimos evaluar el efecto funcional de las variantes IL4R_{rs2107356}, IL8_{rs2227307}, IL12B_{rs3212227} e IFN γ _{rs2069705} en la respuesta inmune frente a antígenos de *Aspergillus* y/o moléculas estimuladoras. Lo primero que se evaluó, fue si la presencia de estas variantes genéticas afectaba a la actividad fungicida de macrófagos derivados de monocitos. Curiosamente, observamos que los macrófagos de los donantes portadores del alelo IFN γ _{rs2069705_C} mostraban un aumento significativo en su actividad fungicida frente a las esporas de *Aspergillus* en comparación con los donantes portadores del genotipo WT (TT versus TC, $P = 0.0043$; TT versus CC, $P = 0.0012$; y TT versus TC + CC, $P = 0.0003$) (Fig. 1A). No observamos diferencias en la actividad fungicida de los macrófagos de los donantes portadores de los genotipos

IL4R_{rs2107356_A/A}, IL8_{rs2227307_G/G} ni en los portadores del alelo IL12B_{rs3212227_C} en comparación con sus genotipos o alelos WT (Fig. 1B – D).

Debido a estos resultados, decidimos investigar en PBMCs de donantes sanos portadores de estos SNPs, correlacionaban con los niveles de citoquinas tras estimularlos con un antígeno fúngico (Zymosan) o moléculas estimuladoras (LPS y PHA). Estos experimentos de estimulación *in vitro* revelaron que los portadores del alelo IFN γ _{rs2069705_C} tras una incubación de 4 días con LPS o PHA o en combinación, mostraban un aumento en la producción de IFN (P_{LPS}=0.057, P_{PHA}=0.036 y P_{LPS+PHA}=0.030) (Figura 2A; Tabla S2 material suplementario). Además observamos que los donantes portadores del alelo IFN γ _{rs2069705_C} mostraban un brusco incremento en la producción de TNF en casi todos los puntos en comparación con los portadores del genotipo WT (P_{PHA-72 h}=0.045; P_{LPS+PHA-72 h}=0.018; P_{LPS-96h}=0.058 y P_{LPS+PHA-96h}=0.0058) (Figura 2B; Tabla S2 material suplementario). También, los portadores del alelo IFN γ _{rs2069705_C} tenían una cierta tendencia a una mayor producción de IL12p70 en comparación con los portadores del genotipo WT (Figura 2C; Tabla S2 material suplementario). No encontramos ninguna correlación en los portadores de IL12_{rs3212227} e IL8_{rs2227307} y sus niveles de IL12p70 e IL8. Estos resultados nos hacen pensar que el SNP de IFN γ _{rs2069705} puede contribuir al riesgo a AI probablemente a través de la regulación de la expresión de los niveles de RNAm de IFN γ .

Con el fin de corroborar nuestra hipótesis, medimos la expresión de RNAm de IFN γ en PBMCs de donantes sanos (n = 21), los cuales fueron agrupados en función de los genotipos de IFN γ _{rs2069705}. Y sorprendentemente, encontramos que los portadores del alelo IFN γ _{rs2069705_C(T+CC)} mostraban un aumento significativo de los niveles de RNAm de IFN γ en comparación con los portadores del genotipo WT (40.85 \pm 11.65 versus 13.87 \pm 5.43; P=0.049) (Figura 3A y B).

Aunque estos resultados señalaban hacia un relevante papel de este SNP en la modulación de la expresión del gen IFN γ en PBMCs, decidimos confirmar este resultado en la base de datos pública *expression quantitative trait loci* (eQTL) (<http://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>). Y en concordancia con nuestros resultados de expresión génica, encontramos que esta variante situada en el promotor del gen, mostraba una correlación positiva con los niveles de expresión de RNAm de IFN γ con un rango entre P=1.01·10⁻³ y P=1.70·10⁻³. (Figura S1, material suplementario).

A continuación se analizó la correlación entre la variante génica IL4R_{rs2107356} y los niveles de expresión de RNAm del gen IL4R en sangre de donantes sanos (n = 43) y en la línea de macrófagos derivados de monocitos y tras estimularlos *in vitro* con conidios de *AF* (n = 12). Los datos de expresión génica en sangre, no mostraron diferencias de expresión de RNAm del IL4R entre los homocigotos (GG versus

AA; $P = 0.304$), pero sí que mostraban un incremento en el nivel de expresión de RNAm entre heterocigotos comparados con homocigotos, tanto con el genotipo WT, como mutado (AG versus GG [$P = 0.0045$] y AG versus AA [$P = 0.031$] respectivamente) (Figura 3C) Pero cuando comparamos a los portadores del genotipo $IL4R_{rs2107356_AA}$ frente a los portadores del alelo WT no encontramos diferencias estadísticas significativas en los niveles de expresión de RNAm ($P_{AA \text{ vs } GG+AG} = 0.2937$) (Figura 3D). Estos resultados no soportaban nuestra hipótesis, en la cual sugeríamos un efecto funcional para este polimorfismo promotor en los niveles de expresión del RNAm del $IL4R$ y además nuestros resultados se encontraban en concordancia con la base de datos eQTL que confirmaba la falta de asociación de este SNP promotor con los niveles de expresión de RNAm del $IL4R$ en PBMCs. En línea con estos resultados, tampoco encontramos ninguna asociación en la línea de macrófagos derivados de monocitos, ni tras la estimulación in vitro de los macrófagos con conidios de *AF*. (Figura 3E y F). Esta falta de correlación entre este SNP promotor y el nivel de proteína también se confirmó mediante análisis de citometría de flujo en diferentes tipos de células inmunológicas ($CD19^+$, $CD14^+$ y $CD3^+$ células) (Figura 3G). Sin embargo, encontramos un incremento significativo de los niveles de $IL4R$ en células $CD19^+$ heterocigotas en comparación con las células portadoras del genotipo AA ($P = 0.032$) (Figura 3G). Lo cual coincidía con nuestros resultados en sangre de donantes sanos y confirmaba que este polimorfismo promotor no influía en cambios de los niveles de expresión del RNAm ni de los niveles de expresión de la proteína. Además, intentamos medir la correlación de los niveles de proteína y el SNP $IL4R_{rs2107356}$ bajo condiciones de estimulación con $IL4$. Pero debido a que el $IL4R$ se internaliza en cultivos, estos análisis no fueron posibles (datos no mostrados).

Por último, considerando la asociación de algunos de los polimorfismos inmunomoduladores con el riesgo a desarrollar AI y dada la correlación de algunos de estos SNPs con los niveles de citoquinas, decidimos comprobar la capacidad de predicción de estas variantes para diagnosticar el riesgo de infección. Analizamos la capacidad de predicción, construyendo un modelo con: SNPs significativos y las variables clínicas y demográficas, mientras que el modelo de referencia sólo se incluyó variables clínicas y demográficas. A pesar del moderado tamaño de nuestra población, encontramos un modelo de predicción que incluía: cuatro variables genéticas asociadas con AI, edad, género, TPH-alo y profilaxis antifúngica, que mostraba una mejora significativa en la capacidad para predecir la infección en comparación con el modelo de referencia. ($AUC=0.659$, $IC95\% 0.596-0.722$ [$P=0.000005$] versus $AUC=0.564$, $IC95\% 0.499-0.630$ [$P=0.064$; $P_{-2\log \text{ likelihood ratio test}}=0.00052$]) (Tabla 5 y Figura 4). Es importante comentar que también fue construido un modelo de predicción con un número similar de polimorfismos no significativos y variables clínicas y demográficas, el cual no mostró ningún cambio significativo en la capacidad de predicción en comparación con el modelo de

referencia (Tabla S3, material suplementario), lo que confirmaba la utilidad de los SNPs significativos en la predicción de la AI. La consistencia de estos resultados, se confirmó mediante el test de aleatorización de modelos con 50.000 permutaciones que mostró que ninguno de los modelos aleatorizados tenían mayor capacidad de predicción que nuestro modelo construido con los SNPs asociados significativamente con AI [$AUC_{\text{sort-average}}=0.6001$, $SD_{\text{sort-AUC}}=0.0158$ y $Z_{\text{score}}=3.7361$; $P_{Z_{\text{score value}}(50.000\text{perm})}=9.34 \cdot 10^{-05}$] (Tabla 5, material suplementario).

3. Artículo Tercero

3.1 Justificación del diseño y breve descripción de los resultados

3.1.1. Diseño y población de estudio

834 pacientes de origen caucásico sometidos a TPH-Alo o diagnosticados de LMA o LLA y bajo un intenso tratamiento de quimioterapia fueron reclutados para este estudio de casos-controles. 335 pacientes provenían del consorcio AspBIOmics (<http://www.aspbiomics.eu/>) mientras que 341 pacientes provenían de dos instituciones médicas españolas (Hospital Universitario de Salamanca y Hospital Clínico Universitario de Valencia) y de un ensayo clínico multicéntrico español (PCRAGA, EU clinical trial number: 2010-0194067-17)¹⁰⁶. También se incluyeron 148 pacientes reclutados en dos instituciones médicas italianas (Universidad católica del S. Corazón, Roma; Y universidad de Módena y Reggio Emilia, AOU Policlínico, Módena). De estos 834 pacientes un total de 157 pacientes fueron diagnosticados como AI probada o probable de acuerdo a los criterios de la EORTC / MSG del 2008⁷⁵, mientras que 677 pacientes no mostraron ningún signo de la infección fúngica.

3.1.2. Metodología aplicada

Selección de SNPs y genotipado

14 polimorfismos en los genes NFκB1, NFκB2, RELA, RELB, REL e IRF4 fueron seleccionados para su genotipado en la población de estudio (Tabla 1). La selección de los SNPs se basó en previas publicaciones asociadas con cáncer²⁵⁰⁻²⁵⁵ y enfermedades relacionadas con el sistema inmune, incluyendo infecciones fúngicas²⁵⁶⁻²⁶⁵, pero también por su potencial funcionalidad de acuerdo con las bases de datos Haploreg (<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) y ENCODE (<https://genome.ucsc.edu/ENCODE/>). El genotipado de los SNPs seleccionados se llevó a cabo en Genyo (Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica, Granada, España) mediante sondas KASPar® (KBioscience, Hoddesdon, Hertfordshire, UK) de acuerdo con los protocolos establecidos por el fabricante. El 5% de las muestras se incluyeron por

duplicado como control de calidad y la concordancia entre los duplicados fue $\geq 99\%$. El porcentaje de genotipado para todos los SNPs fue del $\geq 90.0\%$, con excepción del SNP IRF4rs872071 que fue excluido del análisis.

Análisis estadístico

Realizamos un análisis de HWE en el grupo de controles mediante un análisis estándar de χ^2 (valores observados-esperados). La posible asociación de los SNPs seleccionados y el riesgo de AI fue analizada por regresión logística ajustando por: edad, género, TPH-Alo, país de origen, enfermedad de base y profilaxis. Aunque la elección de las variables de ajuste se basó en factores de riesgo establecidos para AI, la disponibilidad parcial de algunos de estos datos como: profilaxis antifúngica, tipo de quimioterapia, inmunosupresores, donante emparentado/no emparentado o infección por Citomegalovirus no nos permitió analizar el impacto de estos factores en las asociaciones genéticas comprobadas, además realizamos un análisis estratificado por TPH-Alo. Los análisis se llevaron a cabo con el software SPSS (v.2.0) y STATA (v.12).

De acuerdo al método de corrección de múltiples comparaciones de Meff²⁴⁸ (que considera el número de marcadores independientes analizados) y teniendo en cuenta el número de modelos de herencia testados. La significancia estadística se estableció en 0.001 ($[0.05]/13$ marcadores genéticos independientes/ 4 modelos de herencia).

LD y análisis de haplotipos

Los bloque de LD se realizaron con los datos de genotipado de nuestro grupo control (no-AI) usando el SNPtool (https://www.dkfz.de/de/molgen_epidemiology/tools/SNPtool.html;²⁴⁵) y Haploview software (v.4.2). Además realizamos análisis de asociación de haplotipos usando SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). Las frecuencias de los haplotipos se determinaron con el algoritmo de *Expectation-maximization* (EM) y la frecuencia mínima de haplotipos fue de 0.01, por lo que evaluamos la asociación para haplotipos comunes.

Análisis eQTL

Comprobamos la correlación de los SNPs seleccionados y la expresión génica del gen correspondiente en células primarias en la base de datos eQTL IGW (<http://www.gtexportal.org/home/>) o en la base de datos Haplogreg

Análisis de interacción SNP-SNP

Las interacciones entre SNPs se realizaron mediante el algoritmo MDR (*Multifactor dimensionality reduction*)^{266,267}. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando el valor de $P < 0.05$ y estos resultados fueron validados mediante un test de permutaciones. Las interacciones fueron representadas gráficamente en un dendograma de interacciones, de acuerdo al método de Moore y colaboradores²⁶⁶

3.2. Resultados

Este estudio de casos-controles se llevó a cabo en 834 pacientes hematológicos y sus características clínicas y demográficas se resumen en la Tabla 2. Los pacientes con AI y los pacientes sin AI tenían una edad similar pero los hombres presentaban una mayor tendencia a desarrollar AI en comparación con las mujeres (ratio hombres / mujeres = 1.86 vs. 1.18, $P = 0.015$). Los pacientes que recibieron TPH-Alo eran numerosos y se encontraban distribuidos de forma homogénea entre pacientes AI y no AI (45.85 vs 45.49%), la enfermedad de base de los pacientes (enfermedad hematológica) también se encontraba distribuida uniformemente entre ambos grupos de pacientes (Tabla 2). Como era de esperar, pacientes sin profilaxis presentaban una mayor tendencia a desarrollar AI que en comparación con aquellos pacientes que recibían tratamiento profiláctico antifúngico (23.28 vs 14.51%; Tabla 2).

Todos los SNPs evaluados se encontraban en HWE en la población control a excepción del polimorfismo $REL_{rs13031237}$ que fue excluido de los análisis de asociación (no-AI; $P < 0.001$). Los análisis de regresión logística fueron ajustados por: edad, género, país de origen, TPH-Alo y enfermedad de base, ninguno de los SNPs seleccionados mostraron asociación con el riesgo a desarrollar AI de acuerdo a los modelos de herencia codominante, dominante, recesivo y log-aditivo (Tabla 3). Aunque los datos de profilaxis estaban solo disponibles en una parte de la población ($n = 618$), no se observaron cambios cuando esta variable clínica fue incluida como covariable de ajuste (datos no mostrados). Realizamos un análisis estratificado por trasplante donde se consideraron los genotipos de los donantes y los casos de AI post-trasplante y no encontramos ninguna asociación estadísticamente significativa entre el riesgo a desarrollar AI y los polimorfismos de $NFKB1$, $NFKB2$, $RelC$, $RelB$ e $IRF4$ (Tabla 4). A pesar de que nuestro poder estadístico era limitado (tabla 1, material suplementario), observamos una asociación entre los portadores del genotipo $IRF4_{rs1220592_T/T}$ con el riesgo a desarrollar AI. Los portadores de este genotipo mostraban seis veces más riesgo de desarrollar la infección que los portadores del alelo WT $IRF4_{rs1220592_C}$ ($OR_{REC} = 6.24$, IC 95% 1.25 – 31.2, $P = 0.026$). Curiosamente encontramos que los portadores del alelo $IRF4_{rs12203592_T}$ mostraban una asociación con una menor

expresión de RNAm del gen correspondiente en muestras de sangre de pacientes y en linfocitos inmortalizados con VEB (Virus Epstein-Barr) ($P = 6.0 \cdot 10^{-7}$ y $P = 3.0 \cdot 10^{-7}$, respectivamente), lo que sugería un posible papel funcional de este polimorfismo. Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos investigar el posible impacto funcional de este SNP utilizando las bases de datos Haploreg y ENCODE. Estos análisis nos mostraron que esta variante genética IRF4_{rs12203592} se encontraba cerca de un promotor, lo que nos hace pensar que podría tener un efecto regulador del gen IRF4. Además, este análisis mostraba que este polimorfismo intrónico producía alteraciones en los sitios de unión de los factores de transcripción de los genes NFκB, HDAC2, y HMG-YG, pudiendo producir una alteración en la transcripción de estos genes relacionados con la respuesta inmune innata y adaptativa^{268,269}. A pesar de nuestras hipótesis sobre que esta variante génica IRF4_{rs12203592} podía modular el riesgo a desarrollar AI a través de la regulación de la expresión del RNAm, la asociación del SNP con el riesgo a AI no superó la corrección del test de variaciones múltiples ($P = 0.001$; Tabla 4) y por lo tanto requiere un estudio más profundo. Análisis de haplotipos mostraron los haplotipos IRF4_{AATC} y IRF4_{GGTC} (no incluyen el alelo de riesgo IRF4_{rs12203592_T}) asociados a protección frente al riesgo de AI. Sin embargo esta asociación mostraba una magnitud muy similar a la asociación del análisis del SNP IRF4_{rs12203592} (OR = 0.28, IC 95% 0.08-0.95, $P = 0.042$ y OR = 0.04, IC 95% 0.00 – 0.71; Tabla 5) De modo que estos resultados sugieren que el efecto de este haplotipo en realidad es debido a la variante intrónica.

