



ULPGC

**Facultad de Ciencias de la Salud
Departamento de Ciencias Clínicas**

**Influencia genética de las proteínas
surfactantes SP-A y SP-D en la
neumonía, la gripe A (H1N1) 2009 y el
asma alérgico**

Tesis Doctoral

Estefanía Herrera Ramos

**Las Palmas de Gran Canaria
2015**



Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento/Instituto/Facultad Departamento de Ciencias Clínicas

Programa de doctorado Salud pública: Epidemiología, nutrición y planificación

Título de la Tesis

Influencia genética de las proteínas surfactantes SP- A y SP-D

en la neumonía, la gripe por A (H1N1) 2009 y el asma alérgico.

Tesis Doctoral presentada por D^a Estefanía Herrera Ramos

Dirigida por el Dr. D. José Carlos Rodríguez Gallego

Dirigida por el Dra. D^a. Teresa Carrillo Díaz

Dirigida por el Dr. D. Felipe Rodríguez de Castro

El Director,

(firma)

La Directora,

(firma)

El Director,

(firma)

La Doctoranda,

(firma)

Las Palmas de Gran Canaria, a 20 de Julio de 2015



Don JOSÉ CARLOS RODRÍGUEZ GALLEGO, Doña TERESA CARRILLO
DÍAZ y Don FELIPE RODRÍGUEZ DE CASTRO, Profesores de la Facultad de
Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

CERTIFICAN

Que el trabajo de investigación titulado “Influencia genética de las proteínas surfactantes SP-A y SP-D en la neumonía, la gripe por A (H1N1) 2009 y el asma alérgico”, ha sido realizado por doña Estefanía Herrera Ramos, bajo nuestra dirección y asesoramiento, considerando que es apto para su defensa ante tribunal y reúne las condiciones exigibles para optar al grado de doctor.

Y para que así conste, extendemos el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria, a 20 de julio de 2015.

Fdo.:



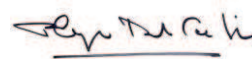
José Carlos Rodríguez Gallego

Fdo.:



Teresa Carrillo Díaz

Fdo.:



Felipe Rodríguez de Castro





Dedicado a mi familia.

***A las personas que me quieren,
a las que tienen curiosidad,
a las que no dejan de hacer lo que pueden,
y a los que valoran y respetan la vida.***



Para empezar quiero mostrar mi agradecimiento a la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por la beca concedida y el posterior contrato como personal investigador en formación, así como al Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al Dr. José Carlos Rodríguez-Gallego, él me dio la oportunidad de trabajar codo con codo y me ofreció su confianza, siempre recordaré las discusiones y el buen entendimiento que hemos tenido estos años. El apoyo de la Dra. Teresa Carrillo Díaz y del Dr. Felipe Rodríguez de Castro ha sido fundamental, su gran profesionalidad y su capacidad de trabajo han sido un ejemplo a seguir. Tengo muchísimo que agradecerles.

Debo agradecer y felicitar tanto a mis directores como a la Dra. María Isabel García-Laorden, al Dr. Jordi Solé-Violán y a todos los colaboradores por la gran labor profesional que desempeñan, por tener la capacidad y las ganas de crear el grupo de investigación del que me han permitido formar parte, desde el año 2009. La sección de Genética y Biología Molecular del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín es donde se han desarrollado la mayor parte de las determinaciones experimentales de esta Tesis Doctoral y donde he pasado muchas horas en las que he podido compartir muchos momentos, tengo que dar las gracias a mis compañeros: a Ana, por ser una de las mejores trabajadoras y compañeras que conozco, además de una excelente persona; a Nereida y a Yanira (bautizadas como *Las Siames* tenían la capacidad de funcionar como una entidad capaz de hacer lo que se les propusiera) y a Marta. También a las personas con las que he coincidido por temporadas. Comenzando por la entrada al servicio, a Tony, a Florentino; a Maika (por las buenas vibraciones siempre, y por ser amiga); a Rita, a Belén, a IsaMo, a Candy y a Ruth (por las risas y los buenos ratos en los desayunos); A Marinieves (por tener siempre buena predisposición); A la *super*, a M^a Carmen Quintana (por ser nuestra *pinchadora* para todo y por muchos momentos); a Esther Santiago, a M^a Carmen Marrero, a Pilar, a M^a Carmen Acevedo, a Esther Robaina y Juan Carlos; y a Maite e Ithaisa (de las que admiro profundamente el esfuerzo y la dedicación como biólogas, les doy las gracias por lo aprendido, lo compartido y lo que queda). Por supuesto, no podía dejar atrás a Judith Noda-Mayor, a la que tengo también mucho que agradecer.

He aprendido mucho gracias a las personas de otros Servicios del HUGCDN que me han permitido la colaboración con ellos durante estos años: Servicio de Medicina Intensiva (José Alberto Marcos y José María Ferrer), Servicio de Medicina Interna (José Juan Ruíz, *Pipi*), Servicio de Alergia (David Cruz-Niesvaara, Isadora Suárez, José Cumplido y Gloria), Servicio de Reumatología (Íñigo Rúa-Figueroa), Servicio de Radioterapia (Luis Henríquez-Hernández,

Almudena Valenciano y Pedro Lara) y a todos los que trabajan en la Unidad de Investigación, en especial a Miguel Ángel García-Bello por saber compartir sus conocimientos y por las risas entre datos, y también a Eduardo Torrealba, a Francisco Rodríguez-Esparragón, a Érica, a Nuria Cabrera y a Charlín Méndez por el apoyo mostrado siempre. No me olvido de lo que hicieron por mí Celsi, Guillermo, Tere, Dunia, Susi y otras personas encantadoras del Servicio de Hematología. Imprescindible ha sido la compañía y apoyo de mis *compis* de por las tardes, Vidina y Nati. En los últimos meses, tengo que agradecer a Sveltana Pavlovic por nuestras reuniones alentadoras en el materno. Muchas gracias a todos.

Debo mencionar a Aixa Rodríguez Bello (y a las personas con las que colaboré del departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de la Laguna en mi último año de carrera: Yurena, Idaira, Ricardo, Tere), a Leandro Fernández de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, tengo que agradecerles mucho por lo aprendido, y porque ellos me dieron las primeras oportunidades, para mí muy valiosas, en el área de la investigación biosanitaria.

Largo y duro ha sido este camino, pero muchas son las personas que me han ayudado, siempre me he sentido arropada y querida. Así, la palabra GRACIAS me sabe a poco para mis padres (Santito y Clotilde) y mis hermanos (Yaiza y Tomás) porque TODO en mis 30 años de vida se lo debo a ellos. Como no, también para mi amor incondicional (Daniel) y su familia, porque compartida la mitad de nuestras vidas, también es la mía. Tampoco es suficiente para mi sobrino (Víctor), capaz de renovarme con una sonrisa (ni para su padre).

Me siento muy afortunada, tengo la suerte de contar con mis cuatro abuelos y es un auténtico privilegio tener la familia que tengo. GRACIAS a TODOS, por entenderme y comprender mis ausencias durante todo este tiempo. A mis primos/as, a mis tíos/as, a mis padrinos y hasta a nuestras mascotas. Por supuesto, tampoco olvido agradecer el apoyo de los que no son familia, pero como si lo fueran (Ye, Yas, La, las *chiquillas*, los *chiquillos*, las *bioamiguis*, los *rototom* y demás amigos/as que saben quiénes son, con especial reconocimiento a Paloma (mi abogada particular) que de forma voluntaria ha querido, entre otras cosas, compartir conmigo su tiempo y que sus domingos pasasen a ser, los conocidos como, “domingos de Tesis”).

Se sacrifican muchísimas horas de nuestras vidas en esta profesión. Así que tengo que dar las GRACIAS a todos por entender mi vocación y por haber estado siempre apoyándome.





ÍNDICE

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

ÍNDICE DE TABLAS

ABREVIATURAS

BREVE HISTORIA

INTRODUCCIÓN 1

1.1	BASE TEÓRICA	3
1.1.1	<i>Tracto respiratorio, líquido surfactante e inmunidad innata pulmonar</i>	3
1.1.2	<i>Proteínas asociadas al surfactante: SP-A y SP-D</i>	8
1.1.2.1	Estructura y organización proteica	9
1.1.2.2	Estructura y organización genómica	12
1.1.2.3	Funciones.....	15
1.2	ANTECEDENTES.....	23
1.2.1	<i>Estudios de asociación.....</i>	23
1.2.2	<i>Estudios experimentales</i>	26

HIPÓTESIS 32

OBJETIVOS..... 33

MÉTODOS 34

2.1	SELECCIÓN DE LAS POBLACIONES INCLUIDAS EN LOS ESTUDIOS	35
2.1.1	<i>Diagnóstico y recolección de datos de pacientes</i>	35
2.1.2	<i>Reclutamiento de población general.....</i>	36
2.2	DETERMINACIONES EXPERIMENTALES	36
2.2.1	<i>Determinaciones genéticas</i>	36
2.2.1.1	Extracción del ADN	36
2.2.1.2	Selección de polimorfismos.....	37
2.2.1.3	Técnicas de tipaje molecular.....	41
2.2.1.3.1	SNPs de <i>SFTPA1</i> y de <i>SFTPA2</i>	41
2.2.1.3.2	SNPs de <i>SFTPD</i>	43
2.2.2	<i>Determinaciones séricas</i>	46
2.3	HERRAMIENTAS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS.....	49

ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA.....	52
2.4 EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA Y DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	52
2.5 NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD - ESTUDIO I	58
2.5.1 <i>Pacientes</i>	59
2.5.2 <i>Hipótesis</i>	63
2.5.3 <i>Objetivos</i>	63
2.5.4 <i>Resultados</i>	64
2.5.5 <i>Discusión</i>	70
2.5.6 <i>Conclusiones</i>	74
2.6 GRIPE PANDEMICA POR A (H1N1) 2009 - ESTUDIO II	78
2.6.1 <i>Pacientes</i>	80
2.6.2 <i>Hipótesis</i>	83
2.6.3 <i>Objetivos</i>	83
2.6.4 <i>Resultados</i>	84
2.6.5 <i>Discusión</i>	91
2.6.6 <i>Conclusiones</i>	93
2.7 ASMA Y ALERGIA A LOS ÁCAROS - ESTUDIO III	96
2.7.1 <i>Pacientes</i>	100
2.7.2 <i>Hipótesis</i>	104
2.7.3 <i>Objetivos</i>	104
2.7.4 <i>Resultados</i>	105
2.7.5 <i>Discusión</i>	114
2.7.6 <i>Conclusiones</i>	123
CONCLUSIONES	124
BIBLIOGRAFÍA	126
ANEXOS	139
PUBLICACIONES.....	146



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Las 20 primeras causas de muerte prematura a nivel mundial en 2012.....	1
Ilustración 2. Principales receptores reconocedores de patrones en vías respiratorias.....	7
Ilustración 3. Imagen cristalográfica de homotrímeros de SP-D.	9
Ilustración 4. Representación simplificada de la estructura polipeptídica de SP-A.	10
Ilustración 5. Estructura y organización proteica de SP-A.	10
Ilustración 6. Estructura y organización proteica de la SP-D.	11
Ilustración 7. Distribución de los genes <i>SFTPA1</i> , <i>SFTPA2</i> y <i>SFTPD</i> en el brazo <i>q</i> del cromosoma 10.	12
Ilustración 8. Estructura de los genes y mapa de polimorfismos.	14
Ilustración 9. Función de la SP-A y la SP-D en ausencia de agentes patógenos.	16
Ilustración 10. Función de la SP-A y la SP-D en presencia de agentes patógenos.	17
Ilustración 11. Interacción de los dominios N-terminal y CRD con diferentes moléculas.	19
Ilustración 12. Polimorfismos no sinónimos y sus combinaciones en haplotipos.	38
Ilustración 13. Polimorfismos seleccionados para el estudio del gen que codifica la SP-D (<i>SFTPD</i>).	40
Ilustración 14. Visión ultravioleta tras realizar la electroforesis en gel de agarosa al 2% (I).	42
Ilustración 15. Visión ultravioleta tras realizar la electroforesis en gel de agarosa al 2% (II).	43
Ilustración 16. PCR a tiempo real en SNPs que no producen cambio de aminoácido en el gen <i>SFTPD</i> . ..	45
Ilustración 17. PCR a tiempo real de SNPs que producen cambio de aminoácido en el gen <i>SFTPD</i>	46
Ilustración 18. Curva de calibración para la extrapolación de los datos a la concentración de SP-D.	48
Ilustración 19. Herramientas utilizadas para el análisis y representación de los datos.	49
Ilustración 20. Desequilibrio de ligamiento (D') de <i>SFTPA2</i> , <i>SFTPA1</i> y <i>SFTPD</i> en PGE.....	53
Ilustración 21. Desequilibrio de ligamiento (r^2) en <i>SFTPA2</i> , <i>SFTPA1</i> y <i>SFTPD</i> en PGE.....	53
Ilustración 22. Frecuencias genotípicas en pacientes y en sujetos de la PGE (I).	64
Ilustración 23. Significación estadística de las comparaciones alélicas (I).	66
Ilustración 24. Diagrama de selección de pacientes (II).	81
Ilustración 25. Frecuencias genotípicas en pacientes y en sujetos de la PGE (II).	84
Ilustración 26. Significación estadística de las comparaciones alélicas (II).	86
Ilustración 27. Diagrama de selección de pacientes (III).	102
Ilustración 28. Frecuencias genotípicas en pacientes y en sujetos de la PGE (III).	105
Ilustración 29. Significación estadística de las comparaciones alélicas (III).	107

ÍNDICE DE TABLAS

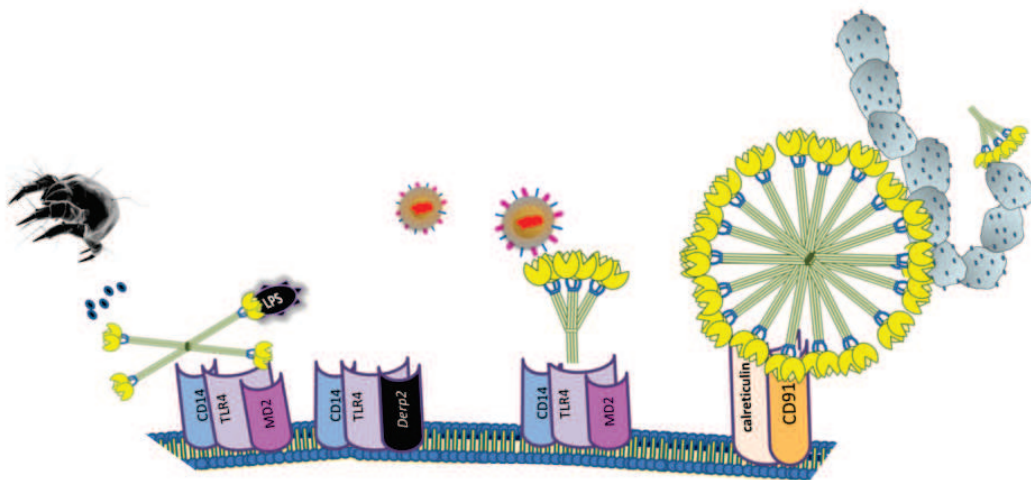
Tabla 1. Información de SNPs funcionales de <i>SFTPA2</i> , <i>SFTPA1</i> y <i>SFTPD</i>	39
Tabla 2. Condiciones de PCR, reactivos y <i>primers</i> (I).	41
Tabla 3. Condiciones de PCR, reactivos y <i>primers</i> (II).	42
Tabla 4. Datos de identificación de SNPs y de sus ensayos de genotipado.....	44
Tabla 5. Datos de los calibradores, los controles positivos y el negativo (blanco).	48
Tabla 6. Distribución de frecuencias alélicas en distintas poblaciones.	54
Tabla 7. Frecuencias genotípicas en la población general española.	55
Tabla 8. Frecuencias haplotípicas en la población general española.	55
Tabla 9. Características clínicas de los pacientes (I).	62
Tabla 10. Asociaciones haplotípicas de <i>SFTPA2-SFTPA1</i> (I).	67
Tabla 11. Asociaciones haplotípicas de <i>SFTPD</i> (I).	68
Tabla 12. Asociaciones haplotípicas de <i>SFTPA2-SFTPA1-SFTPD</i> (I).	69
Tabla 13. Características clínicas de los pacientes (II).	82
Tabla 14. Asociaciones haplotípicas de <i>SFTPA2-SFTPA1</i> (II).	87
Tabla 15. Asociaciones haplotípicas de <i>SFTPD</i> (II).	88
Tabla 16. Asociaciones haplotípicas de <i>SFTPA2-SFTPA1-SFTPD</i> (II).	89
Tabla 17. Análisis haplotípico con el parámetro funcional Pa_2/FIO_2	90
Tabla 18. Características clínicas de los pacientes (III).	103
Tabla 19. Asociaciones haplotípicas de <i>SFTPA2-SFTPA1</i> (III).	108
Tabla 20. Asociaciones haplotípicas de <i>SFTPD</i> (III).	109
Tabla 21. Asociaciones haplotípicas de <i>SFTPA2-SFTPA1-SFTPD</i> (III).	109
Tabla 23. Asociaciones de los SNPs con el porcentaje de FEV_1	111
Tabla 23. Impacto de los SNPs de <i>SFTPD</i> en la concentración de SP-D.	113
Tabla 24. Correlación de la SP-D sérica con el porcentaje de FEV_1 en pacientes alérgicos.	114