Dado que la vía de activación del NFκB es una vía compleja (p50/p65, p52/RelB y p65-c-Rel) y teniendo en cuenta el papel que desarrolla el complejo P52/RelB en la activación transcripcional del IRF4²⁷⁰. Decidimos investigar si existía alguna interacción entre los SNPs de NFκB que modificara el riesgo a AI. Análisis con MDR evaluaron todas las posibles combinaciones entre los SNPs relacionados con NFκB (Tabla 6 y Figura 1). El mejor modelo de interacción encontrado entre los SNPs REL_{rs842647}, NFκB2_{rs1056890}, IRF4_{rs7768807} y REL_{rs13017599} mostraba un incremento sinérgico a el riesgo de desarrollar AI (TA = 0.5488, $P_{\text{sign}} = 0.0010$). Aunque este fue el mejor modelo y mostraba un valor de consistencia alto(CVC, *cross validation consistency*) de 9 sobre 10, sin embargo su test de permutaciones no fue estadísticamente significativo ($p = 0.31$), lo que nos confirmaba la falta de solidez del modelo. También encontramos un modelo de interacciones entre los SNPs NFκB2_{rs1056890} y IRF4_{rs7768807} que incrementaba el riesgo a desarrollar la infección (TA = 0.5353, $P_{\text{sign}} = 0.0010$) pero este modelo de interacción tampoco superó la significación estadística del test de permutaciones ($P = 0.47$; Tabla 6). Ninguno de estos modelos incluía el SNP IRF4_{rs12203592}.

4. Artículo Cuarto

4.1 Justificación del diseño y breve descripción de los resultados

4.1.1 Diseño y población de estudio

La población de estudio incluyó 1251 individuos de origen europeo: 77 pacientes hematológicos diagnosticados con IA probada o probable de acuerdo a los criterios revisados de la EORTC/MSG⁷⁵, 387 pacientes hematológicos sin signos de infección y 787 controles sanos. Los pacientes hematológicos eran pacientes sometidos a TPH-Alo o diagnosticados de LMA o LLA bajo tratamiento intensivo de quimioterapia, estos individuos provenían del consorcio AspBIOmics (<http://www.aspbionics.eu/>), de dos instituciones médicas españolas (Hospital Universitario de Salamanca y Hospital Clínico Universitario de Valencia) y de un ensayo clínico multicéntrico español (PCRAGA, EU clinical trial number: 2010-019406-17). De acuerdo con la declaración de Helsinki, todos los participantes dieron su consentimiento informado para participar en el estudio y los comités éticos de todos los centros participantes aprobaron el estudio: Hospital Universitario Virgen de las Nieves(Granada, España); Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca, España); Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, España); Hospital Clínico Universitario de Valencia (Valencia, España); Centro Nacional de Microbiología, Instituto Nacional Carlos III (Madrid, España); Universidad de Minho (Braga, Portugal); Universidad de Würzburg (Würzburg, Alemania); y la universidad Médica de Innsbruck (Innsbruck, Austria). El ensayo clínico PCRAGA está registrado en ClinicalTrials.gov (NCT01742026) y EudraCT (2010-019406-17).

4.1.2 Metodología aplicada

Genotipado

El ADN genómico de pacientes hematológicos de alto riesgo a AI y controles sanos, fue genotipado con el Inmunochip[®] de Illumina, un chip personalizado que incluye 196.524 variantes génicas y proporciona una alta densidad en 186 genes relacionados con el sistema inmune. Los genotipos fueron analizados con el software GenomeStudio Data Analysis software utilizando el ensamblaje NCBI 36 (hg18) mapping. Se realizó un filtrado de calidad utilizando PLINK v.1.07²⁷¹ y siguiendo los criterios nombrados a continuación: 1) porcentaje de genotipado mínimo por muestra del 90% (9 casos de AI, 30 pacientes sin AI y 5 controles sanos fueron excluidos del análisis; 2) porcentaje de genotipado

mínimo por SNP del 98%; 3) umbral de frecuencia alélica de 0.01; 4) valor de HWE para los casos de $P < 0.001$ y $P < 0.01$ para los controles.

Población de replicación

Para validar nuestros resultados, utilizamos una población de replicación formada por 473 pacientes hematológicos, de los cuales 93 eran AI probada / probable y procedían de una institución española (Hospital Universitario Virgen de las Nieves) y dos instituciones italianas (Universidad católica del S. Corazón, Roma; Y universidad de Módena y Reggio Emilia, AOU Policlínico, Módena). Los comités éticos de ambas instituciones fueron proporcionados. Con el fin de replicar nuestros mejores resultados, obtuvimos una puntuación para cada marcador evaluando los siguientes criterios: 1) la asociación con el riesgo a AI en el análisis de AI frente a no AI; 2) la asociación con el riesgo a AI en el análisis de AI frente a los controles; 3) funcionalidad potencial según las bases de datos Regulome y Haploreg. La fase de replicación se realizó con sondas Kaspar[®], en placas de 384 pocillos y en termocicladores Eppendorf Martercycler[®] (Eppendorf, Hamburg, Germany) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Como controles de calidad fueron incluidas un 5% de las muestras por duplicado cuya concordancia entre duplicados fue superior al 99%. El porcentaje de genotipado para todos los SNPs replicados fue $\geq 90\%$.

Análisis de asociación

Se seleccionaron para el análisis de marcadores genéticos independientes ($r^2 < 0.2$) con una diferencia máxima en las frecuencias alélicas de Hapmap considerando las subpoblaciones CEU, CHB y YRB. Un primer análisis de componentes principales (sin threshold para sigma) mostró que, a excepción de cuatro controles que fueron eliminados del análisis, todas las muestras eran de ascendencia europea. A continuación, realizamos un análisis de componentes principales utilizando 28944 marcadores independientes ($r < 0.2$) llevado a cabo con smartpca, EIGENSOFT 4.0 beta package 2⁷². Un set de 25 muestras (1 caso de AI y 24 controles) fueron detectados como “outliers” usando un valor de sigma de 6. Dichos individuos fueron excluidos del análisis. El análisis de asociación se realizó mediante regresión logística corregida por estratificación con los 2 componentes principales. Se eliminaron muestras duplicadas o emparentadas del análisis mediante una selección aleatoria de una muestra cada dos muestras emparentada con PLINK v.1.07 considerando un $\hat{\pi} > 0.4$ (3 muestras fueron eliminadas; 1 caso de AI y 2 controles sanos)

Análisis estadístico

El set final de datos incluyó 124093 marcadores de 1179 individuos: 66 casos de AI y 357 pacientes sin signos de infección y 756 controles sanos. El análisis de asociación alélica se realizó con un modelo de regresión logística aditiva tomando como referencia el alelo de menor frecuencia y corrigiendo por estratificación con los 2 componentes principales. Se llevaron a cabo dos análisis de asociación de casos-controles: 1) casos de AI frente a casos no AI y 2) Casos AI frente a controles sanos.

Meta-análisis

Realizamos un meta-análisis con los datos genéticos obtenidos del inmunochip y con los datos obtenidos de la replicación, siguiendo un modelo de herencia aditivo. Utilizamos el estadístico I² para evaluar la heterogeneidad de los estudios incluidos en el meta-análisis y computamos la OR global asumiendo un modelo de efectos aleatorios. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software STATA (v.12) para MAC.

Aislamiento y diferenciación celular

Una vez obtenido el consentimiento informado de cada participante (protocolos PI12/02688 y SECVS 014/2015), se realizó el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y monocitos de sangre de dichos sujetos. Los PBMCs fueron aislados por centrifugación de gradiente usando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences) y a continuación, los monocitos fueron aislados por selección inmunomagnética de células CD14⁺ (Miltenyi Biotec). La pureza de la población CD14⁺, fue medida y comprobada por inmunofluorescencia mediante técnicas de separación por sorting. Una vez asegurada la pureza de los monocitos, estos fueron plaqueados con una densidad de 5×10^5 células/ml en platos de 24 pocillos. Posteriormente fueron cultivados durante 7 días en medio de cultivo RPMI, suplementado con suero humano y 20ng/ml de GM-CSF, de manera que se lleva a cabo la diferenciación a macrófagos. El medio de cultivo fue cambiado cada tres días aproximadamente. A continuación se llevó a cabo el genotipado de los polimorfismos asociados con susceptibilidad a AI, y tanto los PBMCs como los monocitos fueron agrupados de acuerdo al genotipo de interés.

Ensayos de actividad fungicida

Los macrófagos obtenidos de la derivación de monocitos humanos, serán infectados con conidios de *Aspergillus fumigatus* con una ratio de 1:10. Para medir la capacidad fungicida de los macrófagos, estos estarán en contacto con los conidios durante 2 horas. A continuación se realizarán diluciones seriadas de los lisados de

macrófagos, serán plaqueados en medios de crecimiento sólido y se mantendrán en incubación durante 2 días. Una vez transcurridos los 2 días, se calculará el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y el porcentaje de inhibición de UFC.

Ensayos de estimulación *in vitro* de PBMCs

Estos ensayos fueron realizados en PBMCs de donantes sanos. Los PBMCs fueron seleccionados en función de los genotipos de ARNT2_{rs1374213} y CX3CR1_{rs9823718}, y fueron cultivados a 37°C, 5% de CO₂ y en 2 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado con calor y con una mezcla antibiótica que contenía penicilina, estreptomina y neomicina (Gibco®/Life Technologies). Los PBMCs de sujetos sanos portadores de los diferentes genotipos fueron incubados solo con zymosan (5µg/ml) o en combinación con lipopolisacárido (LPS; 100ng/ml). A continuación fueron medidos por triplicado los niveles de las interleuquinas: IFN γ , IL12p70, IL6, IL8, IL10 y TNF α utilizando el kit Procartaplex multiplex immunoassay (Affymetrix / eBioscience) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Todos los sobrenadantes tras el periodo de incubación fueron almacenados a -80°C hasta ser procesados para la medición de las citoquinas.

Lavado broncoalveolar (LBA)

Las muestras de LBA de pacientes con AI se recogieron mediante técnicas estandarizadas en clínica utilizadas ante la sospecha de infección. Los LBAs se obtuvieron por instilación de 2 x 20ml de solución salina estéril al 0.9% en el bronquio más periférico del lóbulo radiológicamente más afectado. Las muestras de LBAs tenían tasas de recuperación comparables, procedían de pacientes no fumadores a largo plazo y sin ninguna otra enfermedad asociada a los pulmones y además procedían de pacientes con regímenes similares, todo esto de acuerdo a las normas de estandarización de la Sociedad Respiratoria Europea para medidas de componentes acelulares. Después de una cuidadosa aspiración, los LBA se centrifugan a 3.000rpm durante 5min a 4°C para eliminar posibles restos celulares. Y a continuación todas las muestras se almacenaran a -80°C hasta su uso.

Análisis eQTL

Utilizamos las bases de datos Haploreg (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) y ENCODE (<https://genome.ucsc.edu/ENCODE/>) para predecir el papel funcional de los SNPs de interés. Además evaluamos si los SNPs asociados con el riesgo a AI obtenidos del meta-análisis correlacionaban con los niveles de expresión de su respectivo RNAm en PBMCs (<http://genenetwork.nl/bloodseqtlbrowser/>).

4.2 Resultados

Este estudio se realizó en dos fases. En la primera fase del estudio participaron 1179 individuos (66 casos de AI, 357 no AI y 756 controles sanos) de origen europeo. Debido a las limitaciones estadísticas a las que nos enfrentamos a la hora de detectar asociaciones a nivel del genoma ($P < 5,0 \cdot 10^{-8}$) cuando comparamos la cohorte de casos de AI probada/probable frente a casos no AI, decidimos realizar 2 análisis de asociación: En primer lugar realizamos una comparación de los casos de AI con una cohorte de referencia formada por 756 controles sanos y, después, una comparativa entre los casos de AI y los casos sin infectar. Este enfoque heurístico se basa en la suposición de que los SNPs implicados en la determinación del riesgo a AI deben estar enriquecidos en los casos de AI en comparación con los pacientes no infectados pero, además, con la población general. Los marcadores más prometedores, es decir, aquellos que mostraban unos valores más bajos de significación y que tenían una posible función biológica de acuerdo a las bases de datos públicas, fueron replicados en una población de 473 individuos (93 AI y 380 no AI; Tabla 1).

Tras un estricto filtrado de los datos del Immunochip obtuvimos 124.093 SNPs para realizar análisis de regresión logística. El 95% de las muestras cumplieron los criterios de calidad con un porcentaje de genotipado mayor del 0.99%. Identificamos 12 regiones genéticas del sistema inmune asociadas con el riesgo a desarrollar AI (Tabla1). Aunque no superaban el “*threshold*” de significación para asociaciones a nivel del genoma ($P < 5,0 \cdot 10^{-8}$). Estas regiones incluían diferentes *loci* con funciones implicadas en la modulación del sistema inmune (ARNT2, CX3CR1, IL2/IL12, IL18RAP, NOS2A, PSMB7, SERPINA9 y TNFSF15). Los análisis también identificaron varios marcadores asociados con el riesgo a AI localizados cerca o en *loci* con funciones desconocidas (HIBCH, PSORS1C2, RAD51L1 y TMEN171/TMEN174). El análisis de inflación genómica λ reveló valores menores de 1.1 tanto en la fase 1 como en la 2 lo que demostraba que no existía estratificación en las poblaciones analizadas y que, por tanto, las asociaciones observadas probablemente eran verdaderas.

Debemos además destacar que cuando llevamos a cabo la replicación de estos 12 polimorfismos en una población independiente, observamos que los portadores de los alelos ARNT2_{rs1374213G} y CX3CR1_{rs9823718C} mostraban una mayor asociación al riesgo de desarrollar la infección que los portadores de los alelos más comunes (Tabla 1). La dirección del efecto de estos SNPs era muy similar tanto en la fase 1 del estudio como en la fase de replicación, y el análisis combinado de ambas fases nos mostró que cada copia del alelo menos frecuente para ARNT2 y CX3CR1 se asociaba con un mayor riesgo a desarrollar AI (de 1.6 a 1.8 veces más de riesgo) (Tabla 1). El análisis combinado de estas dos fases también reveló unas

asociaciones algo más débiles pero potencialmente interesantes para dos SNPS dentro o cerca de los genes IL18RAP y PSMB7, aunque estas asociaciones deberán ser validadas. Ninguno de estos marcadores mostró una heterogeneidad estadísticamente significativa en el meta-análisis, lo que confirmó la solidez de nuestros resultados.

Considerando la novedad de estos resultados, decidimos evaluar las posibles consecuencias funcionales de los SNPs en los genes ARNT2 y CX3CR1 en la modulación de la respuesta del sistema inmune innato o adaptativo frente a *AF*. Curiosamente, observamos que los MDM de individuos sanos portadores del genotipo ARNT2_{rs1374213_GG} mostraban una peor capacidad fungicida frente a *AF* en comparación con los portadores del alelo ARNT2_{rs1374213A} (56,6% vs 47,0%, $P=0.039$) o en comparación con el genotipo AA (57.9% vs 43.6%, $P=0.040$, Figura 2A). En consonancia con esta observación, también encontramos que las muestras de los LBAs de pacientes con AI y portadores del genotipo ARNT2_{rs1374213GG} mostraban una menor liberación de IL1 β significativamente estadística y una exacerbada producción de IL8 en comparación con aquellos pacientes de AI portadores del alelo ARNT2_{rs1374213_A} ($P=0.042$ y $P=0.0061$, respectivamente; Figura 2B y Figura 2C). Sin embargo, también observamos que en ensayos bajo condiciones de estimulación con zymosan durante 24h o 48h, los PBMCs de individuos portadores del genotipo ARNT2_{rs1374213GG} mostraban un aumento significativo de la producción de TNF α e IFN γ en comparación con los PBMCs de individuos portadores del alelo ARNT2_{rs1374213A} ($P_{\text{TNF}\alpha\text{-LPS}(24\text{h})}=0.017$, $P_{\text{TNF}\alpha\text{-ZYM}(24\text{h})}=0.068$, $P_{\text{TNF}\alpha\text{-LPS+ZYM}(48\text{h})}=0.001$ y $P_{\text{IFN}\gamma\text{-LPS}(48\text{h})}=0.042$, $P_{\text{IFN}\gamma\text{-ZYM}(48\text{h})}=0.045$, $P_{\text{IFN}\gamma\text{-LPS+ZYM}(48\text{h})}=0.040$; Figura 2D y 2E). Por otro lado, aunque no pudimos detectar ninguna diferencia en la capacidad fungicida de MDM de individuos portadores de los diferentes genotipos de CX3CR1_{rs9823718}, se observó que en las muestras de LBAs de pacientes de AI portadores del alelo CX3CR1_{rs9823718A} existía una liberación disminuida de IL8 estadísticamente significativa ($P=0.019$), mientras que los MDM de individuos portadores de este mismo alelo también mostraban una disminución significativa de la producción de IL1 β y/o TNF α tras el co-cultivo con conidios de *AF* durante 24h ($P=0.0012$ y $P=0.0028$, respectivamente). No se observaron diferencias significativas en la producción de citoquinas en los PBMCs de sujetos sanos portadores de los diferentes genotipos de CX3CR1_{rs9823718} tras la estimulación con Zymosan durante 24h o 48h (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Aspergillus ssp es un hongo ubicuo que causa Aspergilosis Invasiva, una infección caracterizada por la invasión de las hifas y la destrucción masiva del tejido pulmonar. Aunque se han desarrollado nuevas y diferentes terapias anti-fúngicas, la AI es la mayor causa de mortalidad relacionada con infección en pacientes inmunodeprimidos con una tasa del 50%³¹ y que alcanza una especial gravedad en pacientes sometidos a trasplante alogénico de médula ósea donde la mortalidad se eleva hasta el 90%³⁴.

El principal tratamiento para la AI lo constituyen fármacos como el Voriconazol, la Anfotericina B y la Caspofungina que han dado lugar a notables resultados en pacientes oncohematológicos inmunodeprimidos y neutropénicos. La experiencia clínica con el tratamiento con anti-fúngicos (fundamentalmente Voriconazol) ha demostrado que existe una notable diferencia de eficacia entre diferentes pacientes con similares condiciones clínicas. Aunque la mayoría de los pacientes tratados muestran una remisión completa o parcial de los síntomas clínicos tras su administración, una gran parte de los pacientes muestran refractariedad al tratamiento. Esto parece indicar que puedan existir diferencias genéticas que determinen una mayor susceptibilidad a la enfermedad en algunos pacientes y, por tanto, que condicionen la respuesta frente al tratamiento anti-fúngico. La identificación de SNPs funcionales en genes que regulan la respuesta inmune innata o adaptativa y que determinan el grado de susceptibilidad de cada paciente a AI puede ayudar a establecer un tratamiento farmacológico más personalizado y efectivo y obtener una mayor y mejor respuesta clínica.

Para ello, se plantea la elaboración de esta investigación que se basa en el estudio de polimorfismos genéticos a gran escala y el desarrollo de ensayos funcionales para la identificación de biomarcadores genéticos en genes del sistema inmune innato y adaptativo que, según nuestra hipótesis, condicionan el grado de susceptibilidad a AI e incluso el grado con el que los pacientes responden a la terapia.

1. Impacto de los polimorfismos genéticos de la vía Th17 en la predisposición a AI

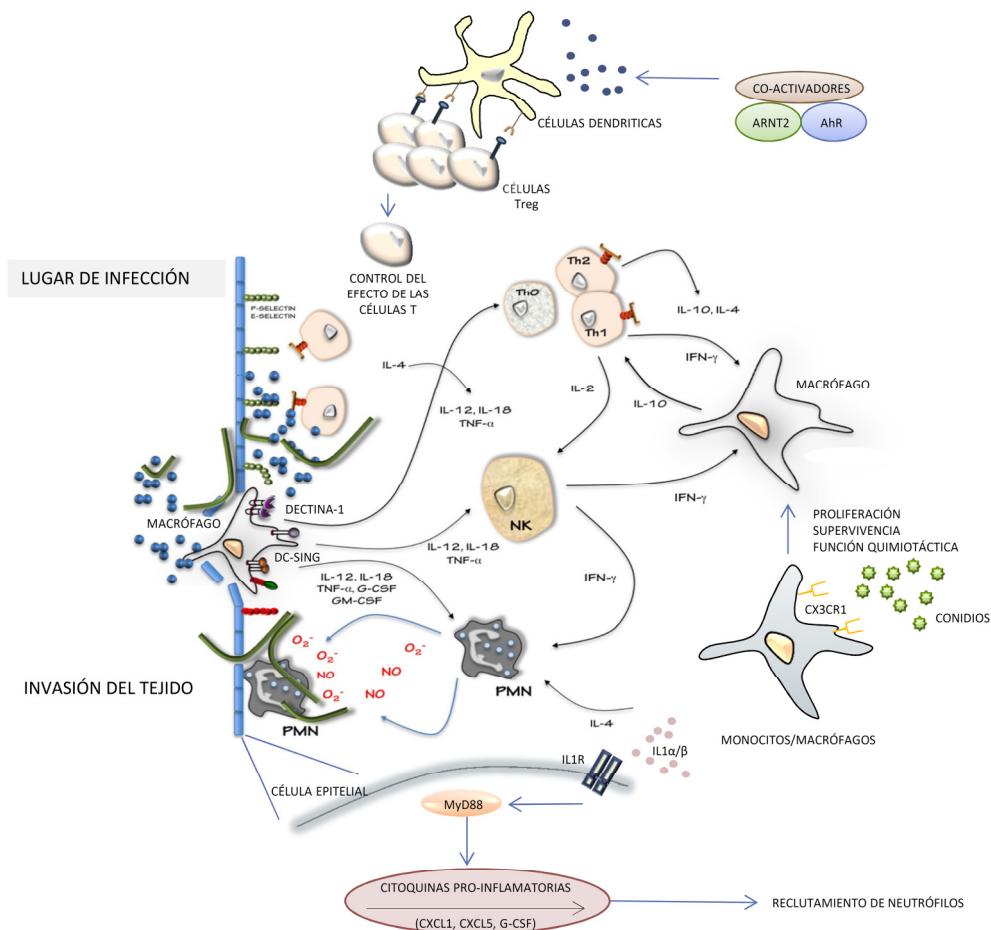
Las marcadas diferencias en el grado de susceptibilidad a AI que presentan los pacientes hematológicos (con o sin TPH-alo) sugieren que la presencia de polimorfismos genéticos en genes del sistema inmune así como la existencia de ciertos factores ambientales del hospedador puede influir en el riesgo a desarrollar la infección^{273,274}. Los estudios en genética de poblaciones han apoyado esta hipótesis^{50,219,236,275,276}.

En este trabajo se ha estudiado la influencia de tagging SNPs en los genes DC-SIGN, Dectin-1, Dectin-2, CCL2/MCP-1 y CCR2 en la susceptibilidad a desarrollar AI en una población española. Los polimorfismos en estos genes han sido descritos como asociados a la influencia a desarrollar un elevado número de enfermedades infecciosas como el VIH-1²⁷⁷⁻²⁷⁹, HTLV-1²⁸⁰, CMV²⁸¹, la tuberculosis²⁸²⁻²⁸⁵, el VHC^{286,287}, VHB²⁸⁸, el dengue²⁸⁹ y el SARS²⁹⁰ entre otras, evidenciando su potencial papel en la defensa contra patógenos.

En el presente estudio, se encontró que polimorfismos en Dectin-1 (rs3901533 y rs7309123) y DC-SIGN (rs4804800, rs11465384, rs7248637 y rs7252229) se asocian a un mayor riesgo a desarrollar AI, lo que apunta a la participación de estos genes en los mecanismos patogénicos de esta infección fúngica invasiva (Figura 11). Pacientes portadores de los alelos Dectin-1_{rs3901533C}, Dectin-1_{rs7309123G} y DC-SIGN_{rs4804800G} mostraron significativamente un mayor riesgo a padecer la AI. Pacientes portadores de estos alelos tenían de 2 a 6 veces mayor riesgo de desarrollar la infección que aquellos que llevaban el alelo ancestral. De forma similar, los pacientes portadores de los alelos DC-SIGN_{rs11465384T}, DC-SIGN_{rs7248637A} y DC-SIGN_{rs7252229C} mostraron dos veces más riesgo que los pacientes con el alelo ancestral. Aunque no fue estadísticamente significativo, este estudio además encontró que el SNP DC-SIGN_{rs2287886} mostraba una tendencia protectora, es decir, a estar asociado con un menor riesgo de padecer la infección. Curiosamente, este último hallazgo confirmó resultados previos del grupo utilizando los criterios de clasificación de la EORTC/MSG de 2008²⁹¹. El aparente efecto de estos SNPs en la susceptibilidad al AI, se mantuvo incluso después de ajustar por edad, sexo, neoplasia hematológica y varios factores de riesgo para AI (HSCT, neutropenia, usar la terapia de la EICH y corticoides), lo que indicaba que estas variantes en los genes de Dectin-1 y DC-SIGN contribuyen de forma independiente al riesgo a desarrollar la infección. No obstante, los mecanismos moleculares subyacentes a estos efectos aún se desconocen.

Con el fin de investigar la funcionalidad de las variantes de Dectin-1 y DC-SIGN, se decidió comprobar si dichos polimorfismos estaban involucrados en la interrupción de la unión a sitios de reconocimiento para factores de transcripción que pudiera influir en el nivel de transcripción de los mencionados genes. El análisis predictivo con la herramienta FastSNP reveló que ninguno de estos SNPs modificaba significativamente la actividad transcripcional lo que sugería que estudios adicionales *in vitro* serán necesarios para confirmar el papel biológico de dichos polimorfismos. Sin embargo, es importante además destacar que no se puede descartar la posibilidad de los polimorfismos estudiados puedan estar en desequilibrio de unión con variantes funcionales no identificadas hasta la fecha y que puedan ser responsables de las asociaciones observadas.

Figura 11. Principales marcadores y vías inmunológicas implicados en la respuesta frente a *Aspergillus Fumigatus*.



Cuando los conidios son inhalados y llegan al pulmón son reconocidos de manera inmediata por los MA. El reconocimiento de los conidios está mediado por Dectina-1, DC-SIGN y los TLRs y conduce a la liberación de IL12, IL18 y TNFα dando lugar a la estimulación de las células NK que liberan IFNγ potenciando de esta manera la vía Th1. CX3CR1 se expresa en fagocitos, principalmente en macrófagos y CD, facilitando el reconocimiento de los patógenos fúngicos y está implicado en la proliferación y supervivencia de los macrófagos así como en la regulación de la producción de las citoquinas y quemoquinas. Los mediadores pro-inflamatorios inducidos por los MA y las CE, reclutan neutrófilos al lugar de la infección y éstos utilizan sus mecanismos oxido-dependientes (produciendo ROS) para inactivar a los conidios y a las hifas germinantes. ARNT2 forma un complejo con AHR que influye en la actividad y diferenciación de las CD que fagocitan y procesan los conidios, para una posterior presentación del antígenos a las células T, que a su vez activan la respuesta adaptativa. Además, ARNT2 está implicada en la diferenciación de las células Th0 a Th1 así como en la modulación del ciclo celular y la respuesta a compuestos químicos (mediante la regulación de las proteínas del citocromo P450).

Aunque el Dectin-1 Y238X (rs16910526) SNP ha sido descrito como un marcador asociado a un mayor riesgo de infección de AI en pacientes con TPH²³⁶, recientemente dicha observación no ha podido ser confirmada²³⁷. En este estudio, dichos hallazgos no pudieron ser corroborados incluso cuando el análisis estadístico se realizó separadamente en pacientes con y sin TPH.

Platinga y colaboradores (2009) y Cunha y colaboradores (2010) además sugirieron que los pacientes portadores del polimorfismo Y238X en el gen Dectin-1 tenían más probabilidades de ser colonizados por especies de *Aspergillus* y *Candida*^{236,292} en comparación con aquellos que contenían el alelo ancestral. Sin embargo, todos estos estudios se han realizado en cohortes relativamente pequeñas, por lo que estudios adicionales en poblaciones de mayor tamaño serán necesarios para establecer de forma definitiva el papel de esta variante en la susceptibilidad a las infecciones fúngicas invasivas.

Otro hallazgo interesante de este estudio fue el porcentaje significativamente más alto de GM positivos en pacientes portadores del alelo Dectin-1_{rs3901533_T} que aquellos portadores del alelo ancestral. Por otro lado, los pacientes portadores del genotipo Dectin-1_{rs7903123_G/G} mostraban un mayor porcentaje de GM positivos que aquellos que llevaban el alelo C (C/C+C/G). No se encontró correlación entre los polimorfismos en DC-SIGN y el porcentaje de GM positivos. Estos datos apoyan la hipótesis de que el gen Dectin-1 más que DC-SIGN puede contener las variantes causantes que determinan un mayor riesgo de infección de AI.

En conclusión, este estudio proporciona las primeras evidencias de asociación entre los polimorfismos Dectin-1 y DC-SIGN y la infección de AI. Estos genotipos pueden determinar la susceptibilidad a la infección por AI a través de la regulación del reconocimiento de *Aspergillus*, o a través del control en el desencadenamiento de la respuesta inmune mediada por células Th1 y Th17. Estudios adicionales con poblaciones más grandes son necesarios para determinar los efectos de estos polimorfismos en la susceptibilidad a la infección de AI.

2. Papel de los polimorfismos genéticos de la vía Th1 y Th2 en la determinación del riesgo a desarrollar AI

En este trabajo hemos observado una asociación entre variantes genéticas en los genes IL4R, IL8, IL12B e IFN γ y la susceptibilidad a desarrollar AI (Figura 11). Los portadores de los genotipos IL4R_{rs2107356A/A} e IL8_{rs2227307G/G} mostraron un mayor riesgo a desarrollar la infección, mientras que los pacientes portadores de los alelos IL12B_{rs3212227C} e IFN γ _{rs2069705C} mostraban un menor riesgo a desarrollar AI que los portadores de los alelos o genotipos más comunes. Aunque ninguna de estas asociaciones superó el test de comparaciones múltiples, las asociaciones de los

polimorfismos IL4R_{rs2107356} e IFN γ _{rs2069705} se mantenían cerca del límite de significación (asociación marginal) en los pacientes sometidos a TPH, lo cual nos indicaba un impacto de estas variantes sobre la susceptibilidad a desarrollar AI, particularmente en la población con una inmunosupresión más severa. Basándonos en estos resultados pero además en aquellos que muestran una asociación de los polimorfismos en IL4R, IL8, IL12B e IFN γ con el riesgo de AI en el total de la población ($P \leq 0.05$), parece plausible sugerir que estos polimorfismos puedan afectar a la función de los genes y, por tanto, modular el riesgo a desarrollar la infección. Nuestro grupo se basó en la hipótesis de que los polimorfismos IL4R_{rs2107356} e IFN γ _{rs2069705}, ambos localizados en la región promotora de sus respectivos genes, podían afectar a la expresión del gen y, por tanto, modular los niveles de IL4 e IFN γ que son importantes mediadores de la respuesta inmune frente a *Aspergillus*. De igual modo, podemos pensar que los polimorfismos intrónicos IL8_{rs2227307} e IL12B_{rs3212227} pueden estar afectando el *splicing* del RNAm e incluso alterando la expresión del RNAm de sus respectivos genes y de este modo desregulando importantes mediadores (IL8 e IL12) de la vía Th1 responsable de la respuesta inmune contra los patógenos fúngicos. En la misma línea que nuestras hipótesis, se han publicado varios estudios que confirman la asociación de estos polimorfismos con enfermedades inmunológicas^{293,294} e infecciones²⁹⁵⁻²⁹⁸, incluida AI²²⁰. En particular Mezger y colaboradores han publicado previamente la asociación entre el polimorfismo IFN γ _{rs2069705} y el riesgo a AI²²⁰. Lo cual apoyaba nuestra hipótesis de que este polimorfismo jugaba un papel regulador importante en la respuesta inmune contra el hongo.

Estudios recientes tanto en humanos como en modelos animales han confirmado que IL4/IL4R, IL8, IL12 e IFN γ juegan un papel importante en la AI^{181,205,208,299,300}. En particular IFN γ , ya que su producción¹⁹² o su administración terapéutica²⁰⁸ incrementa la producción de radicales libre y la respuesta de los neutrófilos, los cuales median el daño de las hifas del hongo y la resistencia frente a la infección³⁰¹. También ha sido demostrado que las CE y CD producen IL8 e IL12p70 en respuesta a la unión con conidios fúngicos, de manera que median la respuesta inmune Th1 frente al hongo^{43,181,302} y además incrementan la resistencia a AI²⁰⁵. Mientras que la neutralización de esta vía Th1 produce un aumento en la susceptibilidad a AI^{303,304}. La IL12p70 también media la actividad citotóxica de las células NK y de las células T CD8⁺ y promueve la secreción de IFN γ por células T CD4⁺, lo cual es un proceso esencial para un aclaramiento eficaz de las esporas inhaladas de *AF*. Por otro lado, la secreción de IL4 activa³⁰⁵ la respuesta inmune de las células T CD4-Th2 y esto conduce a una disminución de la respuesta inmune Th1 y, en consecuencia, un aumento de la susceptibilidad a la infección por *Aspergillus*^{304,306}. De igual forma, también se ha demostrado que la falta de citoquina IL4 aumenta la respuesta inmune de la vía Th1 caracterizada por una alta producción de IL12 y una producción por los linfocitos T de IFN γ mejorada y

mediada por IL12. Lo que conduce a un aumento de la resistencia a desarrollar la infección³⁰⁴.