ABREVIATURAS

	INGLÉS	ESPAÑOL
AIV	<i>A Influenza Virus</i>	virus influenza A
APACHE II	<i>acute physiology and chronic health evaluation II score</i>	predicador de gravedad APACHE II
ARIA	<i>allergic rhinitis and its impact on asthma</i>	rinitis alérgica y su impacto en el asma
ARMS-PCR	<i>amplification-refractory mutation system</i>	amplificación refractaria para la detección de mutaciones
CD	<i>cluster differentiation</i>	cluster differentiation
CR	<i>complement receptor</i>	receptor del complemento
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>	dominio de reconocimiento de carbohidratos
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen</i>	antígeno 4 del linfocito T citotóxico
DPPC	<i>dipalmitoyl phosphatidylcholine</i>	dipalmitoilfosfatidilcolina
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	ácido etilidiaminotetraacético
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>	inmunoensayo de absorción ligado a enzimas
FEV1	<i>forced expired volume in 1 second</i>	volumen de aire expirado durante el primer segundo
GINA	<i>global initiative for asthma</i>	iniciativa global por el asma
gp-340	<i>glycoprotein 340</i>	glicoproteína 340
GWAS	<i>genome wide association studies</i>	estudios de asociación de genoma completo
HND	<i>human neutrophil defensins</i>	defensinas producidas por neutrófilos humanos
HWE	<i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>	equilibrio de Hardy-Weinberg
ILC	<i>innate lymphoid cell</i>	células linfoides innatas
ISAAC	<i>international study of asthma and allergies in childhood</i>	estudio internacional del asma y las alergias en la infancia
LAIR1	<i>leukocyte-associated Ig-like receptor-1</i>	receptor 1 de tipo Inmunoglobulina asociado al leucocito
LD	<i>linkage disequilibrium</i>	desequilibrio de ligamiento
LPS	<i>lipopolysaccharide</i>	lipopolisacárido
LRP1	<i>low density lipoprotein-related protein 1</i>	proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
MAF	<i>minor allele frequency</i>	alelo menos frecuente
MBL	<i>mannose-binding lectin</i>	lectina de unión a manosa
MD2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>	factor 2 de diferenciación mieloide
MFAP4	<i>microfibril-associated protein 4</i>	proteína 4 asociada a la microfibrilla
MMP9	<i>matrix metalloproteinase 9</i>	metaloproteinas 9 (gelatinasa B)
MPO	<i>myeloperoxidase</i>	mieloperoxidasa
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>	trampas extracelulares de neutrófilos
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>	patrones moleculares asociados a patógenos
PC	<i>phosphatidylcholine</i>	fosfatidilcolina
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	reacción en cadena polimerasa
PE	<i>phosphatidylethanolamine</i>	fosfatidiletanolamina
PG	<i>phosphatidylglycerol</i>	fosfatidilglicerol
PI	<i>phosphatidylinositol</i>	fosfatidilinositol
pRDS	<i>prematurely born infants with respiratory distress syndrome</i>	síndrome de dificultad respiratoria en el recién nacido
PRR	<i>pattern-recognition receptor</i>	receptores reconocedores de patrones
PS	<i>phosphatidylserine</i>	fosfatidilserina
PVP	<i>primary viral pneumonia</i>	neumonía viral primaria
RFLP-PCR	<i>restriction fragment length polymorphism PCR</i>	PCR con cortes con enzimas de restricción
rhSPD	<i>recombinant human SP-D</i>	SP-D humana recombinante
SHP	<i>Src homology protein tyrosine phosphatase</i>	fosfatasa con un dominio que tiene una región homóloga a Src
SIRPα	<i>signal inhibitory regulatory protein alpha</i>	proteína de señal reguladora alfa
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>	polimorfismos de un sólo nucleótido
SP	<i>surfactant protein</i>	proteína surfactante
SPR210	<i>specific 210-kDa SP-A receptor</i>	receptor de 210 Kda específico para SP-A
SSP-PCR	<i>sequence-specific primers PCR</i>	PCR con <i>primers</i> de secuencia específica
TLR	<i>Toll like receptors</i>	receptores de membrana tipo Toll

	ESPAÑOL
A	adenina
AAI	alergia y asma intermitente
AAP	alergia y asma persistente
ADN	ácido desoxirribonucleico
Arg	arginina
ARN	ácido ribonucleico
ASA	alergia sin asma
ASAP	alergia sin asma persistente
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
C	citosina
CEIC	comité ético de investigación clínica
CI	intervalo
Cys	cisteína
Derp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FMO	fallo multiorgánico
G	guanina
HA	hemaglutinina
HUGCDN	Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín
IDP	inmunodeficiencia primaria
Ig	inmunoglobulina
Ile	isoleucina
IMC	índice de masa corporal
IRA	insuficiencia respiratoria aguda
Met	metionina
N	tamaño muestral
NA	neuraminidasa
NAC	neumonía adquirida en la comunidad
OR	odds ratio
OMS	organización mundial de la salud
pb	pares de bases
PGE	población general española
PNAC	NAC neumocócica
SDRA	síndrome de distrés respiratorio agudo
T	timina
Thr	treonina
UCI	unidad de cuidados intensivos
Val	valina
VRS	virus respiratorio sincitial

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación personal concedida en la convocatoria de ayudas para becas de postgrado y contratos 2009 del Programa propio de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria para personal investigador en formación (PIF); y gracias a la financiación material por proyectos concedidos en convocatorias competitivas promovidas por la Fundación Canaria de Investigación (FUNCIS 04/2010 - *Inmunidad innata pulmonar en la susceptibilidad a la infección respiratoria comunitaria bacteriana y viral grave*), por el Fondo de investigación Sanitaria (FIS PI12/01565 *Proteínas surfactantes pulmonares A1, A2, B, C y D e inflamación pulmonar: infección y asma alérgico*), Instituto de Carlos III y por la ayuda a la investigación concedida por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR 186/2012).



**Influencia genética de las
proteínas surfactantes
SP-A y SP-D en la neumonía,
la gripe por A (H1N1) 2009 y el
asma alérgico**

ESTEFANÍA HERRERA RAMOS

**Año 2015
Las Palmas de Gran Canaria**

BREVE HISTORIA

En el segundo cuarto del siglo XX, se realizaron experimentos con el principal microorganismo causal de la neumonía (*Streptococcus pneumoniae*) desarrollados por Frederick Griffith, y continuados por Oswald Avery, mostraron que las cepas virulentas tenían una capa rugosa y poseían la capacidad de transformar en virulentas a las que no lo eran. Estos autores hallaron, como causante de esta transformación, un material de naturaleza desoxirribonucleica (Avery et al., 1944). Pocos años más tarde, Rosalind Franklin obtendría la imagen cristalográfica que supondría la base para el nacimiento de la genética molecular. Se trataba de lo que conocemos como ácido desoxirribonucleico (ADN), cuya estructura fue descrita y publicada finalmente en 1953 (Watson y Crick, 1953). En esa época, también preocupaba otra enfermedad del tracto respiratorio de gran impacto: la enfermedad de la membrana hialina, que provocaba la muerte de niños prematuros tras sufrir el conocido como síndrome de distrés respiratorio infantil (pRDS, *prematurely born infants with respiratory distress syndrome*) (Claireaux, 1953).

A finales de la década de los 50, Mary Ellen Avery descubrió la presencia de una sustancia que se segregaba en los pulmones antes del nacimiento y que era imprescindible para la respiración del recién nacido. Además, propuso que se podría introducir en los pulmones un líquido que disminuyera la tensión superficial alveolar (Avery et al., 1959). Fue un descubrimiento clave para la elaboración de terapias que permitieron acabar con la alta mortalidad debida a esta enfermedad (Avery, 1972). En los años 70, se demostró que la administración de surfactante natural era efectiva en el modelo de conejo con pRDS y descubrieron que, aunque su naturaleza era mayoritariamente lipídica, también contenía proteínas (Enhorning et al., 1973). A finales de los años 80 se empezaron a utilizar surfactantes naturales como terapia para el pRDS (Fujiwara et al., 1980, Namgung et al., 1989).

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades del tracto respiratorio abarcan condiciones agudas, como la neumonía, la bronquitis o la gripe, y crónicas, como el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) señala a las infecciones de las vías respiratorias inferiores como la segunda causa de mortalidad prematura a nivel mundial, como se muestra en la **ilustración 1**.

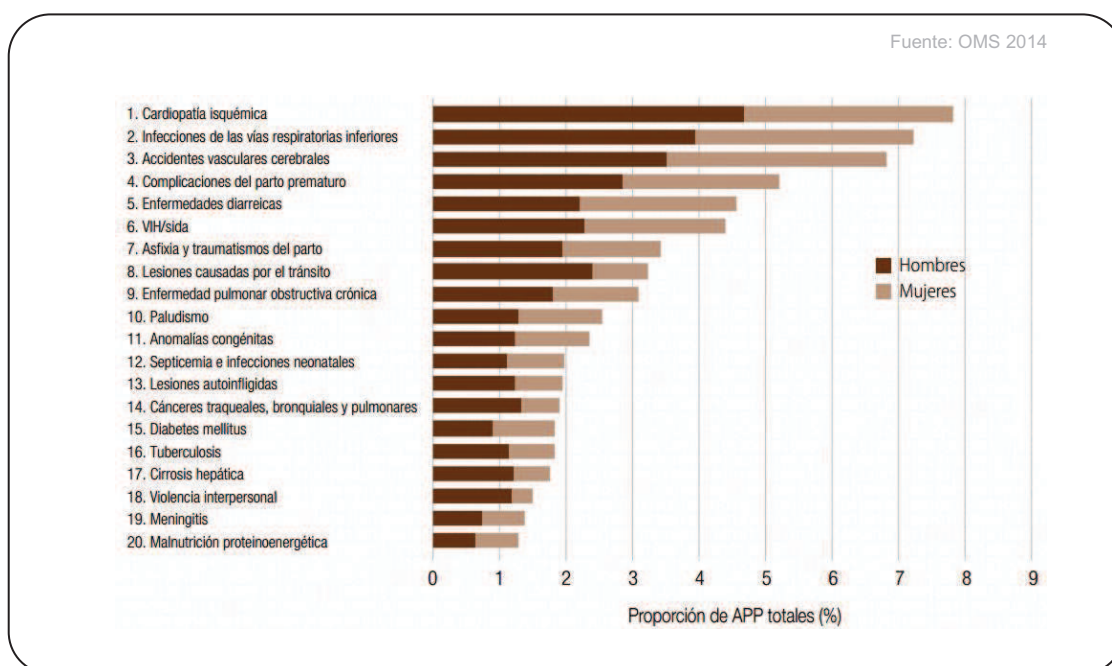


Ilustración 1. Las 20 primeras causas de muerte prematura a nivel mundial en 2012.

APP: años perdidos por muerte prematura. La proporción de años de vida perdidos por muerte prematura se calcula multiplicando el número de muertes en cada edad, por la esperanza de vida mundial normalizada para la edad a la que se produce la muerte. http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/en/.

La incidencia de enfermedades pulmonares es un problema de considerable importancia en todo el mundo, por esto los estudios se centran en revertir, detener o minimizar estas enfermedades. No todos los individuos en situación de riesgo las padecen, por lo que se ha planteado que la variabilidad individual, en particular, la variabilidad genética, puede estar jugando un papel en el grado de susceptibilidad que presentan los individuos.

El desarrollo de ciertas enfermedades parece estar influenciado, además de por factores externos, por nuestro propio material genético. Cada vez es más evidente que la variabilidad genética humana influye de forma determinante en la susceptibilidad o en la gravedad de muchas entidades

nosológicas. Los estudios de epidemiología genética buscan identificar las asociaciones existentes entre el genoma y las enfermedades. En la actualidad, existen diversos tipos de estudios que permiten detectar variantes genéticas: los estudios de asociación de genoma completo (GWAS, *genome wide association studies*), los estudios de ligamiento en familiares mediante pruebas de transmisión del desequilibrio y los estudios de genes candidatos. En estos últimos se buscan variantes en genes elegidos por hipótesis y/o plausibilidad biológica que puedan ser útiles como marcadores genéticos.

Se sabe que uno de los mecanismos que subyace en la variabilidad genética que presenta cada individuo depende del sobrecruzamiento de cromosomas homólogos y de la recombinación del material genético de sus progenitores. Las variaciones polimórficas heredadas son un mecanismo básico para la capacidad de adaptación y la estabilidad de la especie. Estos polimorfismos pueden ser de distintos tipos y constituyen la forma más común de variación genética. Tras múltiples generaciones, las variantes que llegan a consolidarse en la población, pueden ser silentes, llegar a proporcionar ciertas ventajas o, por el contrario, contribuir al desarrollo de enfermedades (Guttmacher y Collins, 2002, Guttmacher et al., 2010). Los polimorfismos más frecuentes son producidos por el cambio en un *locus* de un nucleótido (A: adenina, C: citosina, G: guanina y T: timina) por otro y se conocen como polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*) o de una sola base. La mayoría son marcadores bialélicos y existen en regiones con alta densidad de marcadores que suelen ser representados mediante la creación de mapas de alta resolución. Por una cuestión espacial, existe menos probabilidad de que se hayan producido entrecruzamientos entre los marcadores que están muy cercanos por esto, frecuentemente, presentan desequilibrio de ligamiento (LD) entre ellos, o lo que es lo mismo, se heredan juntos. Este fenómeno se representa a través de mapas de desequilibrio genético, donde se pueden analizar las relaciones entre polimorfismos, así como seleccionar el número mínimo de polimorfismos en una región que aporta la máxima información de la misma. El uso de variantes como marcadores se ha visto favorecido por la aparición de nuevos métodos y técnicas automatizadas que permiten analizar miles de muestras a la vez.

La penetrancia de un genotipo se define por la probabilidad que tiene el portador de presentar manifestaciones clínicas (Zlotogora, 2003). Las inmunodeficiencias convencionales o congénitas son enfermedades mendelianas, monogénicas, que se caracterizan porque los individuos presentan mutaciones (una o varias, en un único gen o fragmento cromosómico) que pueden ser detectadas por seguir un modelo de herencia simple, a menudo pero no siempre, de alta penetrancia. Numerosos estudios han demostrado que mutaciones en componentes del sistema inmune pueden aumentar la susceptibilidad a padecer ciertas infecciones, neoplasias y enfermedades autoinmunes. En enfermedades multifactoriales muchas veces no se encuentra una única mutación causal sino distintas variantes heredadas que pueden ser explicadas por un modelo complejo de baja penetrancia (Frazer et al., 2009).

1.1 Base Teórica

A continuación, se describe el tracto respiratorio y el líquido surfactante pulmonar, profundizando en la localización, estructura, variabilidad y función de las proteínas surfactantes A y D: SP-A y la SP-D.

1.1.1 Tracto respiratorio, líquido surfactante e inmunidad innata pulmonar

La mayoría de los agentes externos penetran en el organismo por las vías aéreas superiores que comprenden las fosas nasales, la faringe y la laringe. Las vías aéreas inferiores incluyen, la tráquea y los bronquios. Los pulmones se disponen como dos masas esponjosas situadas en la caja torácica. Se encuentran irrigados por los vasos sanguíneos, esenciales en el intercambio gaseoso, que conectan el sistema respiratorio con el sistema circulatorio. Dentro de cada pulmón, los bronquios principales van subdividiéndose hasta

llegar a las vías aéreas de menor calibre, llamados bronquiolos terminales, que acaban en estructuras denominadas alveolos. A su vez, los alveolos se encuentran rodeados de capilares para garantizar la correcta difusión de los gases respiratorios a través de la barrera hemato-gaseosa o membrana alveolo-capilar. El epitelio alveolar es plano y está compuesto por dos tipos de células, los neumocitos tipo I y II, que recubren aproximadamente el 90% de la superficie alveolar (aunque suponen menos del 10% del total de las células presentes en el pulmón). Estos neumocitos se diferencian aproximadamente entre la semana 24 y la 34 de gestación en el humano, y son células especializadas en sintetizar y secretar el surfactante pulmonar, un fluido importante para evitar el colapso alveolar tras la espiración (Jobe, 2002).

El surfactante pulmonar es un complejo de proteínas y lípidos que mantiene la integridad alveolar y juega un papel importante en la defensa pulmonar y en el control de la inflamación. Su principal función es reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido del interior del alveolo y prevenir el colapso alveolar. Está compuesto por, aproximadamente, un 90-92% de lípidos y un 8-10% de proteínas (Perez-Gil y Weaver, 2010, Postle et al., 2001). Los fosfolípidos son el componente mayoritario de este líquido alveolar, principalmente la fosfatidilcolina (PC) y la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), siendo este último un componente clave en la reducción de la tensión superficial. El fosfatidilglicerol (PG) también está presente de manera abundante y el resto consiste en fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y otros fosfolípidos y lípidos no fosforilados como el colesterol y los triglicéridos (Floros y Phelps, 1997). Los fosfolípidos del surfactante son sintetizados por vías similares a las encontradas en otras células y tejidos, pero con algunas modificaciones para generar un alto contenido en fosfatidilcolinas monoenoicas (ácidos monoinsaturados o con sólo un doble enlace).

Los fosfolípidos del surfactante ayudan a preservar la superficie donde se produce el intercambio gaseoso. Son tres las principales funciones biofísicas: 1) prevenir el colapso de los alveolos al final de la espiración y facilitar la inspiración (actúan reorganizando las moléculas de agua de la fase acuosa en la superficie alveolar); 2) evitar la formación de edema pulmonar por filtración

de plasma desde los capilares (actúan sobre la compensación del equilibrio de las fuerzas hidrostáticas), y 3) mejorar el transporte mucociliar y la traslocación de partículas hacia la hipofase. Además de las acciones anteriores, otra función importante es facilitar la eliminación de partículas de restos celulares del alveolo para disminuir la tensión superficial durante la fase final de la espiración.

El principal papel del surfactante, por tanto, es evitar el colapso de los alveolos. Además, interviene en la regulación de la respuesta inflamatoria provocada por el material exógeno que llega a las vías aéreas y a la interfase aéro-acuosa del pulmón. Aunque se trata de un fluido de naturaleza mayoritariamente lipídica, la fracción proteica supone alrededor de la décima parte de su composición. Las cuatro proteínas descritas en el surfactante se dividen en dos grupos según su hidrofobicidad. Las proteínas surfactantes (SP, *surfactant protein*) A y D (SP-A y SP-D), son proteínas hidrofílicas y juegan un importante papel en la defensa inmunológica primaria como colectinas (Griese, 1999, Crouch, 1998, Hawgood y Poulain, 2001, Crouch y Wright, 2001). La SP-A es la más abundante (supone el 3-4% de la masa de surfactante) e influye en la estructura extracelular que hay en el alveolo y en la formación y secreción de la mielina tubular (proveniente de los cuerpos lamelares producidos por los neumocitos tipo II (Wang et al., 2010). La SP-A y la SP-D intervienen también en la homeostasis del surfactante y resultan esenciales en el mantenimiento de la función normal del pulmón (Botas et al., 1998, Ikegami et al., 2000, Hawgood y Poulain, 2001). Las SPs hidrofóbicas, SP-B y SP-C, están involucradas principalmente en la prevención del colapso alveolar por su capacidad de disminuir la tensión superficial. Por un lado, la SP-C estabiliza el surfactante y es capaz de participar en la inmunidad innata al unir lipopolisacáridos (LPS) (Augusto et al., 2003, Glasser et al., 2001). Por otro lado, la expresión alterada de SP-B se relaciona, en numerosos estudios, con enfermedades pulmonares agudas y crónicas, y su ausencia, como ocurre en el pRDS, es incompatible con la vida (deMello y Lin, 2001, Nogee, 2004, Whitsett, 2010).

En conjunto, los pulmones cuentan con unos 150 m² de extensión organizada. Se trata de una gran superficie de contacto con el aire, diseñada para conseguir una respiración exitosa, que continuamente está recibiendo

material exterior (Driscoll, 2006). Los diversos tipos de células que recubren el pulmón sintetizan y secretan gran abundancia de fluidos, proteínas antimicrobianas y mucinas, su número y actividad secretora están influenciados por la lesión y la infección. Las glándulas submucosas también están revestidas por muchos tipos de células, incluyendo células mioepiteliales, células serosas, células caliciformes, células basales y células ciliadas, que en conjunto secretan fluidos y otras proteínas de defensa del huésped sobre la superficie de las vías respiratorias, en situación basal y en respuesta a estímulos ambientales.

En general, existen dos vías de defensa en el organismo. La inmunidad innata cuenta con componentes que logran desencadenar una respuesta rápida que carece de especificidad y de memoria, es la primera línea de defensa del organismo. La segunda, conocida como la inmunidad adquirida, debe ser activada y, para ello, varias células de la inmunidad innata, tras el procesamiento de material extraño, exponen péptidos específicos de patógenos previamente procesados. El reconocimiento de estos activa la inmunidad adquirida por células T, desencadenando respuestas inmunitarias a nivel celular (distintos tipos de células T) y humoral (células B), que se caracteriza por presentar capacidad de adaptabilidad al antígeno, especificidad y memoria específica. Además, las vías aéreas cuentan con células inmunitarias especializadas que actúan mediante mecanismos innatos. Destaca el papel que ejercen los macrófagos alveolares, los granulocitos, las células dendríticas y, las recientemente descritas, células linfoides innatas (ILCs, *innate lymphoid cells*) (Whitsett y Alenghat, 2015). El pulmón queda protegido por fluidos con moléculas que intervienen en la defensa como las defensinas, la lisozima, la lactoferrina, los péptidos antimicrobianos y la SP-A y la SP-D.

Existe un grupo de proteínas, producidas por las células innatas, que puede funcionar como receptores reconocedores de patrones (PRR, *pattern-recognition receptor*). La gestión de señales, a través de estos PRR, para reconocer esos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular pattern*), es un mecanismo de la inmunidad

innata que se relaciona con el control de la respuesta de los linfocitos T y B y que, por tanto, también repercute en la inmunidad adquirida.

Los PRRs se pueden encontrar asociados a la membrana, dentro de la célula o en forma soluble (ver **ilustración 2**). Los PRR solubles, que residen en un lugar inmunoprivilegiado como el pulmón, actúan frecuentemente, como opsoninas. Un grupo de moléculas que pueden funcionar como PRRs son las lectinas. Las lectinas tienen la capacidad de eliminar de manera silenciosa las células muertas y el material celular originado por la actividad fagocítica y degradatoria de los macrófagos u otras células fagocíticas, reduciendo la inflamación y ayudando a evitar respuestas autoinmunes. Es el caso de la SP-A y la SP-D, principales PRRs solubles presentes en el pulmón (Vasta, 2009).

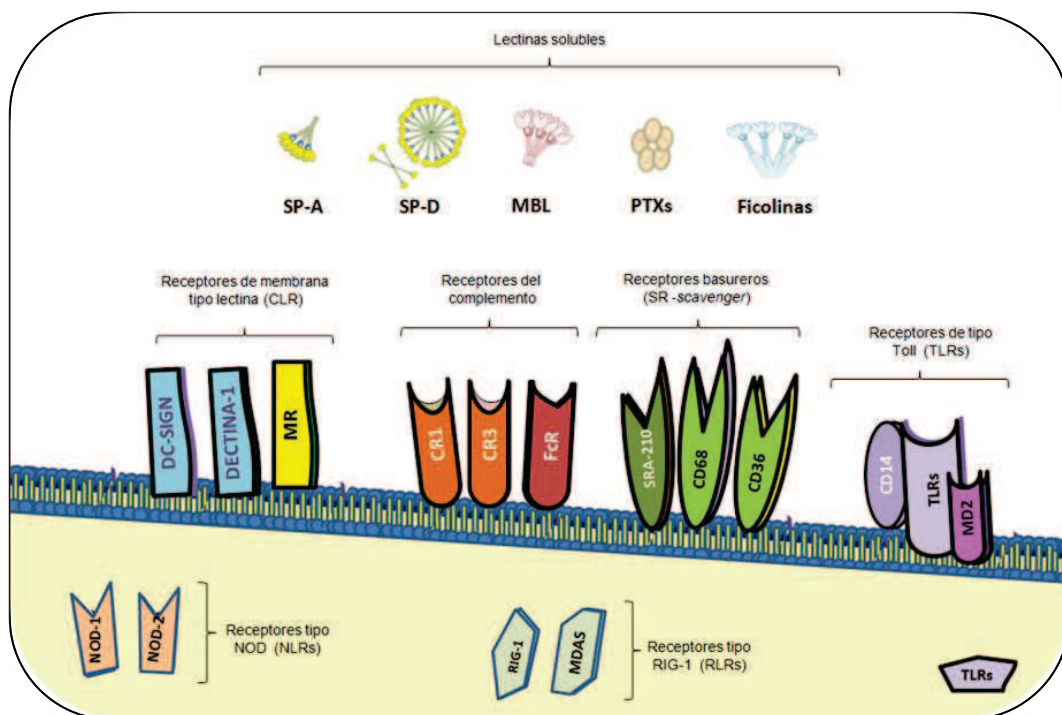


Ilustración 2. Principales receptores reconocedores de patrones en vías respiratorias.

SP: surfactant protein, MBL: mannan binding lectin, PTX: pentraxins, MR: mannose receptors, CR: complement receptor, FcR: Fc receptors, SRA-210: surfactant protein receptor 210, CD: cluster differentiation, TLR: toll like receptor, MD2: myeloid differentiation 2, NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2, RIG-1: retinoic acid-inducible gene 1 y MDA5: melanoma differentiation-associated protein 5.

1.1.2 Proteínas asociadas al surfactante: SP-A y SP-D

Pertenecen a la familia de lectinas tipo C, concretamente al ya mencionado subgrupo de las colectinas. Se caracterizan por tener una región colágeno y un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD, *carbohydrate recognition domain*) dependiente de calcio. Estas proteínas se expresan, en un principio, en la membrana coriónica del feto y, más tarde, principalmente en los pulmones. Las células epiteliales respiratorias, tanto en las vías aéreas superiores como en las inferiores, son las encargadas de su producción, aunque también son sintetizadas por células epiteliales de otros tejidos extra-pulmonares. Así, las células epiteliales del intestino grueso y delgado (Rubio et al., 1995), de la trompa de Eustaquio (Paananen et al., 1999), de la tráquea, de la próstata, del páncreas y del timo (Madsen et al., 2003) expresan SP-A. También se ha detectado en la mucosa vaginal (MacNeill et al., 2004), en el lacrimal (Brauer et al., 2007), en las glándulas parótidas (Brauer et al., 2009), en las encías y en la saliva (Brauer et al., 2012). La SP-D está presente, así mismo, en superficies mucosas. Es secretada por los neumocitos de tipo II y por las células exocrinas bronquiales, aunque su síntesis tampoco está restringida sólo a un grupo de células del pulmón. La sintetizan también células epiteliales de la piel, del esófago, del intestino y del tracto urinario, de los conductos grandes y pequeños de las glándulas salivares, parótidas y lacrimales, de los conductos de la vesícula biliar, conductos biliares intrahepáticos y de los conductos pancreáticos exocrinos (Madsen et al., 2000).

La SP-A y la SP-D poseen la capacidad de regular la respuesta inflamatoria pero también se unen a los fosfolípidos del surfactante mediante su CRD, lo que contribuye a disminuir la tensión superficial de la interfase aéreo-acuosa en el alveolo (García-Verdugo et al., 2002).

El surfactante, como sistema altamente especializado exclusivo del pulmón, permite el intercambio gaseoso y el control inmunológico. Se ha comprobado que, tanto el cambio cualitativo como cuantitativo en su composición o en sus funciones, provoca alteraciones respiratorias (Floros y Phelps, 1997, Floros y Kala, 1998, Floros y Wang, 2001, Whitsett, 2010).

1.1.2.1 Estructura y organización proteica

La estructura primaria de SP-A y SP-D incluye un extremo amino, rico en cisteínas, una región compuesta por repeticiones de tripletes Gly-X-Y y un extremo carboxilo terminal. Su estructura secundaria ha perdido la secuencia denominada péptido señal (necesaria para que se produzcan las modificaciones postraduccionales de las proteínas en el retículo endoplasmático antes de ser secretadas al exterior celular), correspondiente con el plegamiento de los residuos aminoacídicos cercanos mediante puentes de hidrógeno. Consta de un extremo N-terminal; una región rica en conjuntos de triple hélice, denominado dominio colágeno; una región llamada bisagra o cuello con α -hélices superenrolladas, y un dominio tipo lectina C que de manera homotrimérica formará la región conocida como CRD.

La distribución tridimensional o estructura terciaria hace que la proteína sea funcional. Los puentes disulfuro entre los residuos de las subunidades polipeptídicas ayudan a que se empaqueten de tres en tres, como unidad trimérica (ver **ilustración 3**), para después conformar estructuras de mayor peso molecular.