Teniendo en cuenta estos resultados y con el fin de caracterizar mejor la función de los polimorfismos de IFN γ , IL4R, IL8 e IL12B en la modulación de la respuesta inmune frente a antígenos fúngicos y/o moléculas estimuladoras, llevamos a cabo ensayos funcionales en PBMCs y macrófagos derivados de monocitos de donantes sanos. Destacaremos el resultado encontrado en los sujetos portadores del alelo IFN γ _{rs2069705_C}, los cuales mostraban una mayor capacidad fungicida frente a *AF* en comparación con los portadores del alelo ancestral. Este resultado soporta nuestros datos genéticos, además de los publicados anteriormente y sugiere que este polimorfismo localizado en el promotor del gen, juega un papel fundamental en la modulación de la respuesta inmune frente a *Aspergillus* a través de la regulación de la expresión de RNAm de IFN γ . También tenemos que destacar que bajo condiciones de estimulación, los PBMCs portadores del alelo IFN γ _{rs2069705_C} mostraron una producción mayor de citoquinas, IFN γ Y TNF α que los sujetos portadores del alelo ancestral. Y por último, también correlacionaron los niveles de expresión de RNAm de IFN γ en PBMCs de donantes sanos con el SNP IFN γ _{rs2069705}. Lo que nos hace pensar que este polimorfismo u otro polimorfismo en LD con él, está involucrado no sólo en el control, sino también en la inducción de la producción de TNF α , por lo tanto, podemos sugerir que esta variante genética juega un papel central en la susceptibilidad a AI en pacientes trasplantados y pacientes de leucemia bajo tratamiento intensivo de quimioterapia.

Aunque nuestros datos genéticos sugieren que los polimorfismos IL4R, IL8 e IL12B influyen en el riesgo a desarrollar AI, los ensayos funcionales realizados no mostraron ninguna correlación entre estos SNPs y sus respectivos niveles de ARNm y/o proteína. Por lo tanto, esto sugiere que estas variantes probablemente ejercen su función biológica mediante la modulación de otros procesos biológicos, tales como: en el procesamiento del RNAm (*splicing* o *turnover*), en la estabilidad del ARNm o en la estructura secundaria del ARNm, así como afectar a nivel post-transcripcional. Por lo que necesitaremos estudios más profundos que sean capaces de identificar el papel funcional de estos SNPs en la determinación del riesgo de AI.

Por último, dado el efecto genético y/o funcional observado para las variantes de los genes: IFN γ , IL4R, IL8, IL12B y VEGFA, nos pareció interesante determinar la capacidad de estas variantes para predecir el riesgo de infección. Obtuvimos un modelo construido con los SNPs IL8_{rs2227307}, IL12B_{rs3212227}, IFN γ _{rs2069705} y VEGFA_{rs6900017} el cual mostró una mejora significativa en la capacidad de predicción de la enfermedad en comparación con un modelo de referencia que incluía solo datos demográficos y variables clínicas. Tenemos que destacar que cuando incluíamos un número similar de SNPs no significativos al modelo de referencia, no observamos ningún cambio significativo en la capacidad de

predicción, lo que confirmó que sólo un modelo construido con estos SNPs podría tener la capacidad de predecir la infección. En apoyo a estos datos, también observamos que la AUC de este modelo fue sistemáticamente superior a la AUC observada para 50.000 modelos itinerantes, lo que hace hincapié en la importancia de considerar los modelos de predicción como una ayuda en la toma de decisiones clínicas y en la mejora de estrategias para prevenir la recurrencia de AI.

Este estudio presenta ciertas fortalezas pero también algunas limitaciones. Algunos de sus puntos fuertes, consiste en que se trata de un estudio con un diseño multicéntrico con uno de los tamaños muestrales más grandes publicados hasta el momento y un elevado número de polimorfismos analizados. Esto nos permitió por primera vez realizar análisis de predicción que nos permitieron evaluar el potencial de las variantes genéticas en la predicción del riesgo a desarrollar AI. Algunas de las limitaciones a las que nos enfrentamos, consistían en la falta de disponibilidad sobre los datos de profilaxis antifúngica de un subgrupo de pacientes y de un número relativamente pequeño de caso pacientes AI probables que limitaron el poder estadístico del estudio. Para minimizar esta limitación, la mayoría de las asociaciones relevantes fueron validadas funcionalmente.

En resumen, nuestros datos sugieren que los polimorfismos en genes inmunomoduladores tienen un impacto sobre el riesgo a desarrollar AI y que el genotipado de estas variantes podría ayudar a predecir el riesgo a desarrollar la infección permitiendo así mejorar las estrategias de profilaxis o tratamiento con fármacos anti-fúngicos.

3. Implicación de las variantes genéticas de la vía NFκB en la predisposición a AI

La vía NFκB está implicada en una gran variedad de procesos entre los que se incluyen el recambio celular del sistema inmune³⁰⁷, el proceso de inflamación³⁰⁸, la diferenciación de las células T³⁰⁹ (Th1, Th2, Th17 y Treg), la maduración de las CD^{310,311}, la apoptosis celular^{312,313}, la adhesión celular^{302,314} y la angiogénesis³¹⁵. Ante la presencia de hongos patógenos tales como *AF*, la vía NFκB y los complejos NEMO-IKKα-IKKβ y NFκB-p50/p65 pueden ser activados a través de los PRRs tales como los TLRs³¹⁶⁻³¹⁸, los RLC^{146,319-322}, receptores de citoquinas³²³, receptores solubles como la PTX3¹²⁶ que permiten la secreción inmediata de citoquinas pro-inflamatorias (TNF, IL1α, IL1β, IL6, IL12)^{318,324}, quemoquinas (CCL2, CCL3, CXCL2 y CXCL10)^{325,326}, especies reactivas de oxígeno (ROS)^{302,321,327} y la expresión de receptores inmunes y moléculas de adhesión.

La vía NFκB además puede ser activada a través de receptores de lectinas tipo C (Dectina-1 y Dectina-2) que se unen a componentes fúngicos (PAMPS) o a través

de la activación mediada por ciertas citoquinas de la familia TNF (CD40L, BAFF, o LT- β) que se liberan ante la presencia del hongo activando la vía NF κ B no canónica (p52/RelB) que está implicada en la maduración de las células B y de las CD^{328,329} pero, además, en el desarrollo de las células $\gamma\delta$ Th17³³⁰. La vía NF κ B se encuentra implicada en la expresión de un rango amplio de genes del sistema inmune³³¹⁻³³³, en la formación del complejo CD30-p52/RelB-IRF4 que modula la proliferación celular²⁷⁰ y en la modulación mediada por IRF4 de las CD³³⁴ y la vía Th17 que determina la respuesta inmune frente a *Aspergillus*³³⁵.

Teniendo en cuenta el papel central de la vía PRRs-NF κ B e IRF4 en la respuesta inmune frente a *AF*^{309,335,336} y los estudios que sugieren que los factores genéticos del hospedador influyen en la susceptibilidad de este a desarrollar la infección^{273,337}, decidimos investigar la posible asociación entre las variantes genéticas de los genes NF κ B1, NF κ B2, RelA, RelB, Rel e IRF4 y el riesgo a desarrollar AI. A pesar del elevado número de estudios que han evaluado el efecto de polimorfismos en PRRs (TLR2, TLR4, TLR9, Dectin-1, Dectin-2, DC-SIGN, PTX3)^{49,51,103,105,224,231,234-236,238,241}, citoquinas (IL1, IL10, IFN γ)^{219,223,338}, y sus receptores (IL4R, TNFR1 y TNFR2)^{219,223,338} en la determinación de la susceptibilidad en infecciones fúngicas invasivas, hasta el momento no se ha evaluado el impacto de polimorfismos en la vía de NF κ B sobre el riesgo a desarrollar AI. Nuestros datos no mostraron asociaciones significativas entre los SNPs seleccionados y el riesgo a desarrollar AI. Aunque no alcanzaba significación estadística tras la corrección por el test de comparaciones múltiples, detectamos una asociación entre el polimorfismo IRF4_{rs12203592} y un aumento del riesgo a desarrollar AI en pacientes trasplantados. Estos datos junto con aquellos que suscriben el papel funcional de IRF4_{rs12203592} en la modulación de la expresión del ARNm del IRF4 sugieren su posible implicación de este polimorfismo en la modulación de la vía NF κ B²⁷⁰ y en las respuestas del sistema inmune dependientes de IRF4³³⁴. EL análisis de haplotipos mostró un efecto similar al encontrado en el análisis individual de polimorfismos lo que sugería que la magnitud del efecto era enteramente debida al IRF4_{rs12203592}. Además, cuando realizamos análisis de interacción SNPs-SNPs, no encontramos ningún modelo de interacción consistente asociado con el riesgo a desarrollar AI.

En resumen, este estudio de casos-controles no muestra ninguna asociación relevante entre las variaciones genéticas de los genes NF κ B1, NF κ B2, RelB, RelC e IRF4 y el riesgo a desarrollar la infección. Sin embargo, debido al limitado poder estadístico del análisis estratificado por trasplante (80% de poder para detectar una odds ratio de 2.1 con un $\alpha=0,001$) y las evidencias que apoyaban un papel funcional para IRF4_{rs12203592}, no podemos descartar un posible efecto de este polimorfismo sobre la susceptibilidad a AI en pacientes sometidos a TPH-Alo. Serán, por tanto,

necesarios estudios independientes para confirmar si el IRF4 puede tener un verdadero papel en la determinación a la susceptibilidad de AI.

4. Impacto de los polimorfismos analizados en el ImmunoChip® de Illumina sobre el riesgo a desarrollar AI

Hasta el momento este es el primer estudio GWA realizado en AI, y a pesar de que el tamaño de muestra de las poblaciones analizadas es relativamente pequeño, nuestros resultados han permitido identificar a ARNT2 y CX3CR1 como genes de susceptibilidad para la infección. (Figura 11)

El efecto de mayor se observó para un polimorfismo en ARNT2 que es un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 15 (15q25.1) y codifica para un miembro de la superfamilia de factores de transcripción “basic-helix-loop-Per-Arnt-Sim (bHLH-PAS) que forma heterodímeros con, entre otros, el receptor de hidrocarburos de arilo (AHR, aryl hydrocarbon receptor) que es un regulador clave de la respuesta del sistema inmune innato y que está implicado en la regulación de la expresión de un gran número de genes inmunomoduladores incluyendo varias citoquinas como IL1 β , IL2, TGF α y TGF β ^{339,340}. Además, se ha descrito que el complejo ARH/ARNT2 influye en la actividad y diferenciación de los macrófagos y linfocitos y sobre la desviación del balance Th1/Th2 hacia Th1³⁴¹⁻³⁴⁴. Estudios recientes además sugieren que este complejo es capaz de modular el ciclo celular y la respuesta a compuestos químicos a través del control de las enzimas del citocromo P450³⁴⁵⁻³⁴⁸. Aunque el papel específico de ARNT2 en la modulación de la función anti-fúngica de las células innatas continua siendo una incógnita, un estudio reciente ha demostrado que ARNT2 es una proteína de fase tardía de la respuesta frente a TNF que es inducida por IL10³⁴⁷ y, por tanto, podría jugar un papel en la modulación de la tolerancia inmunológica. Aunque algunos estudios han demostrado que la presencia de polimorfismos en la región de ARNT2 están implicadas en la patogénesis de ciertas enfermedades inmunológicas, hoy sabemos muy poco sobre el impacto que dichos polimorfismos tienen sobre las enfermedades infecciosas. En apoyo de los resultados que sugieren un papel de ARNT2 en la modulación y el control del sistema inmune innato, observamos que los macrófagos de los portadores del genotipo ARNT2_{rs1374213GG} mostraban una capacidad fungicida significativamente menor que los portadores del alelo A lo que, al menos en parte, podía deberse a una defectuosa producción de la IL1 β , una citoquina clave en la inducción de una respuesta mediada por fagocitos.^{349,350} A este respecto observamos que estos mismos macrófagos tenían una producción significativamente más elevada de IL8 que podría, además, promover la infección a través de la inducción del reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección y el consecuente aumento en la liberación de TNF α e IFN γ que, si es continuado en el tiempo, podría producir una inflamación severa y destrucción de los tejidos que

dificultaría el aclaramiento del hongo. En línea con estos resultados además observamos que los PBMCs de los portadores del alelo ARNT2_{rs1374213G} mostraban una producción mayor de TNF α e IFN γ tras la estimulación con antígenos fúngicos. Estos hallazgos junto con los previamente descritos y que sugieren que IL8, además de su actividad quemoatáctica hacia los neutrófilos y linfocitos, puede inducir la síntesis de metaloproteinas 9, lo que sugiere that ARNT2 podría incrementar la susceptibilidad a AI a través de su acción inhibitoria de la actividad antifúngica de las células inmunes innatas y la promoción de una agresiva respuesta inflamatoria sostenida en el tiempo que conduciría al daño del tejido pulmonar y un peor aclaramiento del hongo.

Por otro lado, hoy sabemos que la función de CX3CR1 es esencial en la resistencia a infecciones fúngicas³⁵¹. El gen CX3CR1 está localizado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p22.2) y codifica para el receptor de la fractalquina, una proteína transmembrana implicada en la quemoatracción, adhesión celular, migración y extravasación de leucocitos pero además en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes como la glomerulonefritis, la artritis reumatoide, la aterosclerosis y las infecciones bacterianas, víricas y fúngicas^{352,353}. Lionakis y colaboradores demostraron que el CX3CR1 se expresa principalmente en linfocitos citotóxicos efectores (incluyendo NK y linfocitos citotóxicos), monocitos, macrófagos y en subtipos específicos de CD y es necesario para el reconocimiento de patógenos fúngicos. En línea con estos hallazgos, observamos que la presencia del alelo CX3CR1_{rs9823718C}, que correlaciona de forma muy significativa con los niveles de expresión del mRNA de este gen en leucocitos^{354,355}, vuelve a los pacientes más susceptibles a la infección probablemente debido al defecto de respuestas inmune mediadas por IL8. Estos hallazgos, junto con los que confirman que este receptor de quemoquinas es responsable de promover la proliferación y la supervivencia de los macrófagos sugieren que, además de su función quimiotáctica, CX3CR1 está implicado en la funcionalidad de los macrófagos, en la adhesión celular y en la regulación de la producción de las citoquinas así como en la regulación de la respuesta inmune celular. En consonancia con estos datos observamos que los pacientes con AI que portaban el alelo CX3CR1_{rs9823718C} presentaban una acentuada reducción en la producción de IL8 en el lavado broncoalveolar y que macrófagos de individuos que portaban dicho alelo mostraban además una drástica reducción en la producción de IL1 β y TNF α tras el co-cultivo con conidios del hongo. Estos datos coinciden con estudios previos en que CX3CR1 es crítico para el reconocimiento y aclaramiento del hongo por las células del sistema inmune innato.

En conclusión, este estudio identifica por primera vez a ARNT2 y CX3CR1 como marcadores de la susceptibilidad a AI y, además, proporciona nueva información sobre el posible papel de estos genes en la regulación de la respuesta del sistema inmune innato y adaptativo contra *AF*. Esclarecer los mecanismos por lo que

ARNT2 y CX3CR1 regulan la respuesta inmune contra patógenos fúngicos proporcionará nuevas claves para el diseño de nuevas estrategias de profilaxis y tratamiento con anti-fúngicos.

CONCLUSIONES

1. La presencia de polimorfismos en los genes Dectina-1 y DC-SING pueden determinar la susceptibilidad a desarrollar AI en pacientes onco-hematológicos.
2. Ensayos de expresión génica indican que el polimorfismo rs7309123 en Dectina 1 modula los niveles de este receptor en células mononucleadas de sangre periférica, afectando así al reconocimiento de los conidios de *Aspergillus* por las células fagocíticas pero, además, al control de la respuesta inmune mediada por células Th1 y Th17.
3. Variantes genéticas en genes inmunomoduladores tales como IL4R, IL8, IL12B e IFN γ asocian con el riesgo de desarrollar AI. El efecto de las variantes en IL4R e IFN γ fue especialmente relevante en pacientes sometidos a trasplante de precursores hematopoyéticos, lo que sugiere un mayor impacto clínico de estos marcadores en grupos de pacientes con elevados niveles de inmunosupresión.
4. Los macrófagos de los portadores del alelo rs2069705C en el promotor del gen IFN γ presentan una mayor capacidad de eliminación de conidios de *Aspergillus* que los portadores del genotipo más común y, bajo condiciones de estimulación con conidios o antígenos fúngicos, los PBMCs de estos portadores presentan mayores niveles de expresión del mRNA de IFN γ y mayores niveles de producción de tanto IFN γ como TNF α .
5. El uso de variantes genéticas en IL8, IL12B, IFN γ y VEGFA permiten mejorar significativamente la capacidad para predecir el riesgo a padecer AI y, por tanto, puede tener utilidad clínica para el diseño de estrategias de tratamiento más individualizadas y adaptadas al riesgo de cada paciente.
6. La presencia de polimorfismos en los genes NF κ b1, NF κ b2, RelA, RelB, Rel e IRF4 no presentan una asociación significativa con el riesgo a desarrollar AI y su impacto clínico no parece ser muy relevante.
7. El análisis masivo de polimorfismos en genes del sistema inmune utilizando el ImmunoChip® de Illumina ha permitido identificar a ARNT2 y CX3CR1 como nuevos genes de susceptibilidad para AI.
8. El polimorfismo rs1374213 en el gen ARNT2 asocia con una menor capacidad fungicida de los macrófagos y con alteraciones en los niveles de IL1 α e IL8 en el lavado broncoalveolar de los pacientes con AI que sugiere un papel de este gen en la modulación de la respuesta inmune innata y en la inducción de una inflamación severa del tejido pulmonar que podría afectar el aclaramiento del hongo.

9. La presencia del polimorfismo rs9823718 en el gen CX3CR1 correlaciona con una disminución de la liberación de IL8 en el lavado broncoalveolar de pacientes con AI y con una menor producción de IL1 α y TNF α tras la co-estimulación de macrófagos con conidios de *Aspergillus* sugiriendo una implicación de este gen en la modulación de la respuesta inmune innata frente al hongo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 al., S. N. e. Aspergilosis Invasiva: Reporte de un caso y revisión de
literatura. *Médica Hondureña* **74**, 201-204. (2006).
- 2 Guarro, J. [Taxonomy and biology of fungi causing human infection].
Enfermedades infecciosas y microbiología clínica **30**, 33-39,
doi:10.1016/j.eimc.2011.09.006 (2012).
- 3 Pitt, R. A. S. a. J. I. *Modern concepts in Penicillium and Aspergillum*
classification. Vol. 185 (Springer Science+Business Media, LLC, 1990).
- 4 Raper KB, F. D. *The Genus Aspergillus.*, (1965).
- 5 Hope, W. W., Walsh, T. J. & Denning, D. W. Laboratory diagnosis of
invasive aspergillosis. *The Lancet. Infectious diseases* **5**, 609-622,
doi:10.1016/S1473-3099(05)70238-3 (2005).
- 6 Warnock, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal
infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* **48**, 1-12 (2007).
- 7 Fortun, J., Meije, Y., Fresco, G. & Moreno, S. [Aspergillosis. Clinical
forms and treatment]. *Enfermedades infecciosas y microbiología*
clínica **30**, 201-208, doi:10.1016/j.eimc.2011.12.005 (2012).
- 8 Abarca, M. L. [Taxonomy and identification of the species involved in
nosocomial aspergillosis]. *Revista iberoamericana de micología* **17**,
S79-84 (2000).
- 9 Patrick R, M. E. J. B. J. H. J. M. L. L. M. A. P. *Manual Clinical*
Microbiology. 9 edn, Vol. 2 (2007).
- 10 (CDC), U. S. D. o. H. a. H. S. C. f. D. C. a. P. *Guidelines for Environmental*
Infection Control in Health-Care Facilities (2003).
- 11 Mullins J, H. R., Seaton A. Sources and incidence of airborne
Aspergillus fumigatus (Fres). *Clin Allergy* **6**, 209-216 (1976).
- 12 Gregory, P. H. *The microbiology of the atmosphere* 2edn, (L Hill, 1973).
- 13 Solomon, W. R., Burge, H. P. & Boise, J. R. Airborne Aspergillus
fumigatus levels outside and within a large clinical center. *The Journal*
of allergy and clinical immunology **62**, 56-60 (1978).
- 14 Rose, H. D. & Hirsch, S. R. Filtering hospital air decreases Aspergillus
spore counts. *The American review of respiratory disease* **119**, 511-
513, doi:10.1164/arrd.1979.119.3.511 (1979).
- 15 Rath, P. M. & Ansorg, R. Value of environmental sampling and
molecular typing of aspergilli to assess nosocomial sources of
aspergillosis. *The Journal of hospital infection* **37**, 47-53 (1997).
- 16 Paoletti, M. et al. Evidence for sexuality in the opportunistic fungal
pathogen Aspergillus fumigatus. *Current biology : CB* **15**, 1242-1248,
doi:10.1016/j.cub.2005.05.045 (2005).
- 17 Poggeler, S. Genomic evidence for mating abilities in the asexual
pathogen Aspergillus fumigatus. *Current genetics* **42**, 153-160,
doi:10.1007/s00294-002-0338-3 (2002).

- 18 O'Gorman, C. M., Fuller, H. & Dyer, P. S. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **457**, 471-474, doi:10.1038/nature07528 (2009).
- 19 Gerard J. Tortora, B. R. F., Christine L. Case. *Microbiology an introduction*. 10 edn, (2010).
- 20 Segal, B. H. Aspergillosis. *The New England journal of medicine* **360**, 1870-1884, doi:10.1056/NEJMra0808853 (2009).
- 21 Roilides, E. & Simitsopoulou, M. Local innate host response and filamentous fungi in patients with cystic fibrosis. *Medical mycology* **48** **Suppl 1**, S22-31, doi:10.3109/13693786.2010.511286 (2010).
- 22 Denning, D. W. Invasive aspergillosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **26**, 781-803; quiz 804-785 (1998).
- 23 Pagano, L. *et al.* Invasive aspergillosis in patients with acute myeloid leukemia: a SEIFEM-2008 registry study. *Haematologica* **95**, 644-650, doi:10.3324/haematol.2009.012054 (2010).
- 24 Kontoyiannis, D. P. *et al.* Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **50**, 1091-1100, doi:10.1086/651263 (2010).
- 25 Marr, K. A., Carter, R. A., Crippa, F., Wald, A. & Corey, L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **34**, 909-917, doi:10.1086/339202 (2002).
- 26 Maschmeyer, G., Haas, A. & Cornely, O. A. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. *Drugs* **67**, 1567-1601 (2007).
- 27 Markowski, J. *et al.* Fungal colonization of the respiratory tract in allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplant recipients: a study of 573 transplanted patients. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **21**, 1173-1180, doi:10.12659/MSM.893267 (2015).
- 28 Geltner, C. & Lass-Flörl, C. Invasive pulmonary Aspergillosis in organ transplants - Focus on lung transplants. *Respiratory investigation* **54**, 76-84, doi:10.1016/j.resinv.2015.08.005 (2016).
- 29 Silveira, F. P. & Husain, S. Fungal infections in solid organ transplantation. *Medical mycology* **45**, 305-320, doi:10.1080/13693780701200372 (2007).

- 30 Marr, K. A. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Medical mycology* **46**, 293-302, doi:10.1080/13693780701885552 (2008).
- 31 Shaukat, A. *et al.* Invasive filamentous fungal infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients after recovery from neutropenia: clinical, radiologic, and pathologic characteristics. *Mycopathologia* **159**, 181-188, doi:10.1007/s11046-004-5495-0 (2005).
- 32 Walsh, T. J. *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **46**, 327-360, doi:10.1086/525258 (2008).
- 33 Lin, S. J., Schranz, J. & Teutsch, S. M. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **32**, 358-366, doi:10.1086/318483 (2001).
- 34 Ohmagari, N. *et al.* Risk factors for infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cancer. *Cancer* **104**, 205-212, doi:10.1002/cncr.21115 (2005).
- 35 Caira, M. *et al.* Invasive fungal infections in patients with acute myeloid leukemia and in those submitted to allogeneic hemopoietic stem cell transplant: who is at highest risk? *European journal of haematology* **81**, 242-243, doi:10.1111/j.1600-0609.2008.01096.x (2008).
- 36 Mikulska, M. *et al.* Risk factors for invasive aspergillosis and related mortality in recipients of allogeneic SCT from alternative donors: an analysis of 306 patients. *Bone marrow transplantation* **44**, 361-370, doi:10.1038/bmt.2009.39 (2009).
- 37 Wingard, J. R., Ribaud, P., Schlamm, H. T. & Herbrecht, R. Changes in causes of death over time after treatment for invasive aspergillosis. *Cancer* **112**, 2309-2312, doi:10.1002/cncr.23441 (2008).
- 38 Chamilos, G. *et al.* Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica* **91**, 986-989 (2006).
- 39 T, S. B. a. W. Current Approaches to Diagnosis and Treatment of Invasive Aspergillosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **173**, 707-717 (2006).
- 40 Horn, D. L. *et al.* Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **48**, 1695-1703, doi:10.1086/599039 (2009).

- 41 Morace, G. *et al.* Antifungal susceptibility of invasive yeast isolates in Italy: the GISIA3 study in critically ill patients. *BMC infectious diseases* **11**, 130, doi:10.1186/1471-2334-11-130 (2011).
- 42 Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical reviews in microbiology* **36**, 1-53, doi:10.3109/10408410903241444 (2010).
- 43 Offner, F. *et al.* Impact of previous aspergillosis on the outcome of bone marrow transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **26**, 1098-1103 (1998).
- 44 Cenci, E. *et al.* Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *The Journal of infectious diseases* **178**, 1750-1760 (1998).
- 45 Morgenstern, D. E., Gifford, M. A., Li, L. L., Doerschuk, C. M. & Dinauer, M. C. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of experimental medicine* **185**, 207-218 (1997).
- 46 Romani, L. The T cell response against fungal infections. *Current opinion in immunology* **9**, 484-490 (1997).
- 47 Schaffner, A., Douglas, H. & Braude, A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *The Journal of clinical investigation* **69**, 617-631 (1982).
- 48 Gerson, S. L. *et al.* Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Annals of internal medicine* **100**, 345-351 (1984).
- 49 Sainz, J. *et al.* Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection. *PloS one* **7**, e32273, doi:10.1371/journal.pone.0032273 (2012).
- 50 Sainz, J. *et al.* Interleukin-10 promoter polymorphism as risk factor to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Immunol Lett* **109**, 76-82, doi:S0165-2478(07)00010-7 [pii] 10.1016/j.imlet.2007.01.005 (2007).
- 51 Bochud, P. Y. *et al.* Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *The New England journal of medicine* **359**, 1766-1777, doi:10.1056/NEJMoa0802629 (2008).
- 52 AK, Z. Plasminogen alleles influence susceptibility to invasive aspergillosis. *PLoS Genet.* **4**, e1000101 (2008).
- 53 Cunha, C., Aversa, F., Romani, L. & Carvalho, A. Human genetic susceptibility to invasive aspergillosis. *PLoS pathogens* **9**, e1003434, doi:10.1371/journal.ppat.1003434 (2013).

- 54 Kelsey, S. M. *et al.* Liposomal amphotericin (AmBisome) in the prophylaxis of fungal infections in neutropenic patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Bone marrow transplantation* **23**, 163-168, doi:10.1038/sj.bmt.1701543 (1999).
- 55 Tollemar, J. *et al.* Randomized double-blind study of liposomal amphotericin B (Ambisome) prophylaxis of invasive fungal infections in bone marrow transplant recipients. *Bone marrow transplantation* **12**, 577-582 (1993).
- 56 Leather, H. L. & Wingard, J. R. New strategies of antifungal therapy in hematopoietic stem cell transplant recipients and patients with hematological malignancies. *Blood reviews* **20**, 267-287, doi:10.1016/j.blre.2006.03.001 (2006).
- 57 Rijnders, B. J. *et al.* Aerosolized liposomal amphotericin B for the prevention of invasive pulmonary aspergillosis during prolonged neutropenia: a randomized, placebo-controlled trial. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **46**, 1401-1408, doi:10.1086/586739 (2008).
- 58 van Burik, J. A. *et al.* Micafungin versus fluconazole for prophylaxis against invasive fungal infections during neutropenia in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **39**, 1407-1416, doi:10.1086/422312 (2004).
- 59 Cornely, O. A. *et al.* Evaluating the role of prophylaxis in the management of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancy. *European journal of haematology* **87**, 289-301, doi:10.1111/j.1600-0609.2011.01682.x (2011).
- 60 Cornely, O. A. *et al.* Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *The New England journal of medicine* **356**, 348-359, doi:10.1056/NEJMoa061094 (2007).
- 61 Marks, D. I. *et al.* Voriconazole versus itraconazole for antifungal prophylaxis following allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation. *British journal of haematology* **155**, 318-327, doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08838.x (2011).
- 62 (http://www.leukemia-net.org/content/treat_research/supportive_care/standards_sop_and_recommendations/index_eng.html, 2007).
- 63 (<http://www.nccn.org>, 2008).
- 64 (<http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/noxafil/H-610-PI-es.pdf>, 2005).
- 65 Pizzo, P. A., Robichaud, K. J., Gill, F. A. & Witebsky, F. G. Empiric antibiotic and antifungal therapy for cancer patients with prolonged fever and granulocytopenia. *The American journal of medicine* **72**, 101-111 (1982).

- 66 Empiric antifungal therapy in febrile granulocytopenic patients. EORTC International Antimicrobial Therapy Cooperative Group. *The American journal of medicine* **86**, 668-672 (1989).
- 67 Denning, D. W. *et al.* Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **34**, 563-571, doi:10.1086/324620 (2002).
- 68 Herbrecht, R. *et al.* Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *The New England journal of medicine* **347**, 408-415, doi:10.1056/NEJMoa020191 (2002).
- 69 Denning, D. W., Kibbler, C. C. & Barnes, R. A. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *The Lancet. Infectious diseases* **3**, 230-240 (2003).
- 70 Walsh, T. J. *et al.* Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. *The New England journal of medicine* **340**, 764-771, doi:10.1056/NEJM199903113401004 (1999).
- 71 Walsh, T. J. *et al.* Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *The New England journal of medicine* **346**, 225-234, doi:10.1056/NEJM200201243460403 (2002).
- 72 Walsh, T. J. *et al.* Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *The New England journal of medicine* **351**, 1391-1402, doi:10.1056/NEJMoa040446 (2004).
- 73 Schneider, T. *et al.* Pre-emptive diagnosis and treatment of fungal infections--evaluation of a single-centre policy. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **18**, 189-194, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03589.x (2012).
- 74 Maschmeyer, G. *et al.* Immediate versus deferred empirical antifungal (IDEA) therapy in high-risk patients with febrile neutropenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **32**, 679-689, doi:10.1007/s10096-012-1794-4 (2013).
- 75 B, D. P. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **46**, 1813-1821 (2008).

- 76 Cuenca-Estrella, M. *et al.* Detection and investigation of invasive mould disease. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **66 Suppl 1**, i15-24, doi:10.1093/jac/dkq438 (2011).
- 77 Peman, J. [Diagnosis of nosocomial aspergillosis]. *Revista iberoamericana de micología* **17**, S90-92 (2000).
- 78 Latge, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **12**, 310-350 (1999).
- 79 Levy, H., Horak, D. A., Tegtmeier, B. R., Yokota, S. B. & Forman, S. J. The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Respiratory medicine* **86**, 243-248 (1992).
- 80 Jones, B. L. & McLintock, L. A. Impact of diagnostic markers on early antifungal therapy. *Current opinion in infectious diseases* **16**, 521-526, doi:10.1097/O1.qco.0000104290.87920.a1 (2003).
- 81 Samarakoon, P. & Soubani, A. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with COPD: a report of five cases and systematic review of the literature. *Chronic respiratory disease* **5**, 19-27, doi:10.1177/1479972307085637 (2008).
- 82 Kami, M. *et al.* Computed tomographic scan of the chest, latex agglutination test and plasma (1AE3)-beta-D-glucan assay in early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a prospective study of 215 patients. *Haematologica* **85**, 745-752 (2000).
- 83 Weisser, M. *et al.* Galactomannan does not precede major signs on a pulmonary computerized tomographic scan suggestive of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **41**, 1143-1149, doi:10.1086/444462 (2005).
- 84 Caillot, D. *et al.* Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **15**, 139-147, doi:10.1200/jco.1997.15.1.139 (1997).
- 85 Herbrecht, R. *et al.* *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**, 1898-1906, doi:10.1200/JCO.2002.07.004 (2002).
- 86 Chan, C. M. *et al.* Detection of antibodies specific to an antigenic cell wall galactomannoprotein for serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* aspergillosis. *Journal of clinical microbiology* **40**, 2041-2045 (2002).
- 87 Obayashi, T. *et al.* Determination of plasma (1->3)-beta-D-glucan: a new diagnostic aid to deep mycosis. *Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology* **30**, 275-280 (1992).