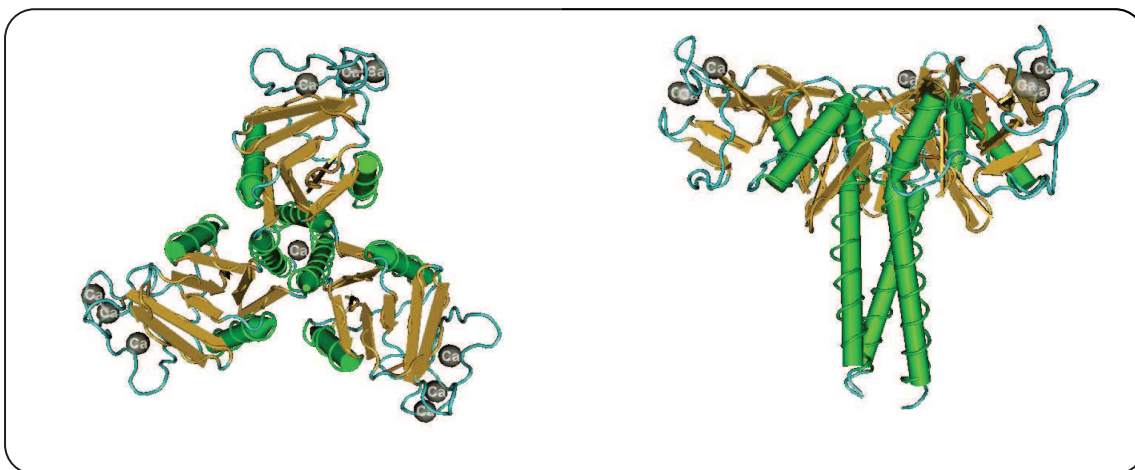


Ilustración 3. Imagen cristalográfica de homotrímeros de SP-D.

Imagen cristalográfica de un trímero de SP-D obtenida por el software Cn3d y con la información disponible en la base datos de proteínas RCSC PDB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank*). A la izquierda, vista superior, tres CRDs con calcio unido. A la derecha, de perfil, se diferencian las regiones bisagra (estructuras verdes cortas) y las de tipo colágeno (estructuras verdes largas). La región terminal del trímero no está representada porque no se encuentra en ninguna de las imágenes disponibles, <http://www.rcsb.org/pdb/> (Berman et al., 2000).

La SP-A está formada por polipéptidos codificados por dos genes altamente homólogos, *SFTPA1* y *SFTPA2*. Tanto SP-A1 como SP-A2 se encuentran en la proteína final y en forma de homo o hetero-oligómeros. Cada una de las unidades polipeptídicas está compuesta por 248 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 26 kDa (ver **ilustración 4**).

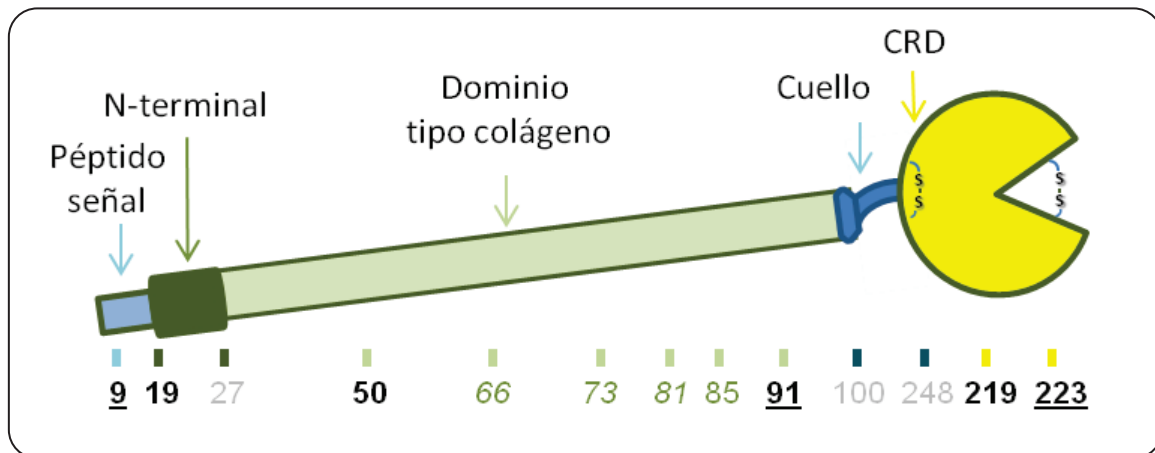


Ilustración 4. Representación simplificada de la estructura polipeptídica de SP-A.

En la parte superior se observan la longitud y la configuración de los dominios de la proteína. En la parte inferior, los números corresponden al lugar consecutivo que ocupa cada aminoácido cuando es traducido: los números que se encuentran en negro y subrayados se corresponden con los cambios producidos por SNPs en *SFTPA2*, mientras que en **negro** pero sin subrayar se representan cambios en *SFTPA1*; los números en *verde* representan los aminoácidos en los que difieren estos dos genes de alta homología y los números en gris son los que limitan los dominios de la proteína.

La SP-A funcional cuenta con seis unidades triméricas que se asocian para formar una molécula de 630 kDa compuesta por 18 cadenas polipeptídicas dispuestas en una estructura hexamérica (octodecámeros), como se representa en la **ilustración 5**.

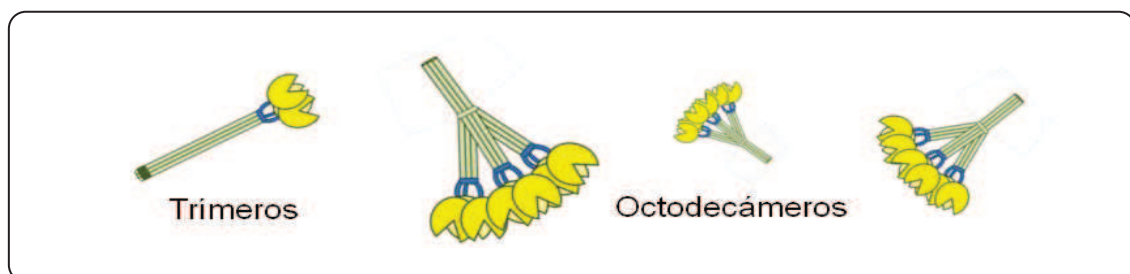


Ilustración 5. Estructura y organización proteica de SP-A.

Organización de las unidades polipeptídicas. Trímeros supramerizados en octodecámeros.

La SP-D es codificada exclusivamente por el gen *SFTPD*. En este caso, cada cadena polipeptídica está formada por 365 aminoácidos que se agregan para dar lugar a formas de mayor peso molecular. En el retículo endoplasmático primero se ensambla el CRD, después los monómeros empiezan a trimerizarse por el dominio bisagra y, finalmente mediante puentes disulfuro, logran una estructura de dodecámero estable. Antes de ser secretada, en el aparato de Golgi se produce la maduración de la proteína mediante N-glicosilación (O'Reilly et al., 1988). En la **ilustración 6** se representa su estructura compuesta por oligómeros de subunidades de 130 kDa (tres cadenas polipeptídicas idénticas de 43 kDa) que se empaquetan en estructuras tetraméricas de 12 cadenas polipeptídicas (cuatro subunidades homotriméricas unidas por la región N-terminal) (Holmskov et al., 2003, Kishore et al., 2006). La agregación de más unidades hace que, en una misma estructura, a través de los dominios tipo colágeno y N-terminal, se forme una estructura de organización superior, con mayor peso molecular y ensamblada de forma estable. Parece que la variación en las formas estructurales en las que se presentan la estructura de estas proteínas tiene implicaciones funcionales.

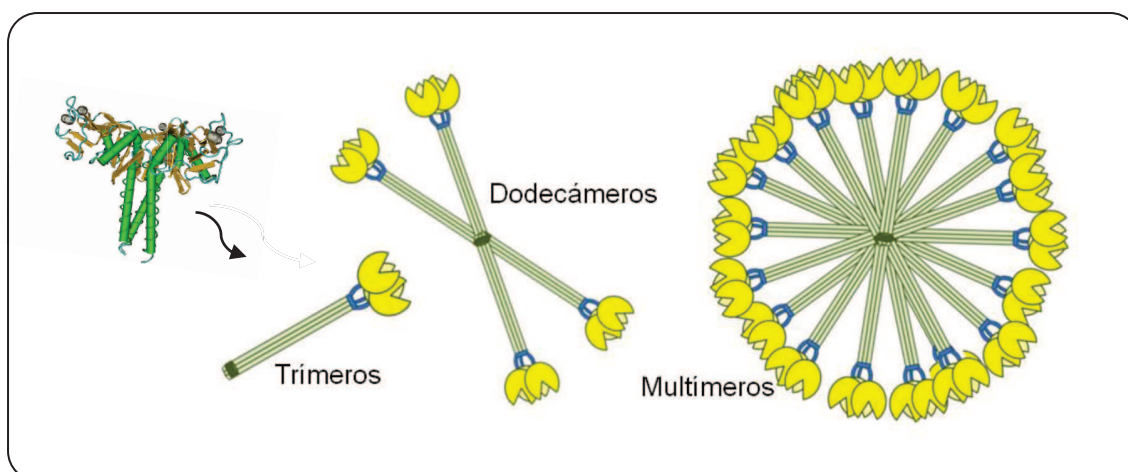


Ilustración 6. Estructura y organización proteica de la SP-D.

Organización de las unidades polipeptídicas en trímeros, que a su vez son supramerizados en dodecámeros, que en una organización superior llevan a la formación de multímeros en forma de diente de león o asterisco.

1.1.2.2 Estructura y organización genómica

El genoma cuenta con aproximadamente 3,2 billones de pares de bases. A partir de estudios de diversidad nucleotídica, en 2001 se estimaba que, como promedio, existía un polimorfismo común por cada 1.331 pares de bases (pb). Aunque se había logrado detectar 1,4 millones de SNPs, su número teórico en el genoma humano seguía estimándose en unos 3-4 millones, y el inferido aplicando la teoría neutral clásica de genética evolutiva alcanzaba los 11 millones (Kruglyak y Nickerson, 2001). Estos números hacen referencia a polimorfismos presentes, como mínimo, en el 1% de la población mundial. Sin embargo, en la última actualización de una de las bases de datos genómicas más completas, *USCS browser*, ya están descritos 12,8 millones de SNP, 31.848 genes y alrededor de 82.960 transcritos (Karolchik et al., 2014).

La SP-A está codificada por dos genes funcionales (*SFTPA2* y *SFTPA1*) mientras que la SP-D está codificada, como ya se ha mencionado con anterioridad, por un único gen (*SFTPD*) localizado en la misma región del brazo largo del cromosoma 10 (ver **ilustración 7**).

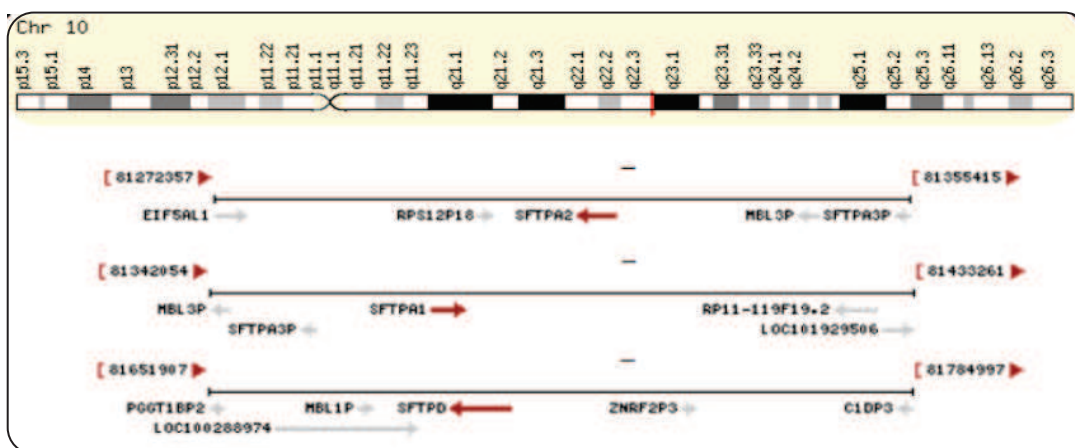


Ilustración 7. Distribución de los genes *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* en el brazo q del cromosoma 10.

Los genes que codifican la SP-A y SP-D se encuentran en la región central del brazo largo (q) del cromosoma 10 (10q22.3 según la base de datos online de genomas *Ensembl*) (Flicek et al., 2014) formando parte de lo que en terminología genética se denomina *cluster*.

Los dos genes, *SFTPA2* y *SFTPA1*, presentan LD y exhiben una organización genómica similar. Se transcriben y traducen produciendo la subunidad polipeptídica descrita, que se ensambla para conformar la proteína funcional. Estos genes contienen cuatro exones codificantes, tres exones no codificantes e intrones. Se transcriben de manera opuesta y en la actualidad hay descritos cuatro y seis transcritos alternativos para cada gen. SP-A1 y SP-A2 difieren en cuatro nucleótidos de la región codificante que hacen que las posiciones de los aminoácidos 66, 73, 81 y 85 sean *Met* (metionina), *Asp* (ácido aspártico), *Ile* (isoleucina) y *Cys* (cisteína) para SP-A1 y *Thr* (treonina), *Asn* (asparagina), *Val* (valina) y *Arg* (arginina) para SP-A2 (Floros y Hoover, 1998, DiAngelo et al., 1999) (ver **ilustración 4**). También presentan SNPs que se distribuyen en las regiones codificantes -que pueden provocar cambios en el péptido señal, en el dominio tipo colágeno o en el CRD-, o en regiones que no se traducen y que flanquean ambos genes, como regiones 3'UTR y 5'UTR (Floros et al., 2009, Wang et al., 2005)

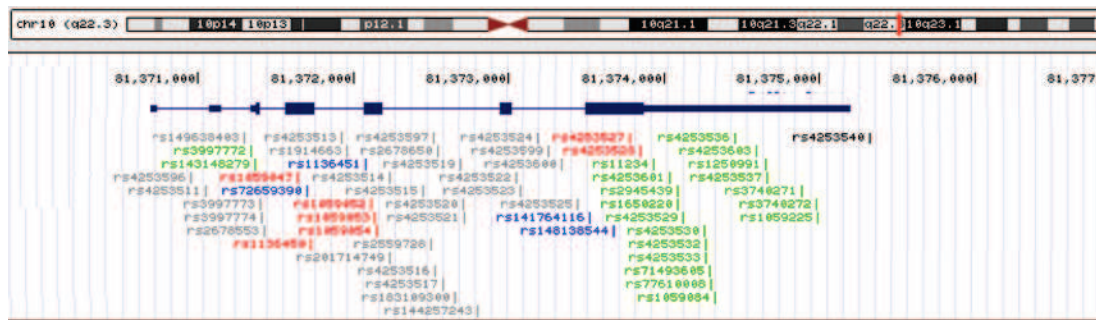
Otros mamíferos, como los roedores, tienen un solo gen, denominado *Sftpa* (ahora *Sftpa1*) para codificar la SP-A, por lo que se cree que se produjo una duplicación por inversión segmental de 10q22.3 en el linaje de los primates (Kuhl et al., 2008), resultando en dos genes parálogos. En humanos, la combinación de ambos productos génicos es fundamental para adquirir la conformación nativa (Sanchez-Barbero et al., 2007), aunque se ha visto que la relación SP-A1/SP-A2 se encuentra alterada en algunas enfermedades, y puede variar entre individuos (Tagaram et al., 2007, Hickling et al., 1998).

La información proporcionada por internet permite a la comunidad académica y científico-médica el acceso a bases de datos de secuencias genómicas de alta calidad para la investigación (*UCSC Genome Browser*). En estas bases se incluye información de regiones codificantes y no codificantes de recursos como *RefSeq*, *GenBank*, y *CCDS* (Kent et al., 2002). En la **ilustración 8**, se muestran los sitios polimórficos descritos actualmente.

← SFTPA2



SFTPA1 →



← SFTPD

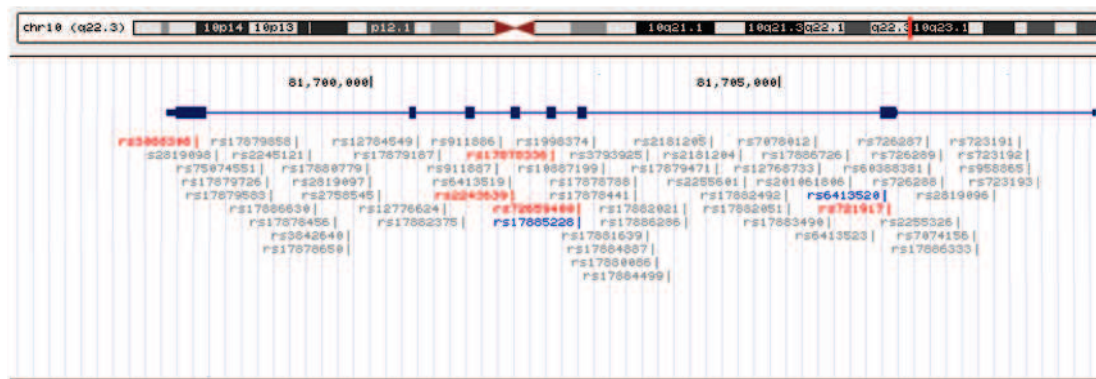


Ilustración 8. Estructura de los genes y mapa de polimorfismos.

Representación gráfica de la estructura de los genes. Para cada gen, la línea fina de color azul representa los intrones del gen, las áreas más gruesas representan los exones codificantes y las intermedias los no codificantes. Los SNPs están identificados por su número identificador rs y por el tipo: no sinónimos (rojo), sinónimos (azul), de regiones UTR (verde) o de regiones intrónicas (gris), (<http://genome.ucsc.edu>). En la parte inferior de cada figura se muestra la distribución de los polimorfismos descritos.

1.1.2.3 Funciones

Las funciones de las SPs están vinculadas con su capacidad de unión y de interacción con otras moléculas. Pueden unirse a lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y a proteínas (ya sean solubles o que estén actuando como receptores). Por tanto, la SP-A y la SP-D son capaces de interaccionar con una amplia gama de microorganismos, células apoptóticas y otros materiales orgánicos complejos, además de poseer la capacidad de modular la función de los leucocitos para mejorar aún más la eliminación de los agentes patógenos (Hickling et al., 2004).

Numerosas partículas entran por las vías aéreas y una de las principales funciones de la SP-A y la SP-D es mantener al pulmón en estado quiescente (anti-inflamatorio) en ausencia de agentes dañinos. Para ello, se unen a una proteína reguladora de la superficie de los neutrófilos y macrófagos, la llamada proteína de señal reguladora alfa (SIRP α , *signal inhibitory regulatory protein α*). También pueden unirse a receptores de membrana tipo Toll (TLR, *Toll like receptors*). Concretamente, a TLR2 y TLR4 (que se encargan de reconocer patrones moleculares comunes tanto de bacterias gram positivas como de gram negativas), evitando su señalización. La SP-D se une a dominios extracelulares de TLR2 y TLR4 bloqueándolos a través de su CRD (por un mecanismo de unión diferente al del PI y el LPS). También se une directamente a SIRP α , con lo que inhibe una importante vía de activación para la síntesis de citocinas inflamatorias (ver **ilustración 9**) mediante la activación de factores de transcripción como el NF- κ B (Wright, 2005).

El SIRP α es un receptor inhibidor cuya activación conduce a la inhibición de varias funciones importantes de células mieloides tales como la fagocitosis por los macrófagos y la producción de citocinas. Este receptor consta de un dominio transmembrana y de una cola citoplasmática con un inmunoreceptor inhibidor con un motivo basado en tirosina. En algunas células, se ha demostrado que interactúa con las proteínas tirosina fosfatasas SHP-1 y SHP-2 (SHP, *Src homologue protein*), que interviene en las vías de señalización reguladas por las tirosina quinasas, donde se conduciendo a la inhibición de la

activación del p38. Se ha confirmado que la SP-D se une al SIRP α expresado en neutrófilos humanos por el dominio de membrana distal D3, mientras que el otro ligando conocido del SIRP α , CD47, se une al dominio distal D1. Esto indica que existen múltiples sitios de unión en el SIRP- α para ligandos funcionales, lo que permitiría la regulación diferencial de la función del receptor (Fournier et al., 2012).

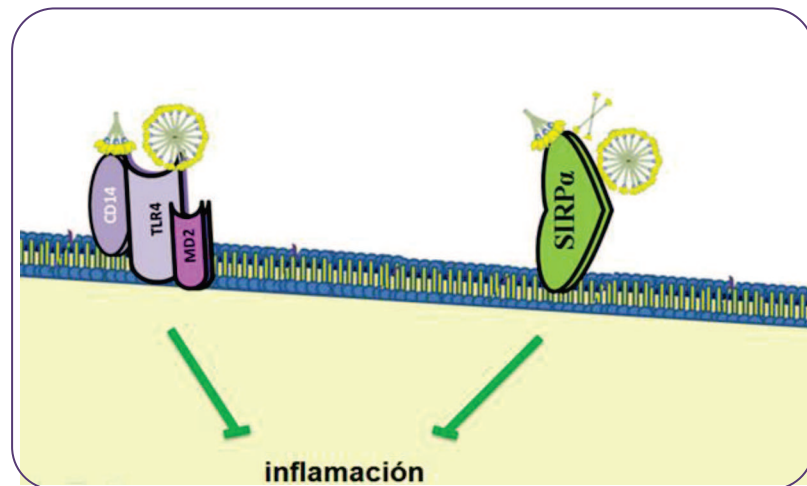


Ilustración 9. Función de la SP-A y la SP-D en ausencia de agentes patógenos. Representación gráfica del bloqueo de receptores producido por la SP-A y la SP-D para mantener un estado antiinflamatorio. El complejo CD14-TLR4 es intervenido por la SP-D y el receptor SIRP α es bloqueado por la unión tanto de la SP-A como de la SP-D.

El CD14 (CD, *cluster differentiation 14*) es ligando de la SP-A y la SP-D. Éste se expresa en monocitos, macrófagos y neutrófilos y muestra una alta afinidad por el LPS aunque también interactúa con otros productos microbianos. El CD14 no posee dominio intracelular y puede encontrarse en forma soluble o en la membrana celular. Su localización en la membrana es consecuencia de su capacidad de unión a TLR2 y TLR4, formando los complejos CD14-TLR2 y CD14-TLR4. Por un lado, SP-A reconoce el componente peptídico de CD14 mediante su dominio bisagra y por otro lado, la SP-D se une a carbohidratos por el dominio tipo lectina. Ambas son capaces de alterar las interacciones LPS/CD14 (Sano et al., 2000, Sano et al., 2000). Además de unirse a TLR2 y TLR4, la SP-A se une directamente al factor 2 de diferenciación mieloide (MD-2, *myeloid differentiation factor 2*), lo que provoca la alteración directa de la unión de éste con sus ligandos. Se ha encontrado que la SP-A modula la unión de LPS al complejo de superficie de TLR4 y MD-2 y altera la respuesta celular inducida por LPS. Aunque el CRD está implicado

en la interacción de la SP-A con TLR4 y MD-2, se ha visto en un estudio experimental que la forma trimérica que consta sólo del CRD y el dominio bisagra no es suficiente como molécula inmunomoduladora, por lo que se cree que la oligomerización supratrimérica es importante para la función de defensa del huésped (Yamada et al., 2006).

Si SP-A o SP-D se encuentran con algún agente extraño (**ilustración 10**), esta vez actúan activando esos receptores TLRs a la vez que, mediante la unión del dominio colágeno al complejo de calreticulina/CD91 logran la síntesis de citocinas proinflamatorias. El CD91 es una proteína transmembrana que también es conocido como LRP1 (*low-density lipoprotein-related protein 1*). La calreticulina se une al receptor de la superficie celular CD91 y actúa como un adaptador o co-receptor para unirse a la región de colágeno de la SP-A, la SP-D y de otras colectinas. *In vitro*, la SP-A y la SP-D se unen a las células apoptóticas y provocan su ingestión por parte de los macrófagos alveolares mediante la interacción con el complejo calreticulina/CD91 (Vandivier et al., 2002).

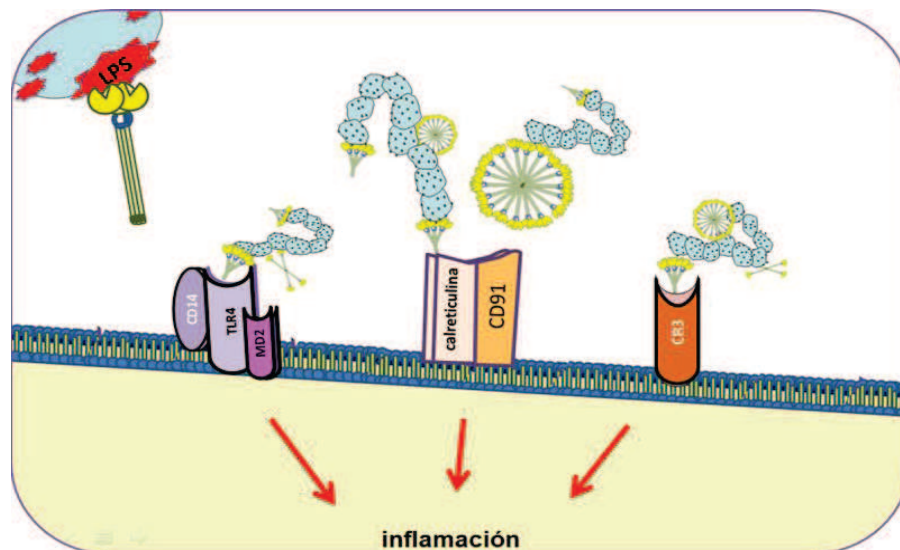


Ilustración 10. Función de la SP-A y la SP-D en presencia de agentes patógenos. Representación gráfica de la activación de receptores producida por la SP-A y la SP-D para promover la fagocitosis y un estado inflamatorio: la bacteria es capturada por las SPs, que se unen a los receptores TLR4/CD14 o al complejo calreticulina/CD91.

Los receptores del complemento (CR, *complement receptor*), como CR3, inducen señales prominentes que conducen al estallido respiratorio o explosión

oxidativa. Se ha demostrado que la SP-A, gracias al dominio colágeno, lo une directamente y logra favorecer la fagocitosis mediada por ese receptor fagocito expresado por neutrófilos (Gil et al., 2009) (**ilustración 10**).

Por otro lado, las SPs tienen conexión con componentes de la inmunidad adquirida. Se ha publicado que la SP-D es capaz de interactuar con las células T, concretamente, mediante la inducción de la expresión del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*). El CTLA-4 es un receptor proteico situado en la membrana celular de los linfocitos T cuya estimulación inhibe la función de dichos linfocitos. Además, la SP-D inhibe las respuestas pulmonares inducidas por alérgenos mediante el aumento de la expresión del CTLA-4, mientras que el bloqueo de ese receptor disminuye la capacidad de la SP-D para inhibir la respuesta inmune inducida por alérgenos. En conjunto, todos estos resultados sugieren que la SP-D regula al CTLA-4 y modula la inflamación pulmonar inducida por alérgenos (Lin et al., 2010).

Por lo que se ha mencionado hasta el momento, tanto la SP-A como la SP-D actúan de manera innata, unen ligandos para neutralizarlos, promueven el aclaramiento de células apoptóticas del pulmón (Vandivier et al., 2002) y juegan un papel crucial en la regulación de la respuesta inflamatoria (Wright, 2005, Janssen et al., 2008, Gardai et al., 2003). En modelos *in vivo* de ratón se han publicado algunos estudios en los que los ratones deficientes en *Sftpa1* o *Sftpd* desarrollan más susceptibilidad a la infección por diferentes bacterias y virus (LeVine et al., 2001, LeVine y Whitsett, 2001, Giannoni et al., 2006); a su vez, los ratones *Sftpd* ^{-/-} provocados por un estímulo alérgénico llegan a desarrollar una respuesta inflamatoria pulmonar intensa (Schaub et al., 2004, Schaub et al., 2004). También se ha demostrado que la región bisagra y el CRD de SP-D se unen a los dominios extracelulares de formas solubles de TLR2 y TLR4 recombinante, por un mecanismo diferente al de su unión al PI y al LPS (Ohya et al., 2006).

Las moléculas capaces de interaccionar con las SPs son muy numerosas. En la **ilustración 11** se muestra un resumen de las que han sido descritas hasta el momento.

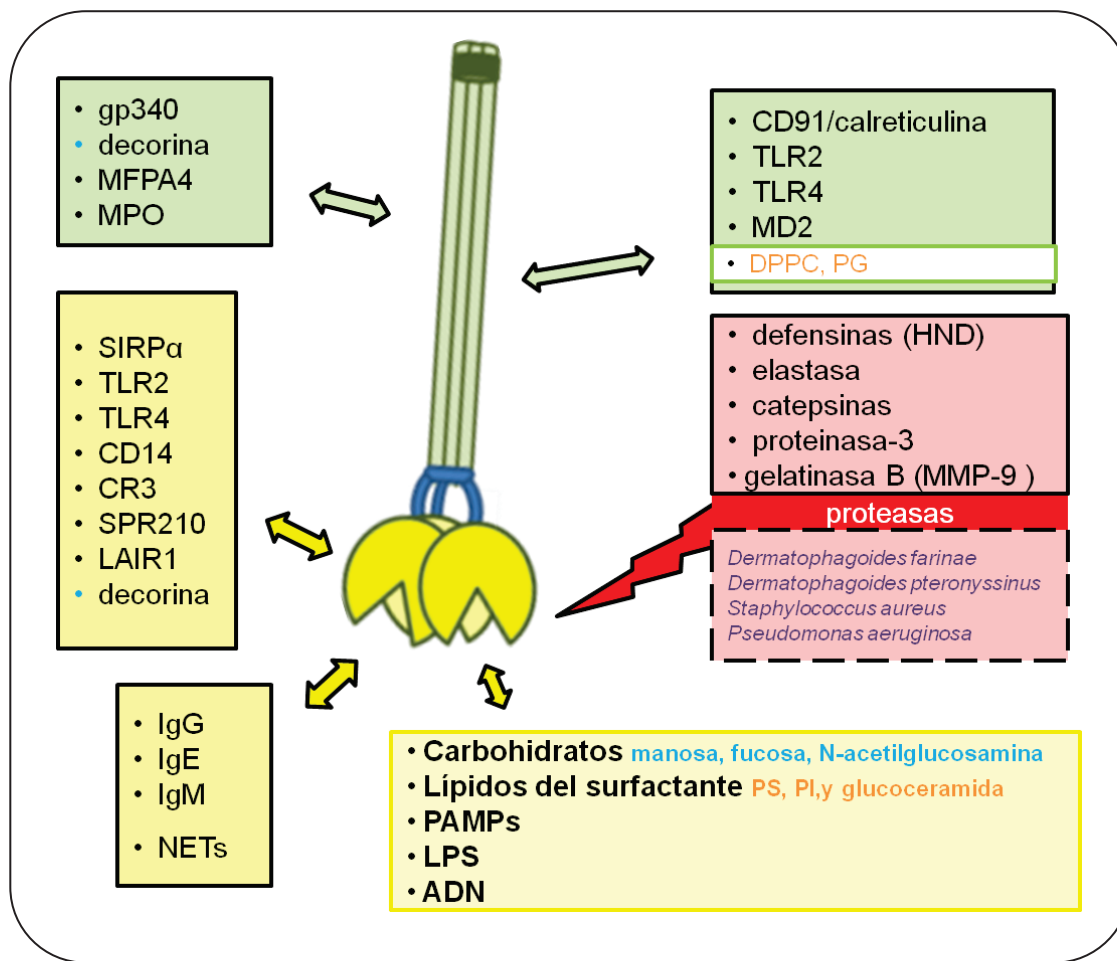


Ilustración 11. Interacción de los dominios N-terminal y CRD con diferentes moléculas.