- 88 Obayashi, T. *et al.* Plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* **345**, 17-20 (1995).
- 89 JP, L. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **12** (1999).
- 90 Denning, D. W. Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* **355**, 423-424, doi:10.1016/S0140-6736(00)82003-6 (2000).
- 91 Verweig PE, E. Z., Sluifers W, et al. . Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra-and interlaboratory reproducibility. *Journal of clinical microbiology* **36** (1998).
- 92 Leeflang, M. M. *et al.* Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD007394, doi:10.1002/14651858.CD007394 (2008).
- 93 Maertens, J. *et al.* Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *British journal of haematology* **126**, 852-860, doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05140.x (2004).
- 94 Boutboul, F. *et al.* Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **34**, 939-943, doi:10.1086/339324 (2002).
- 95 Maertens, J. *et al.* Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. *Journal of clinical microbiology* **37**, 3223-3228 (1999).
- 96 Maertens, J. *et al.* Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *The Journal of infectious diseases* **186**, 1297-1306, doi:10.1086/343804 (2002).
- 97 Bretagne, S. *et al.* Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *Journal of clinical microbiology* **33**, 1164-1168 (1995).
- 98 Einsele, H. *et al.* Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of clinical microbiology* **35**, 1353-1360 (1997).
- 99 Van Burik, J. A., Myerson, D., Schreckhise, R. W. & Bowden, R. A. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *Journal of clinical microbiology* **36**, 1169-1175 (1998).

- 100 Loeffler, J. *et al.* Polymerase chain reaction detection of aspergillus DNA in experimental models of invasive aspergillosis. *The Journal of infectious diseases* **185**, 1203-1206, doi:10.1086/339824 (2002).
- 101 Hebart, H. *et al.* Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *The Journal of infectious diseases* **181**, 1713-1719, doi:10.1086/315435 (2000).
- 102 Florent, M. *et al.* Prospective evaluation of a polymerase chain reaction-ELISA targeted to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* for the early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *The Journal of infectious diseases* **193**, 741-747, doi:10.1086/500466 (2006).
- 103 Badiie, P., Kordbacheh, P., Alborzi, A., Ramzi, M. & Shakiba, E. Molecular detection of invasive aspergillosis in hematologic malignancies. *Infection* **36**, 580-584, doi:10.1007/s15010-008-7385-8 (2008).
- 104 Mengoli, C., Cruciani, M., Barnes, R. A., Loeffler, J. & Donnelly, J. P. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases* **9**, 89-96, doi:10.1016/S1473-3099(09)70019-2 (2009).
- 105 Cuenca-Estrella, M. *et al.* Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *Journal of clinical microbiology* **47**, 379-384, doi:10.1128/JCM.01716-08 (2009).
- 106 Aguado, J. M. *et al.* Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based *Aspergillus* DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **60**, 405-414, doi:10.1093/cid/ciu833 (2015).
- 107 Segal, B. H. & Walsh, T. J. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **173**, 707-717, doi:10.1164/rccm.200505-727SO (2006).
- 108 Rogers, D. F. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders. *The European respiratory journal* **7**, 1690-1706 (1994).
- 109 Balloy, V. & Chignard, M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and infection* **11**, 919-927, doi:10.1016/j.micinf.2009.07.002 (2009).
- 110 Amitani, R. *et al.* Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infection and immunity* **63**, 3266-3271 (1995).

- 111 Alekseeva, L. *et al.* Inducible expression of beta defensins by human respiratory epithelial cells exposed to *Aspergillus fumigatus* organisms. *BMC microbiology* **9**, 33, doi:10.1186/1471-2180-9-33 (2009).
- 112 Chen, L., Shen, Z. & Wu, J. Expression, purification and in vitro antifungal activity of acidic mammalian chitinase against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* strains. *Clinical and experimental dermatology* **34**, 55-60, doi:10.1111/j.1365-2230.2008.03092.x (2009).
- 113 Doumas, S., Kolokotronis, A. & Stefanopoulos, P. Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. *Infection and immunity* **73**, 1271-1274, doi:10.1128/IAI.73.3.1271-1274.2005 (2005).
- 114 Wasylnka, J. A. & Moore, M. M. Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infection and immunity* **70**, 3156-3163 (2002).
- 115 Filler, S. G. & Sheppard, D. C. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS pathogens* **2**, e129, doi:10.1371/journal.ppat.0020129 (2006).
- 116 Wasylnka, J. A. & Moore, M. M. *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. *Journal of cell science* **116**, 1579-1587 (2003).
- 117 Thywissen, A. *et al.* Conidial Dihydroxynaphthalene Melanin of the Human Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus* Interferes with the Host Endocytosis Pathway. *Frontiers in microbiology* **2**, 96, doi:10.3389/fmicb.2011.00096 (2011).
- 118 Volling, K., Thywissen, A., Brakhage, A. A. & Saluz, H. P. Phagocytosis of melanized *Aspergillus* conidia by macrophages exerts cytoprotective effects by sustained PI3K/Akt signalling. *Cellular microbiology* **13**, 1130-1148, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01605.x (2011).
- 119 Balloy, V. *et al.* *Aspergillus fumigatus*-induced interleukin-8 synthesis by respiratory epithelial cells is controlled by the phosphatidylinositol 3-kinase, p38 MAPK, and ERK1/2 pathways and not by the toll-like receptor-MyD88 pathway. *The Journal of biological chemistry* **283**, 30513-30521, doi:10.1074/jbc.M803149200 (2008).
- 120 Bellanger, A. P. *et al.* *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. *Journal of medical microbiology* **58**, 174-179, doi:10.1099/jmm.0.005488-0 (2009).
- 121 Sun, W. K. *et al.* Dectin-1 is inducible and plays a crucial role in *Aspergillus*-induced innate immune responses in human bronchial epithelial cells. *European journal of clinical microbiology & infectious*

- diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **31**, 2755-2764, doi:10.1007/s10096-012-1624-8 (2012).
- 122 Park, S. J. & Mehrad, B. Innate immunity to Aspergillus species. *Clin Microbiol Rev* **22**, 535-551, doi:10.1128/CMR.00014-09 (2009).
- 123 Levitz, S. M. Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS pathogens* **6**, e1000758, doi:10.1371/journal.ppat.1000758 (2010).
- 124 Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nature reviews. Immunology* **11**, 275-288, doi:10.1038/nri2939 (2011).
- 125 Bottazzi, B., Doni, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annual review of immunology* **28**, 157-183, doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101305 (2010).
- 126 Garlanda, C. *et al.* Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* **420**, 182-186, doi:10.1038/nature01195 (2002).
- 127 Han, B. *et al.* TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. *J Immunol* **175**, 8303-8311 (2005).
- 128 Moalli, F. *et al.* Role of complement and Fc{gamma} receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against Aspergillus fumigatus. *Blood* **116**, 5170-5180, doi:10.1182/blood-2009-12-258376 (2010).
- 129 Speth, C., Rambach, G., Lass-Flörl, C., Dierich, M. P. & Würzner, R. The role of complement in invasive fungal infections. *Mycoses* **47**, 93-103, doi:10.1111/j.1439-0507.2004.00979.x (2004).
- 130 Speth, C. & Rambach, G. Complement Attack against Aspergillus and Corresponding Evasion Mechanisms. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* **2012**, 463794, doi:10.1155/2012/463794 (2012).
- 131 Kozel, T. R., Wilson, M. A., Farrell, T. P. & Levitz, S. M. Activation of C3 and binding to Aspergillus fumigatus conidia and hyphae. *Infection and immunity* **57**, 3412-3417 (1989).
- 132 Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology* **11**, 785-797, doi:10.1038/ni.1923 (2010).
- 133 Bottazzi, B. *et al.* Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *The Journal of biological chemistry* **272**, 32817-32823 (1997).
- 134 Svirshchevskaya, E. V. *et al.* Susceptibility of mice to invasive aspergillosis correlates with delayed cell influx into the lungs. *International journal of immunogenetics* **36**, 289-299, doi:10.1111/j.1744-313X.2009.00869.x (2009).
- 135 Turner, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular immunology* **40**, 423-429 (2003).

- 136 Kaur, S., Gupta, V. K., Thiel, S., Sarma, P. U. & Madan, T. Protective role of mannan-binding lectin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Clinical and experimental immunology* **148**, 382-389, doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03351.x (2007).
- 137 Madan, T. *et al.* Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infection and immunity* **65**, 3171-3179 (1997).
- 138 Endo, Y., Matsushita, M. & Fujita, T. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *The international journal of biochemistry & cell biology* **43**, 705-712, doi:10.1016/j.biocel.2011.02.003 (2011).
- 139 Ma, Y. J. *et al.* Synergy between ficolin-2 and pentraxin 3 boosts innate immune recognition and complement deposition. *The Journal of biological chemistry* **284**, 28263-28275, doi:10.1074/jbc.M109.009225 (2009).
- 140 Aimanianda, V. *et al.* Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* **460**, 1117-1121, doi:10.1038/nature08264 (2009).
- 141 Werner, J. L. *et al.* Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol* **182**, 4938-4946, doi:10.4049/jimmunol.0804250 (2009).
- 142 Gersuk, G. M., Underhill, D. M., Zhu, L. & Marr, K. A. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol* **176**, 3717-3724 (2006).
- 143 Luther, K., Torosantucci, A., Brakhage, A. A., Heesemann, J. & Ebel, F. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cellular microbiology* **9**, 368-381, doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00796.x (2007).
- 144 Steele, C. *et al.* The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens* **1**, e42, doi:10.1371/journal.ppat.0010042 (2005).
- 145 Faro-Trindade, I. *et al.* Characterisation of innate fungal recognition in the lung. *PloS one* **7**, e35675, doi:10.1371/journal.pone.0035675 (2012).
- 146 Saijo, S. & Iwakura, Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *International immunology* **23**, 467-472, doi:10.1093/intimm/dxr046 (2011).
- 147 Sun, H. *et al.* Dectin-2 is predominately macrophage restricted and exhibits conspicuous expression during *Aspergillus fumigatus* invasion in human lung. *Cellular immunology* **284**, 60-67, doi:10.1016/j.cellimm.2013.06.013 (2013).

- 148 Sun, H. *et al.* Activation of NF-kappaB and respiratory burst following *Aspergillus fumigatus* stimulation of macrophages. *Immunobiology* **219**, 25-36, doi:10.1016/j.imbio.2013.06.013 (2014).
- 149 Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* **17**, 1-14, doi:10.1093/intimm/dxh186 (2005).
- 150 Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* **4**, 499-511, doi:10.1038/nri1391 (2004).
- 151 Saitoh, S. *et al.* Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *International immunology* **16**, 961-969, doi:10.1093/intimm/dxh097 (2004).
- 152 Kawai, T. *et al.* Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* **167**, 5887-5894 (2001).
- 153 Yoneyama, M. *et al.* Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *The EMBO journal* **17**, 1087-1095, doi:10.1093/emboj/17.4.1087 (1998).
- 154 Foster, S. L. & Medzhitov, R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol* **130**, 7-15, doi:10.1016/j.clim.2008.08.015 (2009).
- 155 Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Cell death and differentiation* **13**, 816-825, doi:10.1038/sj.cdd.4401850 (2006).
- 156 Netea, M. G. *et al.* *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *The Journal of infectious diseases* **188**, 320-326, doi:10.1086/376456 (2003).
- 157 Meier, A. *et al.* Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cellular microbiology* **5**, 561-570 (2003).
- 158 Braedel, S. *et al.* *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *British journal of haematology* **125**, 392-399, doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04922.x (2004).
- 159 Rubino, I. *et al.* Species-specific recognition of *Aspergillus fumigatus* by Toll-like receptor 1 and Toll-like receptor 6. *The Journal of infectious diseases* **205**, 944-954, doi:10.1093/infdis/jir882 (2012).
- 160 Carvalho, A. *et al.* TLR3 essentially promotes protective class I-restricted memory CD8(+) T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients. *Blood* **119**, 967-977, doi:10.1182/blood-2011-06-362582 (2012).

- 161 de Luca, A. *et al.* Non-hematopoietic cells contribute to protective tolerance to *Aspergillus fumigatus* via a TRIF pathway converging on IDO. *Cellular & molecular immunology* **7**, 459-470, doi:10.1038/cmi.2010.43 (2010).
- 162 Beisswenger, C., Hess, C. & Bals, R. *Aspergillus fumigatus* conidia induce interferon-beta signalling in respiratory epithelial cells. *The European respiratory journal* **39**, 411-418, doi:10.1183/09031936.00096110 (2012).
- 163 Le Bon, A. & Tough, D. F. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Current opinion in immunology* **14**, 432-436 (2002).
- 164 Ramirez-Ortiz, Z. G. *et al.* Toll-like receptor 9-dependent immune activation by unmethylated CpG motifs in *Aspergillus fumigatus* DNA. *Infection and immunity* **76**, 2123-2129, doi:10.1128/IAI.00047-08 (2008).
- 165 Kasperkovitz, P. V., Cardenas, M. L. & Vyas, J. M. TLR9 is actively recruited to *Aspergillus fumigatus* phagosomes and requires the N-terminal proteolytic cleavage domain for proper intracellular trafficking. *J Immunol* **185**, 7614-7622, doi:10.4049/jimmunol.1002760 (2010).
- 166 Ramaprakash, H., Ito, T., Standiford, T. J., Kunkel, S. L. & Hogaboam, C. M. Toll-like receptor 9 modulates immune responses to *Aspergillus fumigatus* conidia in immunodeficient and allergic mice. *Infection and immunity* **77**, 108-119, doi:10.1128/IAI.00998-08 (2009).
- 167 Marr, K. A. *et al.* Differential role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens. *Infection and immunity* **71**, 5280-5286 (2003).
- 168 Dubourdeau, M. *et al.* *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *J Immunol* **177**, 3994-4001 (2006).
- 169 Inoue, M. & Shinohara, M. L. Clustering of pattern recognition receptors for fungal detection. *PLoS pathogens* **10**, e1003873, doi:10.1371/journal.ppat.1003873 (2014).
- 170 Li, Z. Z., Tao, L. L., Zhang, J., Zhang, H. J. & Qu, J. M. Role of NOD2 in regulating the immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **61**, 643-648, doi:10.1007/s00011-012-0456-4 (2012).
- 171 Said-Sadier, N., Padilla, E., Langsley, G. & Ojcius, D. M. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS one* **5**, e10008, doi:10.1371/journal.pone.0010008 (2010).