Resumen gráfico de los principales receptores, ligandos y proteasas que interaccionan con la SP-A y SP-D y el dominio de la proteína que emplean en cada caso interacción. Gp-340: *glycoprotein-340*, MFAP4: *microfibril-associated protein 4*, MPO: *myeloperoxidase*, CD: *cluster differentiation*, TLR: *toll like receptor*, DPPC: *Dipalmitoylphosphatidylcholine*, PG: *phosphatidyl glycerol*, SIRPα: *signal inhibitory regulatory protein α*, SPR-210: *specific 210-kDa SP-A receptor*, LAIR-1: *leukocyte-associated Ig-like receptor-1*, Ig: *Immunoglobulin*, NETs: *neutrophil extracellular traps*, HND: *human neutrophil defensins*, MMP-9: *Matrix metalloproteinase 9*, PAMPs: *pathogen-associated molecular pattern* y LPS: *lipopolysaccharide*.

Hace más de 15 años se detectó la interacción entre la SP-A y un receptor específico de un peso molecular de 210 kDa (SPR-210, *specific 210-kDa SP-A receptor*) que se encuentra en los neumocitos de tipo II y en los macrófagos alveolares. La interacción se lleva a cabo a través de la región de colágeno de la SP-A (Weikert et al., 1997). Por otro lado, se ha demostrado que una glicoproteína de 340 kDa (gp-340, *glycoprotein-340*) se une a la SP-D en presencia de calcio, pero lo hace independientemente del reconocimiento de carbohidratos. La gp340 se encuentra tanto en forma soluble como en asociación con las membranas de los macrófagos alveolares, lo que sugiere que puede tratarse de un receptor de opsonización mediado por la SP-D (Holmskov et al., 1999).

También se ha descrito la unión de las SPs a componentes de la matriz extracelular. Por un lado, la SP-A se une mediante su región colágeno a la proteína 4 asociada a la microfibrilla (MFAP4, *microfibril-associated protein 4*), encargada de la formación de microfibrillas de la matriz extracelular (Schlosser et al., 2006). Además, *in vitro*, el CRD de la SP-D interactúa con el dermatán sulfato de la decorina, que es un proteoglicano que interviene en el ensamblaje de la matriz extracelular, mientras que el núcleo de esta proteína se une a la región tipo colágeno de la SP-D (Nadesalingam et al., 2003). Años después, ese mismo grupo demostró que la SP-D se une a diversas clases de inmunoglobulinas séricas, incluyendo la IgG, la IgM y la IgE, pero no a la IgA. Esta unión se producía, de manera calciodependiente, entre el CRD de la SP-D y los dominios constantes y variables de las inmunoglobulinas (Fc y Fab respectivamente), aumentando la fagocitosis en modelos murinos. Sin embargo, la SP-A sólo se unía a la región Fc (Nadesalingam et al., 2005). Antes de que finalizara la pasada década, el grupo liderado por Hartshorn publicaba que la SP-D también era capaz de interaccionar con las defensinas producidas por neutrófilos humanos (HND, *human neutrophil defensins*). Las defensinas son proteínas que inhiben la infectividad de los virus como los Influenza A, pero parecen ser capaces de modificar la respuesta antiviral mediada por SP-D mediante la interacción con sus dominios bisagra y sus CRDs (Doss et al., 2009). Sin embargo, SP-A y SP-D tienen diferentes mecanismos de la actividad antiviral. La SP-A inhibe la actividad del virus Influenza A (IAV, *influenza A virus*) uniéndolo al ácido siálico expresado en sus CRDs.

Se ha descrito, además, la interacción de las SPs con otras moléculas de los neutrófilos. La SP-A y la SP-D se unen a las fibras o redes extracelulares llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (NET, *neutrophil extracellular traps*), y a carbohidratos de células polimorfonucleares que se unen a bacterias, lo que favorece su fagocitosis (Douda et al., 2011). Algunos de los componentes de las NETs son inmunogénicos, por lo que pueden ser perjudiciales para el tejido. La SP-D se une a las NETs y, a través de los macrófagos alveolares, aumenta la eliminación de las células muertas y del ADN. En consonancia con esto, en varias enfermedades pulmonares

inflamatorias en las que los niveles de SP-D broncoalveolar están disminuidos se ha observado la acumulación de ADN en los pulmones (Cheng y Palaniyar, 2013).

Las SPs también pueden interaccionar con otros productos de los neutrófilos como, por ejemplo, con proteinasas (endopeptidasas) como las serín-proteasas, catepsina G, la elastasa y la proteinasa-3, que contribuyen a la degradación de SP-A y disminuyen la defensa antimicrobiana pulmonar innata (Rubio et al., 2004). La elastasa parece que es la más activa (Cooley et al., 2008) y estudios más recientes han identificado las catepsinas S, B y L como capaces de escindir el CRD de la SP-D (Lecaille et al., 2013).

Además, las SPs también interaccionan con otra proteinasa, la mieloperoxidasa (MPO, myeloperoxidase), aunque normalmente actúa como una molécula de defensa, mediante la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; también se sitúa en la superficie de neutrófilos apoptóticos, donde actúa como diana para la SP-A y la SP-D (Jakel et al., 2010). Es importante constatar que el principal componente producido en los gránulos terciarios de los neutrófilos también interacciona con la SP-D. Se trata de la proteína metaloproteinasa 9 (MMP-9, *Matrix metalloproteinase 9*), conocida también como gelatinasa B, una proteasa con una gran variedad de sustratos que se encargan de degradar o modificar la mayoría de los componentes de la matriz extracelular y de la membrana basal perivascular, incluyendo el colágeno, la laminina y los proteoglicanos.

Se ha visto que la MMP-9 regula la inflamación y la remodelación de tejidos que caracterizan a algunas enfermedades pulmonares tales como la EPOC, el asma y el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA). Se han identificado varios mediadores, incluyendo la IL-8 y el TNF- α , que estimulan la liberación de la MMP-9. Además, la MMP-9 convierte la pro-IL-1 β en IL-1 β activa, y trunca el extremo N-terminal de la IL-8, que pasa a ser una citocina con mayor actividad, lo que aumenta el estado pro-inflamatorio (Ehrenfeld et al., 2009). En 2012, se comprobó que la MMP-9 es capaz de escindir la SP-D *in vitro*, y provocar la pérdida de sus funciones inmunitarias innatas, incluyendo

sus capacidades de agregar bacterias y aumentar la fagocitosis por los macrófagos alveolares de ratones (Bratcher et al., 2012).

Como ya se ha mencionado, el CRD de las SPs es capaz de actuar uniéndose directamente a PAMPs de la superficie de los microorganismos, promoviendo su opsonización y la activación del macrófago (Geertsma et al., 1994, Haczku, 2008). Sin embargo, este dominio puede ser modificado por la acción de otras proteasas, esta vez, producidas por agentes que entran a las vías aéreas para poner en jaque al sistema inmune. Es el caso de la acción de proteasas procedentes de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (Mariencheck et al., 2003) y *Staphylococcus aureus* (Kantyka et al., 2013), y de ácaros del polvo doméstico como *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae* (Deb et al., 2007).

La oligomerización de colectinas es una característica crítica para desarrollar su función y, durante el estado inflamatorio, la modificación química puede dar lugar a la alteración de su estructura. Estas proteínas pueden ser alteradas a través de inactivación proteolítica, nitración, S-nitrosilación y oxidación, en un contexto en el que existen citocinas, proteasas, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, óxido nítrico (NO, *nitric oxide*) y otros mediadores químicos liberados por células inflamatorias. Recientemente, los ensayos funcionales muestran que la SP-D, mediante su dominio colágeno, se une al receptor 1 de tipo Inmunoglobulina asociado al leucocito (LAIR-1, *leukocyte-associated Ig-like receptor-1*). Se trata de un receptor inhibidor de la respuesta inflamatoria, lo que implica una nueva vía por la que las SPs podrían estar contribuyendo a la inmunomodulación (Olde Nordkamp et al., 2014).

1.2 ***Antecedentes***

A continuación se revisan los estudios más importantes que se han publicado en relación a la SP-A y la SP-D, tanto a nivel genético como funcional. Hasta el momento, numerosas investigaciones han repercutido en un mejor conocimiento de la estructura y de la función que desempeñan estas proteínas pulmonares. Los genes que las codifican, *SFTPA2*, *SFTPA1* y *SFTPD*, han sido los genes candidatos de diversos trabajos en las dos últimas décadas. Las variantes de estas proteínas se han relacionado con enfermedades pulmonares como el enfisema, la infección por el virus respiratorio sincitial (VRS), la neumonía, la tuberculosis o la EPOC, entre otras, pero también con enfermedades no pulmonares como la diabetes mellitus tipo II, la colitis ulcerosa, la otitis media, etc. Se detallan a continuación los trabajos más relevantes a nivel funcional, en relación a estas proteínas, realizados tanto en líneas celulares transformadas, como en animales, así como teniendo en consideración también los estudios de los niveles séricos.

1.2.1 **Estudios de asociación**

Los estudios genéticos de las SPs han revelado una cierta asociación con enfermedades pulmonares en neonatos, población infantil y adultos. Se han vinculado a estas proteínas con el daño pulmonar crónico y agudo, tanto el ocasionado por diversos agentes externos como el producido por una alteración en el desarrollo de los procesos inflamatorios o por la disfunción del surfactante (Silveyra y Floros, 2012). A lo largo de las dos últimas décadas se han estudiado las asociaciones de los polimorfismos en SP-A y en SP-D con enfermedades comunes y multifactoriales como el asma y la rinitis alérgica (Saxena et al., 2003, Krueger et al., 2006, Pettigrew et al., 2007, Brandt et al., 2008, Deng et al., 2009, Deng et al., 2011). Los resultados de estos estudios apuntan a que, dependiendo del fondo genético de los individuos, existen algunas diferencias en cuanto a la influencia que ejerce la variabilidad de estas

proteínas. Sólo a modo de ejemplo, se podría mencionar un estudio realizado en una población china en el que se encontró un alelo de SP-D asociado con el aumento del riesgo de desarrollar rinitis alérgica (Deng et al., 2009). Se trata del alelo de un polimorfismo de *SFTPD* (*rs721917*) que, en contraste, se asocia con un carácter protector frente al desarrollo de asma en la población negra (Brandt et al., 2008). Otro estudio realizado con anterioridad, en el que se evaluó la relación de los tres polimorfismos no sinónimos del gen que codifica la SP-D con el asma bronquial, no halló asociaciones significativas en 332 niños alemanes asmáticos y 270 controles de la misma procedencia (Puthothu et al., 2007). En población india, por el contrario, se han encontrado varios polimorfismos de *SFTPA1* y *SFTPA2* como marcadores clínicos de susceptibilidad relacionados con los niveles de IgE, el porcentaje de eosinofilia y la gravedad en pacientes con aspergilosis broncopulmonar alérgica (producida por *Aspergillus fumigatus*) (Saxena et al., 2003). Otro estudio también realizado por este grupo y publicado en 2005, reveló distintos polimorfismos de estos genes como determinantes en el riesgo de padecer edema pulmonar por altura (Saxena et al., 2005).

En población mejicana se han descrito variantes haplotípicas de *SFTPA1* en asociación con el riesgo de desarrollar fibrosis pulmonar idiopática (Selman et al., 2003). En un grupo de pacientes con fibrosis quística de un estudio realizado en Estados Unidos, se han encontrado haplotipos de los genes que codifican la SP-A relacionados con un peor pronóstico (Choi et al., 2006). Curiosamente, una de esas mismas variantes, entre otras, se había asociado con el riesgo de desarrollar distintos tipos histológicos de cáncer pulmonar (Seifart et al., 2005). Más recientemente, un trabajo realizado en población japonesa ha revelado que los haplotipos de *SFTPD* que se asocian con el riesgo de sufrir cáncer de pulmón o enfisema pulmonar difieren de los asociados con el de padecer neumonía intersticial (Ishii et al., 2012a). Estas proteínas también ha supuesto un reto para muchos grupos dedicados a la investigación de la EPOC y, en los últimos años, se han llevado a cabo tanto estudios de gen candidato como estudios GWAS de cohortes de pacientes con esta enfermedad (Sin et al., 2008, Foreman et al., 2011, Shakoory et al., 2012, Ma et al., 2013, Ou et al., 2015).

En cuanto a su papel en las infecciones, habitualmente aparecen distintos efectos de las interacciones de SP-A y SP-D con el mismo o con distinto patógeno. En investigaciones realizadas en diferentes poblaciones, se ha comprobado que el riesgo de padecer tuberculosis parece estar influenciado por sus variantes polimórficas (Floros et al., 2000, Madan et al., 2002, Malik et al., 2006). La SP-A potencia la unión de los macrófagos alveolares a *Mycobacterium tuberculosis* (Gaynor et al., 1995), mientras que la SP-D se une a la superficie bacteriana y condiciona una reducción del material procesado por los macrófagos (Ferguson et al., 1999). Recientemente, se ha publicado un trabajo en población china en el que algunas variantes se muestran como factores protectores frente a la tuberculosis (Yang et al., 2014). En estudios realizados en niños, a su vez, el riesgo de padecer bronquiolitis por el VRS posiblemente también esté modulado por determinadas variantes (Lahti et al., 2002, Lofgren et al., 2002, Thomas et al., 2009, El Saleeby et al., 2010, Ampuero et al., 2011).

También se han publicado algunos trabajos, realizados en diversas poblaciones de todo el mundo, en los que se relacionan algunas infecciones extrapulmonares con la variabilidad genética de estas proteínas. Un estudio realizado en una población inglesa encontró un polimorfismo de *SFTPA2* asociado a la susceptibilidad y a un mayor riesgo de muerte por la enfermedad meningocócica (Jack et al., 2006), causada por una septicemia por *Neisseria meningitidis* después de un período de colonización nasofaríngea (Read et al., 1995). Aunque, SP-A y SP-D se expresan en la enfermedad meningocócica, no hay evidencias de que la SP-A se una a los meningococos. Dos grupos independientes analizaron las asociaciones de polimorfismos de SP-A con la susceptibilidad a padecer otitis media, una de las infecciones más comunes en población infantil, causada por bacterias patógenas como *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *S. aureus* o por infección secundaria a la bronquiolitis producida por VRS. Por un lado, una investigación llevada a cabo en Finlandia, identificó varios haplotipos distintos asociados con la otitis tanto en infección aguda como en recurrente (Ramet et al., 2001). Por otro lado, en Estados Unidos se estudió la relación con la otitis media en una población de niños con riesgo de asma pero sin hacer distinción entre la otitis

media aguda y recurrente (Pettigrew et al., 2006). Los haplotipos de SP-A que se asociaron en esta población difieren de los hallados por el grupo finlandés probablemente debido a posibles diferencias en la estratificación de los pacientes.

En los últimos años, se ha encontrado en mujeres adultas de China un polimorfismo de *SFTPA1* y otro de la *SFTPA2*, relacionados con la susceptibilidad a la infección urinaria recurrente (Liu et al., 2010), una enfermedad causada por *Escherichia coli* y otros microorganismos. Con respecto a los polimorfismos *SFTPD*, en la población japonesa se ha hallado una asociación con la colitis ulcerosa (enfermedad que cursa con inflamación crónica del colon por una activación anómala del sistema inmune) (Tanaka et al., 2009) y en población noruega con un mayor riesgo de presentar estenosis de arteria coronaria (enfermedad cardiovascular en la cual la inflamación desempeña también un papel importante) (Berg et al., 2009). Recientemente, se ha descrito la asociación genética de polimorfismos de SP-A en pacientes españoles con diabetes mellitus de tipo II (Pueyo et al., 2013).

1.2.2 Estudios experimentales

Un trabajo de laboratorio diseñado minuciosamente es imprescindible para comprender mejor los mecanismos moleculares en los que intervienen estas proteínas, porque, entre otras cosas, ayuda a revelar su papel funcional, y el de sus variantes, mediante experimentos que tienen objetivos concretos.