- 172 Gringhuis, S. I. *et al.* Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 β via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nature immunology* **13**, 246-254, doi:10.1038/ni.2222 (2012).
- 173 Mansour, M. K. & Levitz, S. M. Interactions of fungi with phagocytes. *Current opinion in microbiology* **5**, 359-365 (2002).
- 174 Bhatia, S. *et al.* Rapid host defense against *Aspergillus fumigatus* involves alveolar macrophages with a predominance of alternatively activated phenotype. *PloS one* **6**, e15943, doi:10.1371/journal.pone.0015943 (2011).
- 175 Major, J., Fletcher, J. E. & Hamilton, T. A. IL-4 pretreatment selectively enhances cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* **168**, 2456-2463 (2002).
- 176 Brummer, E., Maqbool, A. & Stevens, D. A. Protection of bronchoalveolar macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor against dexamethasone suppression of fungicidal activity for *Aspergillus fumigatus* conidia. *Medical mycology* **39**, 509-515 (2001).
- 177 Gonzalez, C. E. *et al.* Recombinant human macrophage colony-stimulating factor augments pulmonary host defences against *Aspergillus fumigatus*. *Cytokine* **15**, 87-95, doi:10.1006/cyto.2001.0889 (2001).
- 178 Re, F. & Strominger, J. L. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* **276**, 37692-37699, doi:10.1074/jbc.M105927200 (2001).
- 179 de Jong, E. C. *et al.* Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol* **168**, 1704-1709 (2002).
- 180 Colino, J., Shen, Y. & Snapper, C. M. Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms. *The Journal of experimental medicine* **195**, 1-13 (2002).
- 181 Bozza, S. *et al.* Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol* **168**, 1362-1371 (2002).
- 182 Stephens-Romero, S. D., Mednick, A. J. & Feldmesser, M. The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. *Infection and immunity* **73**, 114-125, doi:10.1128/IAI.73.1.114-125.2005 (2005).
- 183 Mircescu, M. M., Lipuma, L., van Rooijen, N., Pamer, E. G. & Hohl, T. M. Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early

- time points following *Aspergillus fumigatus* infection. *The Journal of infectious diseases* **200**, 647-656, doi:10.1086/600380 (2009).
- 184 Feldmesser, M. Role of neutrophils in invasive aspergillosis. *Infection and immunity* **74**, 6514-6516, doi:10.1128/IAI.01551-06 (2006).
- 185 Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-1535, doi:10.1126/science.1092385 (2004).
- 186 Bruns, S. *et al.* Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS pathogens* **6**, e1000873, doi:10.1371/journal.ppat.1000873 (2010).
- 187 McCormick, A. *et al.* NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and infection* **12**, 928-936, doi:10.1016/j.micinf.2010.06.009 (2010).
- 188 Rohm, M. *et al.* NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis. *Infection and immunity* **82**, 1766-1777, doi:10.1128/IAI.00096-14 (2014).
- 189 Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular microbiology* **8**, 668-676, doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x (2006).
- 190 Bouzani, M. *et al.* Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN-gamma release. *J Immunol* **187**, 1369-1376, doi:10.4049/jimmunol.1003593 (2011).
- 191 Schmidt, S. *et al.* Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia. *The Journal of infectious diseases* **203**, 430-435, doi:10.1093/infdis/jiq062 (2011).
- 192 Park, S. J., Hughes, M. A., Burdick, M., Strieter, R. M. & Mehrad, B. Early NK cell-derived IFN- γ is essential to host defense in neutropenic invasive aspergillosis. *J Immunol* **182**, 4306-4312, doi:10.4049/jimmunol.0803462 (2009).
- 193 Groom, J. R. & Luster, A. D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunology and cell biology* **89**, 207-215, doi:10.1038/icb.2010.158 (2011).
- 194 Pak-Wittel, M. A., Yang, L., Sojka, D. K., Rivenbark, J. G. & Yokoyama, W. M. Interferon-gamma mediates chemokine-dependent recruitment of natural killer cells during viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, E50-59, doi:10.1073/pnas.1220456110 (2013).
- 195 Morrison, B. E., Park, S. J., Mooney, J. M. & Mehrad, B. Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism

- in invasive aspergillosis. *The Journal of clinical investigation* **112**, 1862-1870, doi:10.1172/JCI18125 (2003).
- 196 Serbina, N. V. *et al.* Distinct responses of human monocyte subsets to *Aspergillus fumigatus* conidia. *J Immunol* **183**, 2678-2687, doi:10.4049/jimmunol.0803398 (2009).
- 197 Loeffler, J. *et al.* Interaction analyses of human monocytes co-cultured with different forms of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of medical microbiology* **58**, 49-58, doi:10.1099/jmm.0.003293-0 (2009).
- 198 Hohl, T. M. *et al.* Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell host & microbe* **6**, 470-481, doi:10.1016/j.chom.2009.10.007 (2009).
- 199 Espinosa, V. *et al.* Inflammatory monocytes orchestrate innate antifungal immunity in the lung. *PLoS pathogens* **10**, e1003940, doi:10.1371/journal.ppat.1003940 (2014).
- 200 Christin, L. *et al.* Human platelets damage *Aspergillus fumigatus* hyphae and may supplement killing by neutrophils. *Infection and immunity* **66**, 1181-1189 (1998).
- 201 Perkhofer, S. *et al.* Human platelets attenuate *Aspergillus* species via granule-dependent mechanisms. *The Journal of infectious diseases* **198**, 1243-1246, doi:10.1086/591458 (2008).
- 202 Speth, C. *et al.* *Aspergillus fumigatus* activates thrombocytes by secretion of soluble compounds. *The Journal of infectious diseases* **207**, 823-833, doi:10.1093/infdis/jis743 (2013).
- 203 Perkhofer, S. *et al.* Interaction of 5-hydroxytryptamine (serotonin) against *Aspergillus* spp. in vitro. *International journal of antimicrobial agents* **29**, 424-429, doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.12.003 (2007).
- 204 Rodland, E. K. *et al.* Activation of platelets by *Aspergillus fumigatus* and potential role of platelets in the immunopathogenesis of Aspergillosis. *Infection and immunity* **78**, 1269-1275, doi:10.1128/IAI.01091-09 (2010).
- 205 Cenci, E. *et al.* Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infection and immunity* **65**, 564-570 (1997).
- 206 Cenci, E. *et al.* Induction of protective Th1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. *J Chemother* **10**, 160-163, doi:10.1179/joc.1998.10.2.160 (1998).
- 207 Chai, L. Y. *et al.* Anti-*Aspergillus* human host defence relies on type 1 T helper (Th1), rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity. *Immunology* **130**, 46-54, doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03211.x (2010).
- 208 Nagai, H., Guo, J., Choi, H. & Kurup, V. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha protect mice from invasive aspergillosis. *The Journal of infectious diseases* **172**, 1554-1560 (1995).

- 209 Romani, L., Puccetti, P. & Bistoni, F. Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **10**, 611-636 (1997).
- 210 Rivera, A., Van Epps, H. L., Hohl, T. M., Rizzuto, G. & Pamer, E. G. Distinct CD4+T-cell responses to live and heat-inactivated *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infection and immunity* **73**, 7170-7179, doi:10.1128/IAI.73.11.7170-7179.2005 (2005).
- 211 Hebart, H. *et al.* Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood* **100**, 4521-4528, doi:10.1182/blood-2002-01-0265 (2002).
- 212 Roilides, E. *et al.* IL-10 exerts suppressive and enhancing effects on antifungal activity of mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol* **158**, 322-329 (1997).
- 213 Bernhisel-Broadbent, J., Camargo, E. E., Jaffe, H. S. & Lederman, H. M. Recombinant human interferon-gamma as adjunct therapy for *Aspergillus* infection in a patient with chronic granulomatous disease. *The Journal of infectious diseases* **163**, 908-911 (1991).
- 214 Roilides, E. *et al.* Effects of macrophage colony-stimulating factor on antifungal activity of mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of infectious diseases* **172**, 1028-1034 (1995).
- 215 Bernhisel-Broadbent J1, C. E., Jaffe HS, Lederman HM. Recombinant human interferon-gamma as adjunct therapy for *Aspergillus* infection in a patient with chronic granulomatous disease. *J Infect Dis.* **4**, 908-911 (1991).
- 216 Huffnagle, G. B. *et al.* Afferent phase production of TNF-alpha is required for the development of protective T cell immunity to *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* **157**, 4529-4536 (1996).
- 217 Huffnagle, G. B. *et al.* The role of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4+ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* **155**, 4790-4797 (1995).
- 218 Kawakami, K., Qifeng, X., Tohyama, M., Qureshi, M. H. & Saito, A. Contribution of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in host defence mechanism against *Cryptococcus neoformans*. *Clinical and experimental immunology* **106**, 468-474 (1996).
- 219 Sainz, J., Perez, E., Gomez-Lopera, S. & Jurado, M. IL1 gene cluster polymorphisms and its haplotypes may predict the risk to develop invasive pulmonary aspergillosis and modulate C-reactive protein level. *Journal of clinical immunology* **28**, 473-485, doi:10.1007/s10875-008-9197-0 (2008).
- 220 Mezger, M. *et al.* Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived

- dendritic cells. *Blood* **111**, 534-536, doi:10.1182/blood-2007-05-090928 (2008).
- 221 Carvalho, A. *et al.* Prognostic significance of genetic variants in the IL-23/Th17 pathway for the outcome of T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation* **45**, 1645-1652, doi:10.1038/bmt.2010.28 (2010).
- 222 Sainz, J. *et al.* TNFR1 mRNA expression level and TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *International journal of immunopathology and pharmacology* **23**, 423-436 (2010).
- 223 Sainz, J. *et al.* Variable number of tandem repeats of TNF receptor type 2 promoter as genetic biomarker of susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Human immunology* **68**, 41-50, doi:10.1016/j.humimm.2006.10.011 (2007).
- 224 Wojtowicz, A. *et al.* IL1B and DEFB1 Polymorphisms Increase Susceptibility to Invasive Mold Infection After Solid-Organ Transplantation. *The Journal of infectious diseases* **211**, 1646-1657, doi:10.1093/infdis/jiu636 (2015).
- 225 Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O. & Duff, G. W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3195-3199 (1997).
- 226 Fishman, D. *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *The Journal of clinical investigation* **102**, 1369-1376, doi:10.1172/JCI2629 (1998).
- 227 Sainz, J. *et al.* Genetic variants of IL6 gene promoter influence on C-reactive protein levels but are not associated with susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis in haematological patients. *Cytokine* **41**, 268-278, doi:10.1016/j.cyto.2007.11.018 (2008).
- 228 Turner, D. M. *et al.* An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics* **24**, 1-8 (1997).
- 229 Tagore, A. *et al.* Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissue antigens* **54**, 386-390 (1999).
- 230 Kumpf, O. *et al.* Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts. *Crit Care* **14**, R103, doi:10.1186/cc9047 (2010).
- 231 Kesh, S. *et al.* TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell

- transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1062**, 95-103, doi:10.1196/annals.1358.012 (2005).
- 232 Koldehoff, M., Beelen, D. W. & Elmaagacli, A. H. Increased susceptibility for aspergillosis and post-transplant immune deficiency in patients with gene variants of TLR4 after stem cell transplantation. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* **15**, 533-539, doi:10.1111/tid.12115 (2013).
- 233 Carvalho, A. *et al.* Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *The Journal of infectious diseases* **197**, 618-621, doi:10.1086/526500 (2008).
- 234 Pamer, E. G. TLR polymorphisms and the risk of invasive fungal infections. *The New England journal of medicine* **359**, 1836-1838, doi:10.1056/NEJMe0806412 (2008).
- 235 Grube, M. *et al.* TLR5 stop codon polymorphism is associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Medical mycology* **51**, 818-825, doi:10.3109/13693786.2013.809630 (2013).
- 236 Cunha, C. *et al.* Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood* **116**, 5394-5402, doi:10.1182/blood-2010-04-279307 (2010).
- 237 Chai, L. Y. *et al.* The Y238X stop codon polymorphism in the human beta-glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *The Journal of infectious diseases* **203**, 736-743, doi:10.1093/infdis/jiq102 (2011).
- 238 Cunha, C. *et al.* Genetic PTX3 deficiency and aspergillosis in stem-cell transplantation. *The New England journal of medicine* **370**, 421-432, doi:10.1056/NEJMoa1211161 (2014).
- 239 Wójtowicz A, L. T., Bibert S, Manuel O, Berger C, Boggian K et al PTX3 Polymorphisms are a major risk factor for invasive mold infection in solid organ transplantant recipients. *. ICAAC 2014 Meeting, September 2014, Washington, DC* (2014).
- 240 Granell, M. *et al.* Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation. *Experimental hematology* **34**, 1435-1441, doi:10.1016/j.exphem.2006.06.005 (2006).
- 241 Cunha, C. *et al.* Genetically-determined hyperfunction of the S100B/RAGE axis is a risk factor for aspergillosis in stem cell transplant recipients. *PLoS one* **6**, e27962, doi:10.1371/journal.pone.0027962 (2011).

- 242 Zaas, A. K. *et al.* Plasminogen alleles influence susceptibility to invasive aspergillosis. *PLoS genetics* **4**, e1000101, doi:10.1371/journal.pgen.1000101 (2008).
- 243 Marr, K. A. *et al.* Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *The Journal of infectious diseases* **190**, 641-649, doi:10.1086/422009 (2004).
- 244 Stephens, M. & Scheet, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *American journal of human genetics* **76**, 449-462, doi:10.1086/428594 (2005).
- 245 Chen, B., Wilkening, S., Drechsel, M. & Hemminki, K. SNP_tools: A compact tool package for analysis and conversion of genotype data for MS-Excel. *BMC research notes* **2**, 214, doi:10.1186/1756-0500-2-214 (2009).
- 246 Gabriel, S. B. *et al.* The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* **296**, 2225-2229, doi:10.1126/science.1069424 (2002).
- 247 JH, M. Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diagn* **4** (2004).
- 248 Nyholt, D. R. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *American journal of human genetics* **74**, 765-769, doi:10.1086/383251 (2004).
- 249 Mozo, L. *et al.* Glucocorticoids inhibit IL-4 and mitogen-induced IL-4R alpha chain expression by different posttranscriptional mechanisms. *The Journal of allergy and clinical immunology* **102**, 968-976 (1998).
- 250 Curtin, K., Wolff, R. K., Herrick, J. S., Abo, R. & Slattery, M. L. Exploring multilocus associations of inflammation genes and colorectal cancer risk using hapConstructor. *BMC medical genetics* **11**, 170, doi:10.1186/1471-2350-11-170 (2010).
- 251 Do, T. N., Ucisik-Akkaya, E., Davis, C. F., Morrison, B. A. & Dorak, M. T. An intronic polymorphism of IRF4 gene influences gene transcription in vitro and shows a risk association with childhood acute lymphoblastic leukemia in males. *Biochimica et biophysica acta* **1802**, 292-300, doi:10.1016/j.bbadis.2009.10.015 (2010).
- 252 Han, J. *et al.* A germline variant in the interferon regulatory factor 4 gene as a novel skin cancer risk locus. *Cancer research* **71**, 1533-1539, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1818 (2011).
- 253 Slattery, M. L., Lundgreen, A., Bondurant, K. L. & Wolff, R. K. Interferon-signaling pathway: associations with colon and rectal cancer risk and subsequent survival. *Carcinogenesis* **32**, 1660-1667, doi:10.1093/carcin/bgr189 (2011).

- 254 Seufert, B. L. *et al.* IkappaBkbeta and NFkappaB1, NSAID use and risk of colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry. *Carcinogenesis* **34**, 79-85, doi:10.1093/carcin/bgs296 (2013).
- 255 Wang, S., Yan, Q., Chen, P., Zhao, P. & Gu, A. Association of interferon regulatory factor 4 gene polymorphisms rs12203592 and rs872071 with skin cancer and haematological malignancies susceptibility: a meta-analysis of 19 case-control studies. *BMC cancer* **14**, 410, doi:10.1186/1471-2407-14-410 (2014).
- 256 Chen, W. J. *et al.* Nasopharyngeal shedding of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus is associated with genetic polymorphisms. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **42**, 1561-1569, doi:10.1086/503843 (2006).
- 257 Gregersen, P. K. *et al.* REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nature genetics* **41**, 820-823, doi:10.1038/ng.395 (2009).
- 258 Trynka, G. *et al.* Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signalling. *Gut* **58**, 1078-1083, doi:10.1136/gut.2008.169052 (2009).
- 259 Eyre, S. *et al.* Confirmation of association of the REL locus with rheumatoid arthritis susceptibility in the UK population. *Annals of the rheumatic diseases* **69**, 1572-1573, doi:10.1136/ard.2009.122887 (2010).
- 260 Varade, J. *et al.* Analysis of the REL polymorphism rs13031237 in autoimmune diseases. *Annals of the rheumatic diseases* **70**, 711-712, doi:10.1136/ard.2010.134593 (2011).
- 261 Bowes, J. *et al.* Comprehensive assessment of rheumatoid arthritis susceptibility loci in a large psoriatic arthritis cohort. *Annals of the rheumatic diseases* **71**, 1350-1354, doi:10.1136/annrheumdis-2011-200802 (2012).
- 262 Ellinghaus, E. *et al.* Genome-wide meta-analysis of psoriatic arthritis identifies susceptibility locus at REL. *The Journal of investigative dermatology* **132**, 1133-1140, doi:10.1038/jid.2011.415 (2012).
- 263 Ali, F. R. *et al.* An investigation of rheumatoid arthritis loci in patients with early-onset psoriasis validates association of the REL gene. *The British journal of dermatology* **168**, 864-866, doi:10.1111/bjd.12106 (2013).
- 264 Leung, G. *et al.* Cytokine candidate genes predict the development of secondary lymphedema following breast cancer surgery. *Lymphatic research and biology* **12**, 10-22, doi:10.1089/lrb.2013.0024 (2014).
- 265 Pan, W. *et al.* Identification of haplotype tag single nucleotide polymorphisms within the nuclear factor-kappaB family genes and