En 1988 se publicó la caracterización de SP-A (O'Reilly et al., 1988), y en 1989 la de SP-D (Persson et al., 1989). A principios de los 90, se pudo detectar la SP-A mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (van de Graaf et al., 1992). Con posterioridad, la expresión *in vitro* de SP-A1 y SP-A2 ha revelado que existen distintas variantes que poseen diferente capacidad para facilitar la fagocitosis por parte de los macrófagos alveolares (Mikero et al., 2005, Mikero et al., 2007). También se han encontrado diferencias en la producción de citocinas

TNF- α e IL-8 en células THP-1 (línea celular humana leucémica y monocítica) (Wang et al., 2002, Huang et al., 2004, Breij y Batenburg, 2008) y en su capacidad para agregarse de manera estable en oligómeros (Selman et al., 2003, Sanchez-Barbero et al., 2007). La SP-A2 es la que tiene mayor afinidad para unir una gran variedad de azúcares (Oberley y Snyder, 2003), y por lo general, se ha mostrado más activa que la de SP-A1. Ambas poseen distinta capacidad para inhibir la secreción de surfactante y la SP-A2 es más susceptible a la oxidación (Wang et al., 2004, Mikerov et al., 2008a).

El estudio con una proteína quimérica (*SP-D/MBLneck_CRD*), formada por el dominio N-terminal y colágeno de la SP-D y por el dominio bisagra y el CRD de la lectina de unión a manosa (MBL, *mannose-binding lectin*) humana reveló que los dodecámeros de esta quimera agregaban mejor la *E. coli* tratada con formalina que la MBL recombinante humana (Hartshorn et al., 2002). Estudios anteriores ya habían mostrado que la SP-D une directamente el LPS de la superficie de bacterias gram negativas a través de su CRD (Kuan et al., 1992) y que, de este modo, producen la agregación de los microorganismos y promueven la fagocitosis por los neutrófilos y los macrófagos (Hartshorn et al., 1998, Tino y Wright, 1999).

En 2010, en un modelo murino de neumonía bacteriana, cuando la región N-terminal de la SP-D fue mutada no se detectaron dodecámeros (Crouch et al., 2010). Tanto cuando la SP-D mutada tenía truncado el dominio N-terminal completo como cuando no tenía los residuos cisteína de esa región, se encontraron sólo formas triméricas y ambas formas eran resistentes a las alteraciones inducidas por la oxidación. También se observó que la SP-D colocalizaba con los neutrófilos y la MPO, y que el ratón deficiente en MPO, que carece de la principal fuente de generación de especies reactivas, mostraba una disminución de la SP-D unida por puentes disulfuro anormales (*abnormal cross-linked SP-D*) y un aumento de la actividad de agregación dependiente de SP-D. Se ha propuesto que una de las causas de la pérdida de la capacidad para agregar microorganismos pueden ser los derivados oxidativos que produce la MPO, capaces de generar modificaciones en la estructura de la SP-D, es decir, oligómeros de SP-D *abnormal cross-linked* (con puentes disulfuro anormales (Crouch et al., 2010). Durante la activación y

degranulación de los neutrófilos, la enzima MPO, una de sus proteínas más abundantes e importantes, se libera tanto en vacuolas fagocíticas como directamente al espacio extracelular. La MPO actúa como una molécula de defensa intracelular específica de los neutrófilos pero también se expone en el exterior del fagocito que entra en apoptosis y se ha confirmado, por microscopía de fluorescencia, como molécula de unión para la SP-A y la SP-D. En concreto, se ha observado que anticuerpos monoclonales anti-MPO colocalizaban con SP-A y SP-D en neutrófilos apoptóticos en fase tardía (Jakel et al., 2010).

Se han realizado trabajos en seres vivos para evaluar el papel de las SPs. Por motivos fundamentalmente científicos, aunque también económicos y de la disponibilidad de reactivos específicos de especie, hoy día el animal universalmente utilizado como modelo es el ratón, del que, con respecto a otras especies, cabe destacar la posibilidad de su manipulación genética (transgénicos y knockouts) e inmunológica (ratones con inmunodeficiencias espontáneas o inducidas). Como se ha mencionado, los ratones deficientes en SP-A o SP-D presentan una mayor susceptibilidad a la infección respiratoria por virus y bacterias. Sin embargo, los ratones deficientes en el gen que codifica la SP-D (Sftpd^{-/-}) desarrollan enfisema pulmonar, lo que supone una pérdida de la estructura esencial del pulmón. Además, en un modelo murino de alergia pulmonar inducida por alérgenos de ácaros del polvo doméstico (*Der p mice*), cuando se les administra SP-D recombinante (rhSPD) por vía intranasal, se logra disminuir los niveles de IgE específica, la eosinofilia periférica y la infiltración pulmonar (Strong et al., 2003).

Los niveles de SP-D presentes en el suero despiertan interés como posible marcador clínico de enfermedad pulmonar. Se han realizados estudios comparando los niveles séricos de SP-D entre pacientes con enfermedades pulmonares infecciosas e individuos sanos y entre distintos grupos de pacientes. La concentración de SP-D en suero se incrementa significativamente con la edad, el tabaquismo y en relación al sexo masculino, aunque el estado del individuo también contribuye a la variación en sus valores (Sorensen et al., 2006b). Además de depender del estado en el que se encuentra el pulmón, los niveles son variables y se ha detectado un amplio

rango de concentraciones entre los voluntarios sanos. Los niveles de SP-D detectados en las vías respiratorias de los asmáticos son más altos que en los no asmáticos. Si tenemos en cuenta el aumento de la susceptibilidad a la infección viral en el asma, estos hallazgos podrían resultar contradictorios. Se ha sugerido que pueden existir diferencias subyacentes en la función de SP-D entre individuos asmáticos y no asmáticos. Se ha observado que la SP-A y la SP-D purificadas, suprimen la proliferación de linfocitos tras la estimulación producida por *D. pteronyssinus* en los ratones no sensibilizados (sin exposición previa), mientras que en los sensibilizados se ha observado ese efecto supresor reducido (Wang et al., 2001).

En pacientes con neumonía bacteriana los niveles de SP-D en el suero son mayores que en los voluntarios sanos usados como controles (Ohnishi et al., 2002). En neumonitis intersticial usual se encuentran altas concentraciones de SP-A comparadas con las que tienen otros tipos de neumopatías intersticiales. Por esta razón, se ha propuesto a la SP-A como marcador clínico para mejorar el diagnóstico de la neumonitis intersticial (Ishii et al., 2003). En un grupo de diez niños diagnosticados de enfermedad intersticial pulmonar (un conjunto heterogéneo y poco frecuente de enfermedades pulmonares difusas en la infancia), se detectaron niveles mayores, tanto de SP-D como de SP-A, comparado con los voluntarios sanos (Al-Salmi et al., 2005). Con anterioridad ya había sido publicado que, en pacientes con neumonía intersticial, los niveles de SP-D tras la administración de tratamiento con prednisona, eran menores que en pacientes sin esta enfermedad (Arai et al., 2001). En otro estudio, se detectaron mayores niveles de SP-D sérica en 16 pacientes con neumonía y SDRA, que en los 16 controles testados (Wu et al., 2009). En 61 pacientes hospitalizados con neumonía adquirida en la comunidad (NAC), la concentración de SP-D se triplicaba tras cinco días de ingreso y, posteriormente, se restablecía a los niveles normales lentamente (Leth-Larsen et al., 2003). En pacientes receptores de órganos se ha observado que los niveles de SP-D se elevan en los episodios de neumonía bacteriana pero no cuando no existen hallazgos respiratorios patológicos (Bejvl et al., 2013).



En esta Tesis Doctoral se plantea que las variantes genéticas de las proteínas surfactantes A y D (SP-A y SP-D) pueden utilizarse como marcadores para identificar a los subgrupos de individuos con mayor predisposición a desarrollar una enfermedad pulmonar grave. Estas proteínas, además de intervenir en el mantenimiento de las funciones pulmonares normales, son componentes del sistema inmunitario innato e intervienen en la primera línea de defensa del pulmón. Los tres genes que codifican la SP-A y la SP-D poseen una variabilidad natural que resulta útil para facilitar la identificación de subgrupos de pacientes e individuos. Para testar la hipótesis de que las variaciones en esos genes están involucradas en la adquisición y evolución de varias enfermedades pulmonares, se incluye el estudio de 15 SNPs en tres cohortes de pacientes con enfermedades respiratorias de alto impacto pero con distinta etiología o mecanismo patogénico, y en individuos de la población general. En un primer estudio de asociación genética se incluyeron aproximadamente un millar de pacientes hospitalizados con diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad; en el segundo estudio, se analizaron cerca de un centenar de pacientes con diagnóstico de gripe pandémica (H1N1) 2009 y, en un tercer estudio, se ha incluido otro millar de pacientes alérgicos a los ácaros del polvo doméstico con y sin asma.

HIPÓTESIS

Teniendo presente que algunas variantes genéticas, en los genes que codifican las proteínas surfactantes pulmonares A y D, pueden afectar a la expresión, a la estructura o a la función inmunomoduladora de dichas proteínas, se sugiere que:

Los polimorfismos genéticos de un sólo nucleótido, y/o las combinaciones de estos en haplotipos están involucrados en la adquisición y/o en la evolución de la neumonía adquirida en la comunidad.

Variantes genéticas simples de *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* y/o su combinación en haplotipos modulan la predisposición y/o pronóstico de la gripe pandémica (H1N1) 2009.

Variantes genéticas simples y/o combinadas de *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* modulan la predisposición a desarrollar un asma más grave en individuos con alergia a los ácaros del polvo doméstico.

OBJETIVOS

En consonancia con las hipótesis expuestas, a través del estudio de la frecuencia de los diferentes alelos y genotipos, así como de los haplotipos de *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* se pretende:

Identificar qué variantes se asocian con la susceptibilidad y con la gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad.

Identificar qué variantes se asocian con la gravedad de la gripe pandémica (H1N1) 2009

Identificar qué variantes se asocian con la gravedad del asma, en individuos con alergia a ácaros del polvo doméstico.

MÉTODOS

La investigación llevada a cabo durante la realización de esta Tesis Doctoral pertenece al área de la Biomedicina. El diseño de los estudios es tipo caso-control con la mayoría de los datos obtenidos prospectivamente y, en todos los casos, fue evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín (HUGCDN). Los integrantes de nuestro grupo de investigación que están en contacto con los pacientes se han encargado de registrar los datos clínicos y evaluar los parámetros de gravedad en los distintos servicios de los hospitales que participaron en los diferentes proyectos. La ficha de recogida de datos diseñada para cada estudio se ha incluido en el **Anexo** de esta Tesis Doctoral.

Todos los individuos incluidos, en cada uno de los tres estudios que se detallan más adelante, fueron informados adecuadamente y, de manera consciente firmaron el consentimiento antes de iniciar el procesamiento de la muestra biológica obtenida. Una vez procesadas y analizadas genéticamente las muestras, a través del estudio de su LD genético se propone establecer las frecuencias y el modo de herencia de las variantes seleccionadas de los genes *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* en la población general. Por otro lado, a través de análisis estadísticos se ha evaluado la influencia de estas variantes como factores de riesgo o de protección en tres grupos de pacientes con enfermedades respiratorias de alto impacto y distinta etiología y mecanismo patogénico. Las características de cada grupo se detallan en el apartado denominado **Pacientes** en cada uno de los estudios de asociación genética realizados.

En el primer estudio se han analizado pacientes hospitalizados con diagnóstico de NAC entre los años 2002 y 2012 en cinco hospitales españoles. En el segundo estudio se han incluido pacientes hospitalizados en cuatro hospitales con diagnóstico de gripe por AIV, subtipo H1N1 (2009), entre los años 2009 y 2011. En el tercer estudio se han analizado pacientes alérgicos a los ácaros del polvo doméstico en seguimiento en el Servicio de Alergología del HUGCDN, recogidos de manera consecutiva entre los años 2010 y 2012.

A todos los individuos incluidos en cada uno de los tres grupos ya descritos, se les extrajo dos viales de sangre: un tubo con ácido etildiaminotetraacético (EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid*) para posteriormente extraer el ADN y un tubo con heparina para obtener el suero. Tanto las muestras biológicas como los consentimientos informados de los pacientes se recibieron en el Servicio de Inmunología del HUGCDN a través de mensajería (desde los Servicios participantes ubicados en hospitales fuera de Gran Canaria), o directamente de los médicos colaboradores del HUGCDN. En cada uno de los estudios se ha comparado la frecuencia de las variantes genéticas en los pacientes que cursaban con una sintomatología más grave con los que padecieron una forma más leve de la enfermedad. En términos generales, planteamos revelar la posible relación de la variabilidad genética de la SP-A y la SP-D con la predisposición a un estado de mayor gravedad de la afectación pulmonar en las tres enfermedades estudiadas.

2.1 Selección de las poblaciones incluidas en los estudios

2.1.1 Diagnóstico y recolección de datos de pacientes

La valoración, caracterización fenotípica y selección de pacientes ha sido realizada en los Servicios de Neumología, Medicina Interna, Microbiología, UCI y Alergología de los hospitales colaboradores en cada uno de los estudios. Así mismo, estos servicios se encargaron de la evaluación y clasificación de los pacientes a través de una ficha clínica de recogida de datos elaborada específicamente para cada uno de los tres grupos de estudios. Además de la obtención de datos necesarios para la evaluación de las asociaciones que se ha querido estudiar en este trabajo, también se ha recogido información importante relativa a las características demográficas de las poblaciones estudiadas, y la frecuencia de factores de riesgo. Para evitar errores, sólo se han incluido individuos españoles (Liu et al., 2003). Con posterioridad, en el apartado correspondiente a cada uno de los tres estudios realizados en esta

Tesis Doctoral, se detallarán los criterios de inclusión y de exclusión empleados en la clasificación de los pacientes.

2.1.2 Reclutamiento de población general

La población general que se ha incluido en esta Tesis Doctoral representa la población de referencia en los estudios de susceptibilidad que hemos realizado. Se trata de una población exclusivamente de individuos españoles (de al menos tres generaciones) mayores de edad que fueron informados sobre los estudios que se pretendían llevar a cabo y que firmaron el debido consentimiento en el Servicio de Inmunología del HUGCDN. Por lo tanto, al conjunto de estos individuos lo hemos denominado población general española (PGE). Principalmente se incluyó personal investigador y clínico, estudiantes universitarios y donantes de sangre que, como es preceptivo, firmaron también un consentimiento informado.

2.2 Determinaciones experimentales

2.2.1 Determinaciones genéticas

2.2.1.1 Extracción del ADN

La extracción del ADN de las muestras de sangre fue realizada mediante dos métodos: extracción manual por fenol-cloroformo y mediante kits en extractores automáticos. La extracción por fenol-cloroformo fue realizada para obtener el ADN en las muestras de sangre de los pacientes incluidos antes del 2009. El procedimiento llevado a cabo fue descrito en detalle en la Tesis Doctoral presentada por María Isabel García-Laorden (ULPGC, 2009). Con posterioridad, se incluyó una extracción automatizada del ADN que, con las ventajas que supone, ha permitido aumentar la cantidad de muestras procesadas y, al mismo tiempo, la optimización del aprovechamiento de las

mismas. Este procedimiento se realizó mediante el sistema *iPrep™ Purification Instrument* y se utilizaron los reactivos de *iPrep™ PureLink® gDNA Blood Kit* (Invitrogen, Estados Unidos). De forma esquemática, en este procedimiento se parte de un volumen de 400 µl de sangre obtenidos a partir del tubo con EDTA, uno de los dos viales de extracción de material biológico mencionados. Las muestras se introdujeron en el sistema automatizado, siguiendo las instrucciones del fabricante, con una serie de reactivos suministrados en el kit comercial. A continuación se destacan los componentes más importantes: SDS o detergente, para romper las membranas fosfolipídicas de las células, y enzimas, como la proteinasa K, para degradar las proteínas, además de ARNsas para que degraden el ARN (ácido ribonucleico). De este modo, queda disponible el ADN, que se marca con bolas magnéticas para después ser capturado y trasladado así al pocillo que contiene 100 µl de tampón de elución. Para cada muestra se comprobó la integridad del ADN mediante el valor del ratio de absorbancias (260/280 nm) establecido para asegurar que se trata de ADN, entre 1,7 y 2,2, y se cuantificó mediante el espectrofotómetro *NanoDrop®ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Estados Unidos), siendo considerada la concentración de trabajo óptima la de 100 ng/µl.