- their clinical relevance in patients with major trauma. *Crit Care* **19**, 95, doi:10.1186/s13054-015-0836-6 (2015).
- 266 Moore, J. H. Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diagn* **4**, 795-803, doi:10.1586/14737159.4.6.795 (2004).
- 267 Ritchie, M. D., Hahn, L. W. & Moore, J. H. Power of multifactor dimensionality reduction for detecting gene-gene interactions in the presence of genotyping error, missing data, phenocopy, and genetic heterogeneity. *Genetic epidemiology* **24**, 150-157, doi:10.1002/gepi.10218 (2003).
- 268 Liu, F., Chau, K. Y., Arlotta, P. & Ono, S. J. The HMG I proteins: dynamic roles in gene activation, development, and tumorigenesis. *Immunologic research* **24**, 13-29, doi:10.1385/IR:24:1:13 (2001).
- 269 Falkenberg, K. J. & Johnstone, R. W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature reviews. Drug discovery* **13**, 673-691, doi:10.1038/nrd4360 (2014).
- 270 Boddicker, R. L. *et al.* The oncogenic transcription factor IRF4 is regulated by a novel CD30/NF-kappaB positive feedback loop in peripheral T-cell lymphoma. *Blood* **125**, 3118-3127, doi:10.1182/blood-2014-05-578575 (2015).
- 271 Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics* **81**, 559-575, doi:10.1086/519795 (2007).
- 272 Patterson, N., Price, A. L. & Reich, D. Population structure and eigenanalysis. *PLoS genetics* **2**, e190, doi:10.1371/journal.pgen.0020190 (2006).
- 273 Ok, M., Einsele, H. & Loeffler, J. Genetic susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infections. *International journal of medical microbiology : IJMM* **301**, 445-452, doi:10.1016/j.ijmm.2011.04.013 (2011).
- 274 Asakura, Y. & Komatsu, T. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis. *The New England journal of medicine* **360**, 635; author reply 635-636 (2009).
- 275 de Boer, M. G. *et al.* Influence of polymorphisms in innate immunity genes on susceptibility to invasive aspergillosis after stem cell transplantation. *PloS one* **6**, e18403, doi:10.1371/journal.pone.0018403 (2011).
- 276 Carvalho, A., Santos, M., Maciel, P. & Rodrigues, F. T-1237C polymorphism of TLR9 gene is not associated with multiple sclerosis in the Portuguese population. *Mult Scler* **14**, 550-552, doi:10.1177/1352458507084594 (2008).
- 277 Martin MP, L. M., Hutcheson HB, Goedert JJ, Nelson GW, et al. Association of DC-SIGN promoter polymorphism with increased risk for

- parenteral, but not mucosal, acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **78**, 14053-14056 (2004).
- 278 Smith, M. W. *et al.* Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* **277**, 959-965 (1997).
- 279 Koizumi, Y. *et al.* RANTES -28G delays and DC-SIGN - 139C enhances AIDS progression in HIV type 1-infected Japanese hemophiliacs. *AIDS research and human retroviruses* **23**, 713-719, doi:10.1089/aid.2006.0225 (2007).
- 280 Kashima, S. *et al.* DC-SIGN (CD209) gene promoter polymorphisms in a Brazilian population and their association with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *The Journal of general virology* **90**, 927-934, doi:10.1099/vir.0.008367-0 (2009).
- 281 Mezger, M. *et al.* Investigation of promoter variations in dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) (CD209) and their relevance for human cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem-cell transplantation. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **14**, 228-234, doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01902.x (2008).
- 282 Vannberg, F. O. *et al.* CD209 genetic polymorphism and tuberculosis disease. *PloS one* **3**, e1388, doi:10.1371/journal.pone.0001388 (2008).
- 283 Ganachari, M. *et al.* Joint effect of MCP-1 genotype GG and MMP-1 genotype 2G/2G increases the likelihood of developing pulmonary tuberculosis in BCG-vaccinated individuals. *PloS one* **5**, e8881, doi:10.1371/journal.pone.0008881 (2010).
- 284 Flores-Villanueva, P. O. *et al.* A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* **202**, 1649-1658, doi:10.1084/jem.20050126 (2005).
- 285 Barreiro, L. B. *et al.* Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS medicine* **3**, e20, doi:10.1371/journal.pmed.0030020 (2006).
- 286 Ryan, E. J. *et al.* Variant in CD209 promoter is associated with severity of liver disease in chronic hepatitis C virus infection. *Human immunology* **71**, 829-832, doi:10.1016/j.humimm.2010.05.007 (2010).
- 287 Muhlbauer, M. *et al.* A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. *Gastroenterology* **125**, 1085-1093 (2003).

- 288 Park, B. L. *et al.* Association of common promoter polymorphisms of MCP1 with hepatitis B virus clearance. *Experimental & molecular medicine* **38**, 694-702, doi:10.1038/emm.2006.82 (2006).
- 289 Sakuntabhai, A. *et al.* A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nature genetics* **37**, 507-513, doi:10.1038/ng1550 (2005).
- 290 Chan, K. Y. *et al.* CD209 (DC-SIGN) -336A>G promoter polymorphism and severe acute respiratory syndrome in Hong Kong Chinese. *Human immunology* **71**, 702-707, doi:10.1016/j.humimm.2010.03.006 (2010).
- 291 De Pauw, B. *et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **46**, 1813-1821, doi:10.1086/588660 (2008).
- 292 Plantinga, T. S. *et al.* Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased candida colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **49**, 724-732, doi:10.1086/604714 (2009).
- 293 Hesselmar, B. *et al.* Interleukin-4 receptor polymorphisms in asthma and allergy: relation to different disease phenotypes. *Acta Paediatr* **99**, 399-403, doi:10.1111/j.1651-2227.2009.01631.x (2010).
- 294 Kim, K. *et al.* Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases* **69**, 1247-1250, doi:10.1136/ard.2009.117572 (2010).
- 295 Stappers, M. H. *et al.* Polymorphisms in cytokine genes IL6, TNF, IL10, IL17A and IFNG influence susceptibility to complicated skin and skin structure infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **33**, 2267-2274, doi:10.1007/s10096-014-2201-0 (2014).
- 296 Wang, D. *et al.* Functional polymorphisms of interferon-gamma affect pneumonia-induced sepsis. *PloS one* **9**, e87049, doi:10.1371/journal.pone.0087049 (2014).
- 297 Morris, G. A. *et al.* Interleukin 12B (IL12B) genetic variation and pulmonary tuberculosis: a study of cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. *PloS one* **6**, e16656, doi:10.1371/journal.pone.0016656 (2011).
- 298 Zhang, N. *et al.* Analysis of interleukin-8 gene variants reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for chronic

- periodontitis in the Han population. *PLoS one* **9**, e104436, doi:10.1371/journal.pone.0104436 (2014).
- 299 Bellocchio, S. *et al.* Immunity to *Aspergillus fumigatus*: the basis for immunotherapy and vaccination. *Medical mycology* **43 Suppl 1**, S181-188 (2005).
- 300 Phadke, A. P. & Mehrad, B. Cytokines in host defense against *Aspergillus*: recent advances. *Medical mycology* **43 Suppl 1**, S173-176 (2005).
- 301 Roilides, E., Uhlig, K., Venzon, D., Pizzo, P. A. & Walsh, T. J. Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infection and immunity* **61**, 1185-1193 (1993).
- 302 Chiang, L. Y., Sheppard, D. C., Gravelat, F. N., Patterson, T. F. & Filler, S. G. *Aspergillus fumigatus* stimulates leukocyte adhesion molecules and cytokine production by endothelial cells in vitro and during invasive pulmonary disease. *Infection and immunity* **76**, 3429-3438, doi:10.1128/IAI.01510-07 (2008).
- 303 Brieland, J. K. *et al.* Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity* **69**, 1554-1560, doi:10.1128/IAI.69.3.1554-1560.2001 (2001).
- 304 Cenci, E. *et al.* Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses. *The Journal of infectious diseases* **180**, 1957-1968, doi:10.1086/315142 (1999).
- 305 32(5):679-89. Immediate versus deferred empirical antifungal (IDEA) therapy in high-risk patients with febrile neutropenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **32(5)**, 679-689 (2013).
- 306 Mencacci, A. *et al.* Defective antifungal T-helper 1 (TH1) immunity in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation and its restoration by treatment with TH2 cytokine antagonists. *Blood* **97**, 1483-1490 (2001).
- 307 Hayden MS1, W. A., Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene.* **30**, 6758-6780 (2016).
- 308 Karin M, G. F. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews. Immunology* **5**, 749-759 (2005).
- 309 Oh, H. & Ghosh, S. NF-kappaB: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunological reviews* **252**, 41-51, doi:10.1111/imr.12033 (2013).

- 310 Burkly, L. *et al.* Expression of relB is required for the development of
thymic medulla and dendritic cells. *Nature* **373**, 531-536,
doi:10.1038/373531a0 (1995).
- 311 Abe, K. *et al.* Distinct contributions of TNF and LT cytokines to the
development of dendritic cells in vitro and their recruitment in vivo.
Blood **101**, 1477-1483, doi:10.1182/blood.V101.4.1477 (2003).
- 312 Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. & Baldwin, A.
S., Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-
IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**, 1680-
1683 (1998).
- 313 Karin, M. & Greten, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and
immunity to cancer development and progression. *Nature reviews.*
Immunology **5**, 749-759, doi:10.1038/nri1703 (2005).
- 314 Chen, C. C., Rosenbloom, C. L., Anderson, D. C. & Manning, A. M.
Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1,
and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I
kappa B-alpha phosphorylation. *J Immunol* **155**, 3538-3545 (1995).
- 315 Beinke, S. & Ley, S. C. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in
immune cell biology. *The Biochemical journal* **382**, 393-409,
doi:10.1042/BJ20040544 (2004).
- 316 Mambula, S. S., Sau, K., Henneke, P., Golenbock, D. T. & Levitz, S. M.
Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*.
The Journal of biological chemistry **277**, 39320-39326,
doi:10.1074/jbc.M201683200 (2002).
- 317 Bellocchio, S. *et al.* TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J*
Immunol **173**, 7406-7415 (2004).
- 318 Roeder, A. *et al.* Toll-like receptors as key mediators in innate
antifungal immunity. *Medical mycology* **42**, 485-498 (2004).
- 319 Serrano-Gomez, D. *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion
molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization
of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J*
Immunol **173**, 5635-5643 (2004).
- 320 LeibundGut-Landmann, S. *et al.* Syk- and CARD9-dependent coupling
of innate immunity to the induction of T helper cells that produce
interleukin 17. *Nature immunology* **8**, 630-638, doi:10.1038/ni1460
(2007).
- 321 Gringhuis, S. I. *et al.* Dectin-1 directs T helper cell differentiation by
controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk.
Nature immunology **10**, 203-213, doi:10.1038/ni.1692 (2009).
- 322 Rivera, A. *et al.* Dectin-1 diversifies *Aspergillus fumigatus*-specific T cell
responses by inhibiting T helper type 1 CD4 T cell differentiation. *The*
Journal of experimental medicine **208**, 369-381,
doi:10.1084/jem.20100906 (2011).

- 323 Bozza, S. *et al.* PTX3 binds MD-2 and promotes TRIF-dependent immune protection in aspergillosis. *J Immunol* **193**, 2340-2348, doi:10.4049/jimmunol.1400814 (2014).
- 324 Nicholson, W. J., Slight, J. & Donaldson, K. Inhibition of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 underlies loss of cytokine gene expression in rat alveolar macrophages treated with a diffusible product from the spores of *Aspergillus fumigatus*. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **15**, 88-96, doi:10.1165/ajrcmb.15.1.8679226 (1996).
- 325 Shahan, T. A., Sorenson, W. G., Paulauskis, J. D., Morey, R. & Lewis, D. M. Concentration- and time-dependent upregulation and release of the cytokines MIP-2, KC, TNF, and MIP-1alpha in rat alveolar macrophages by fungal spores implicated in airway inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **18**, 435-440, doi:10.1165/ajrcmb.18.3.2856 (1998).
- 326 Reid, D. M., Gow, N. A. & Brown, G. D. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Current opinion in immunology* **21**, 30-37, doi:10.1016/j.coi.2009.01.003 (2009).
- 327 Philippe, B. *et al.* Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infection and immunity* **71**, 3034-3042 (2003).
- 328 Hu, H. *et al.* Noncanonical NF-kappaB regulates inducible costimulator (ICOS) ligand expression and T follicular helper cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 12827-12832, doi:10.1073/pnas.1105774108 (2011).
- 329 Sun, S. C. The noncanonical NF-kappaB pathway. *Immunological reviews* **246**, 125-140, doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x (2012).
- 330 Powolny-Budnicka, I. *et al.* RelA and RelB transcription factors in distinct thymocyte populations control lymphotoxin-dependent interleukin-17 production in gammadelta T cells. *Immunity* **34**, 364-374, doi:10.1016/j.immuni.2011.02.019 (2011).
- 331 Geijtenbeek, T. B. & Gringhuis, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature reviews. Immunology* **9**, 465-479, doi:10.1038/nri2569 (2009).
- 332 Vallabhapurapu, S. & Karin, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology* **27**, 693-733, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132641 (2009).
- 333 Plato, A., Willment, J. A. & Brown, G. D. C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. *International reviews of immunology* **32**, 134-156, doi:10.3109/08830185.2013.777065 (2013).

- 334 Bajana, S., Turner, S., Paul, J., Ainsua-Enrich, E. & Kovats, S. IRF4 and IRF8 Act in CD11c+ Cells To Regulate Terminal Differentiation of Lung Tissue Dendritic Cells. *J Immunol* **196**, 1666-1677, doi:10.4049/jimmunol.1501870 (2016).
- 335 Schlitzer, A. *et al.* IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* **38**, 970-983, doi:10.1016/j.immuni.2013.04.011 (2013).
- 336 Williams, J. W. *et al.* Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nature communications* **4**, 2990, doi:10.1038/ncomms3990 (2013).
- 337 van der Velden, W. J., Blijlevens, N. M. & Donnelly, J. P. Genetic variants and the risk for invasive mould disease in immunocompromised hematology patients. *Current opinion in infectious diseases* **24**, 554-563, doi:10.1097/QCO.0b013e32834ab1f4 (2011).
- 338 Lupianez, C. B. *et al.* Polymorphisms in Host Immunity-Modulating Genes and Risk of Invasive Aspergillosis: Results from the AspBIOmics Consortium. *Infection and immunity* **84**, 643-657, doi:10.1128/IAI.01359-15 (2015).
- 339 Lai, Z. W., Pineau, T. & Esser, C. Identification of dioxin-responsive elements (DREs) in the 5' regions of putative dioxin-inducible genes. *Chemico-biological interactions* **100**, 97-112 (1996).
- 340 Jeon, M. S. & Esser, C. The murine IL-2 promoter contains distal regulatory elements responsive to the Ah receptor, a member of the evolutionarily conserved bHLH-PAS transcription factor family. *J Immunol* **165**, 6975-6983 (2000).
- 341 Quintana, F. J. Regulation of central nervous system autoimmunity by the aryl hydrocarbon receptor. *Seminars in immunopathology* **35**, 627-635, doi:10.1007/s00281-013-0397-1 (2013).
- 342 Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M. & Duarte, J. H. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annual review of immunology* **32**, 403-432, doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120245 (2014).
- 343 Nguyen, N. T., Hanieh, H., Nakahama, T. & Kishimoto, T. The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses. *International immunology* **25**, 335-343, doi:10.1093/intimm/dxt011 (2013).
- 344 Hanieh, H. Toward understanding the role of aryl hydrocarbon receptor in the immune system: current progress and future trends. *BioMed research international* **2014**, 520763, doi:10.1155/2014/520763 (2014).
- 345 Kolluri, S. K., Weiss, C., Koff, A. & Gottlicher, M. p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in

- developing thymus and hepatoma cells. *Genes & development* **13**, 1742-1753 (1999).
- 346 Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B. & Bradfield, C. A. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annual review of pharmacology and toxicology* **40**, 519-561, doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.519 (2000).
- 347 Antoniv, T. T. & Ivashkiv, L. B. Interleukin-10-induced gene expression and suppressive function are selectively modulated by the PI3K-Akt-GSK3 pathway. *Immunology* **132**, 567-577, doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03402.x (2011).
- 348 Bessede, A. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* **511**, 184-190, doi:10.1038/nature13323 (2014).
- 349 Caffrey, A. K. *et al.* IL-1alpha signaling is critical for leukocyte recruitment after pulmonary *Aspergillus fumigatus* challenge. *PLoS pathogens* **11**, e1004625, doi:10.1371/journal.ppat.1004625 (2015).
- 350 Lass-Flörl, C., Roilides, E., Löffler, J., Wilflingseder, D. & Romani, L. Minireview: host defence in invasive aspergillosis. *Mycoses* **56**, 403-413, doi:10.1111/myc.12052 (2013).
- 351 Lionakis, M. S. *et al.* CX3CR1-dependent renal macrophage survival promotes *Candida* control and host survival. *The Journal of clinical investigation* **123**, 5035-5051, doi:10.1172/JCI71307 (2013).
- 352 Faure, S. *et al.* Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science* **287**, 2274-2277 (2000).
- 353 Break, T. J. *et al.* CX3CR1 is dispensable for control of mucosal *Candida albicans* infections in mice and humans. *Infection and immunity* **83**, 958-965, doi:10.1128/IAI.02604-14 (2015).
- 354 Zeller, T. *et al.* Genetics and beyond--the transcriptome of human monocytes and disease susceptibility. *PLoS one* **5**, e10693, doi:10.1371/journal.pone.0010693 (2010).
- 355 Westra, H. J. *et al.* Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nature genetics* **45**, 1238-1243, doi:10.1038/ng.2756 (2013).