2.2.1.2 Selección de polimorfismos

La información para realizar la selección de las variantes genéticas se obtuvo de bases públicas con acceso desde internet, principalmente NCBI, Ensemble y Genecard, plataformas que integran a grandes bases de datos, incluyendo la del proyecto del genoma humano (*HapMap project*). Todo esto nos ha proporcionado una información valiosa a la hora de seleccionar los SNPs que pueden formar haplotipos en la población. Otros SNPs (no incluidos en *HapMap*) que pueden ser relevantes los podemos encontrar en bases de datos como: *GeneBank*, bibliografía en *Pubmed*, *UCSC genome browser* y empresas comerciales (a través de kits disponibles). En *Hapmap*, la población de referencia escogida en nuestro estudio ha sido la *CEU*, que

se corresponde con habitantes en Utah con ancestro del oeste y norte de Europa que representan a la población que denominan como caucásica. De cada uno de los tres genes, de las SPs hidrofílicas, se estudian tres polimorfismos no sinónimos localizados en cada una de las partes principales de los monómeros de la proteína (ver **ilustración 12**).

COLÁGENO

The diagram illustrates a collagen molecule. It consists of a long, thin yellow rod representing the polypeptide chain. The left end is labeled 'N-TERMINAL'. The right end is a larger, yellow, club-shaped structure labeled 'CRD' (C-terminal domain). Above the rod, the word 'COLÁGENO' is written in bold black letters.

GENES

HAPLOTIPOS

Polimorfismos no sinónimos

SFTPA2

aa9

rs1059046

aa91

rs17886395

aa223

rs1965708

1A

C/Thr

C/Pro

C/Gln

1A⁰

A/Asn

G/Ala

C/Gln

1A¹

C/Thr

G/Ala

A/Lys

1A²

C/Thr

G/Ala

C/Gln

1A³

A/Asn

G/Ala

A/Lys

SFTPA1

aa19

rs1059047

aa50

rs1136450

aa219

rs4253527

6A

C/Ala

C/Leu

C/Arg

6A²

T/Val

G/Val

C/Arg

6A³

T/Val

C/Leu

C/Arg

6A⁴

T/Val

C/Leu

T/Trp

SFTPD

aa11

rs721917

aa160

rs2243639

aa270

rs3088308

D¹

T/Met

C/Ala

A/Ser

D²

C/Thr

T/Thr

A/Ser

D³

T/Met

T/Thr

A/Ser

D⁴

C/Thr

T/Thr

T/Thr

D⁵

C/Thr

C/Ala

A/Ser

D⁶

T/Met

T/Thr

T/Thr

Ilustración 12. Polimorfismos no sinónimos y sus combinaciones en haplotipos.

Los *loci* polimórficos se identifican por su número *rs*. En nuestros estudios, los SNPs para el gen *SFTPA1* son *rs1059047*, *rs1136450* y *rs4253527*; para *SFTPA2* *rs1965708*, *rs17886395* y *rs1059046* (éste último codifica péptido señal); y para *SFTPD* los *rs3088308*, *rs2243639*, *rs721917*. El color de cada columna indica el dominio en el que se encuentra cada SNP. Los haplotipos de *SFTPA2* y *SFTPA1* de acuerdo con la nomenclatura descrita (1Aⁿ y 6Aⁿ) (DiAngelo et al., 1999) y los de *SFTPD* con una nomenclatura que proponemos (Dⁿ).

En la siguiente tabla se encuentra la información resumida, y disponible hasta el momento, de los análisis funcionales de los SNPs susceptibles de afectar a las proteínas de interés en nuestros estudios:

Tabla 1. Información de SNPs funcionales de *SFTPA2*, *SFTPA1* y *SFTPD*.

	codificación de proteínas					regulación del <i>splicing</i>				Cambio
	Poly Phen	SIFT	SNP effect	LS SNP	SNPs 3D	ESE finder	ESR Search	PESX	RESCUE ESE	
rs1965708	B	tol	del	B	del	+	+	+	+	Gln ²²³ Lys
rs17886395	B	-	B	B	B	-	+	+	-	Ala ⁹¹ Pro
rs1059046	B	tol	del	B	-	+	+	-	-	Asn ⁹ Thr
rs1059047	B	tol	del	B	-	+	+	-	-	Val ¹⁹ Ala
rs1136450	B	-	-	B	B	+	+	+	+	Val ⁵⁰ Leu
rs4253527	D	D	del	B	B	-	+	-	-	Arg ²¹⁹ Trp
rs3088308	B	-	-	B	-	-	-	-	-	Thr ²⁷⁰ Ser
rs2243639	B	D	del	B	-	+	+	-	-	Thr ¹⁶⁰ Ala
rs721917	B	tol	del	B	-	+	+	+	+	Met ¹¹ Thr

Resumen de la información respecto al tipo de cambio ocurrido en la proteína. Según las bases de datos: Polyphen, SIFT, SNPeffect, SNPs3D, un polimorfismo se puede determinar como B: benigno, tol: tolerable, del: deletéreo. En cuanto a la regulación del procesamiento o *splicing* de la proteína, "+" es que se conoce que existe regulación y "-" es que no existe.

Como se ha mencionado, el LD es un fenómeno útil para seleccionar los SNPs. Las frecuencias de las variantes y mapas de LD pueden ser diferentes en los distintos grupos de población que integran la información de las bases de datos debido al fondo genético de cada una de ellas. La información disponible de la herencia del conjunto de las variantes genéticas permite el estudio de la distribución de los haplotipos en la población. En nuestro trabajo seleccionamos los SNPs informativos del gen mediante el procesamiento de los datos publicados en la *release21* del proyecto *HapMap* -correspondientes a datos de los SNPs de la fase II, donde las distancias interSNPs se miden en coordenadas hg17 (human genome 17, NCBI build 35)- mediante el software *Haploview* 4.2 (Barrett et al., 2005).

Estos *tagSNPs* se escogen con los siguientes criterios: que el alelo menos frecuente (MAF, *minor allele frequency*) se encuentre en más del 5% de la población y que los SNPs estén ligados con una probabilidad mayor al 80% ($MAF \geq 0,05$ y $r^2 \geq 0,8$) en la región donde se encuentra el gen y en las diez kilobases (Kb) flanqueantes. En la **ilustración 13** se muestra la distribución de los SNPs en esa zona del genoma según los datos para la población *CEU* del proyecto *HapMap*.

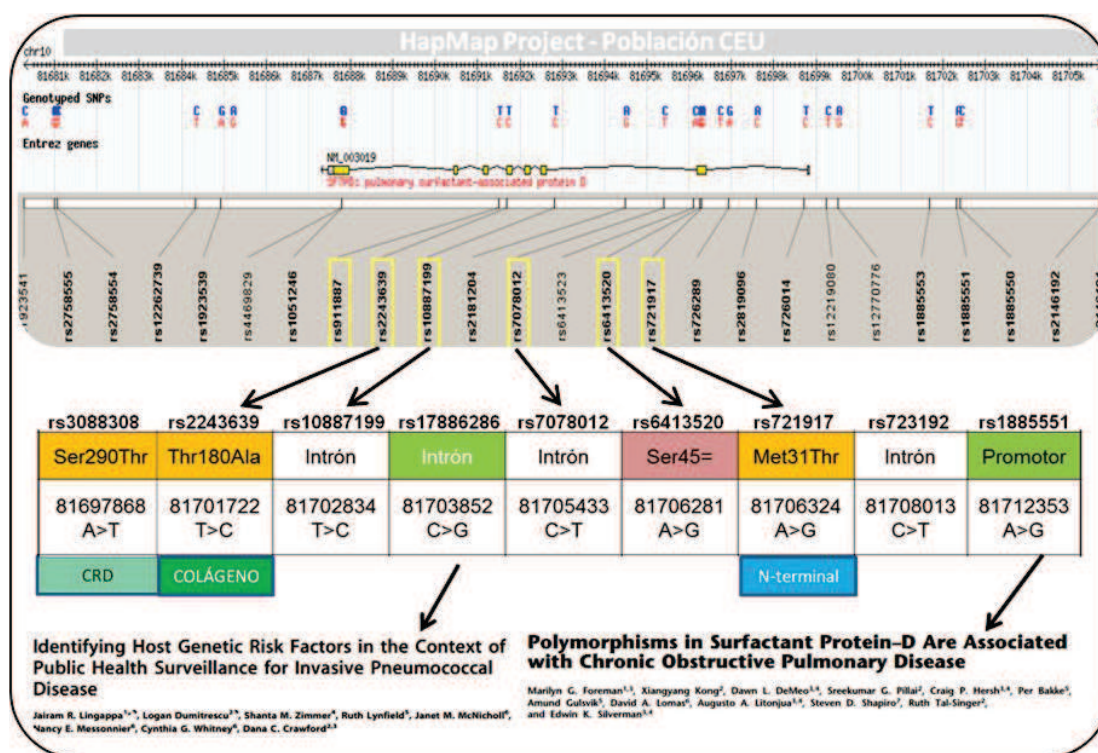


Ilustración 13. Polimorfismos seleccionados para el estudio del gen que codifica la SP-D (SFTPD).

Resumen gráfico de los SNPs escogidos para el estudio de la variabilidad genética del gen *SFTPD* a través del software *Haploview* 4.2. Se muestra específicamente el rs o número de identificación, el cambio aminoacídico, su posición en el cromosoma 10 según NC_000010.10, los alelos que cambian en cada uno de ellos y el dominio de la proteína en la que se encuentran. En la parte inferior, por último, se destacan los artículos publicados de donde se extrajo la información para los dos SNPs extra incluidos.

Dentro de cada uno de los genes candidatos incluidos, el número de SNPs comunes es finito, y dado a que los genotipos de dichos SNPs pueden estar relacionados, resulta más eficiente no incluirlos todos. Para ello, se utiliza un algoritmo desarrollado para la selección de *tagSNPs* basado en el estadístico r^2 de LD, porque r^2 está directamente relacionado con el poder estadístico para detectar asociaciones con variantes no incluidas en el ensayo.

El abordaje genético se completó con la elección de dos SNPs relevantes en la bibliografía. En total, del gen *SFTPD*, estudiamos nueve SNPs: además de los tres SNPs no sinónimos, también se incluyeron un SNP sinónimo (*rs6413520*), otro SNP en la zona del promotor (*rs1885551*, relacionado con niveles séricos), tres *tagSNPs* intrónicos (*rs10887199*, *rs7078012*, *rs723192*) y un SNP (*rs17886286*) escogido por su reciente asociación con la enfermedad neumocócica invasiva.

2.2.1.3 Técnicas de tipaje molecular

2.2.1.3.1 SNPs de SFTPA1 y de SFTPA2

Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) más utilizadas en la determinación de los seis SNPs estudiados de los dos genes que codifican la SP-A son: las PCRs con *primers* específicos de secuencia (SSP-PCR) o con *tetra-primers* (ARMS-PCR), y las PCRs con otras PCRs anidadas (nested-PCR) y/o con cortes con enzimas de restricción (RFLP-PCR, *restriction fragment length polymorphism* PCR), como se muestra en la **tabla 2** y **3**, respectivamente. Con estas técnicas de PCR convencional se tienen que marcar las moléculas de ADN amplificadas con bromuro de etidio (agente que se intercala entre las bases del ADN), cargar las muestras en geles de agarosa o poliacrilamida y llevar a cabo una electroforesis del gel. Para visualizar los resultados es necesaria la luz ultravioleta, ya que el bromuro de etidio sólo se ve en esas longitudes de onda. Para analizar los datos obtenidos, se compara la longitud de fragmentos con un marcador de peso molecular incluido en el gel como referente, tal y como se muestra en la **ilustración 14** y **15**.

Tabla 2. Condiciones de PCR, reactivos y *primers* (I).

Temperatura	Ciclos	Reactivos	μL	Secuencia de primers	μL	Secuencia de primers	μL
rs1965708(Q223K)							
95°.....5'	x30	ADN	1,00	TgTgTACATTCTCACACACTg	0,2	CTgTgTACATCTCCACACACTT	0,3
95°.....30"		MgCl ₂	2,00	AAgAAAgCAAgTTCTCTgCCTg	0,2	AAgAAAgCAAgTTCTCTgCCTg	0,3
65°.....30"		dNTPs	2,00				
72°.....1'		tampón10x	2,50	ATgATgTTgACCTTTCCAggg	0,4	ATgATgTTgACCTTTCCAggg	0,5
72°.....8'		TaqPol	0,10	TTCTgTAACTTTTCATCAgTTgC	0,4	TTCTgTAACTTTTCATCAgTTgC	0,5
rs17886395(A91P)							
95°.....2'	x30	ADN	1,00	TggAgAgAAgggggAgC	0,065	TggAgAgAAgggggAgg	0,07
98°.....10"		MgCl ₂	0,16	CCTgATCACACCATCTgCCT	0,065	CCTgATCACACCATCTgCCT	0,07
61°.....20"		dNTPs	1,60				
72°.....1'40"		tampón5x	4,00	TgCCCAgTggAgCACCCAA	0,06	TgCCCAgTggAgCACCCAA	0,06
72°.....10'		Taq*iproof	0,075	gCATCTTgCTCTgTgCAgAT	0,06	gCATCTTgCTCTgTgCAgAT	0,06
rs1059046(T9N)							
95°.....5'	x30	ADN	1,00	gCTgCCATCAAgATgAggg	0,1	ggCTgCCATCAAgATgAgGt	0,1
95°.....30"		MgCl ₂	2,20	gTgCCAATgATgCTTggAATT	0,1	gTgCCAATgATgCTTggAATT	0,1
65°.....30"		dNTPs	2,00				
72°.....1'		tampón10x	2,50	TgCCCAgTggAgCACCCAA	0,2	TgCCCAgTggAgCACCCAA	0,2
72°.....8'		TaqPol	0,10	gCATCTTgCTCTgTgCAgAT	0,2	gCATCTTgCTCTgTgCAgAT	0,2
rs4253527(R219W)							
95°.....5'	x30	ADN	1,00	ACACACTgCTCTTTTCCCCg	0,25	ACACACTgCTCTTTTCCCCA	0,3
95°.....30"		MgCl ₂	2,00	ATAggAAAgCAAgTTCTCCACC	0,2	ATAggAAAgCAAgTTCTCCACC	0,25
65°.....30"		dNTPs	2,20				
72°.....1'		tampón10x	2,50	ATgATgTTgACCTTTCCAggg	0,5	ATgATgTTgACCTTTCCAggg	0,5
72°.....8'		TaqPol	0,15	TTCTgTAACTTTTCATCAgTTgC	0,5	TTCTgTAACTTTTCATCAgTTgC	0,5

Detalle de las temperaturas y número de ciclos protocolizados para las determinaciones alélicas de tres SNPs localizados en el gen *SFTPA2* (*rs1965708*, *rs1059046* y *rs17886395*) y de uno en *SFTPA1* (*rs4253527*).

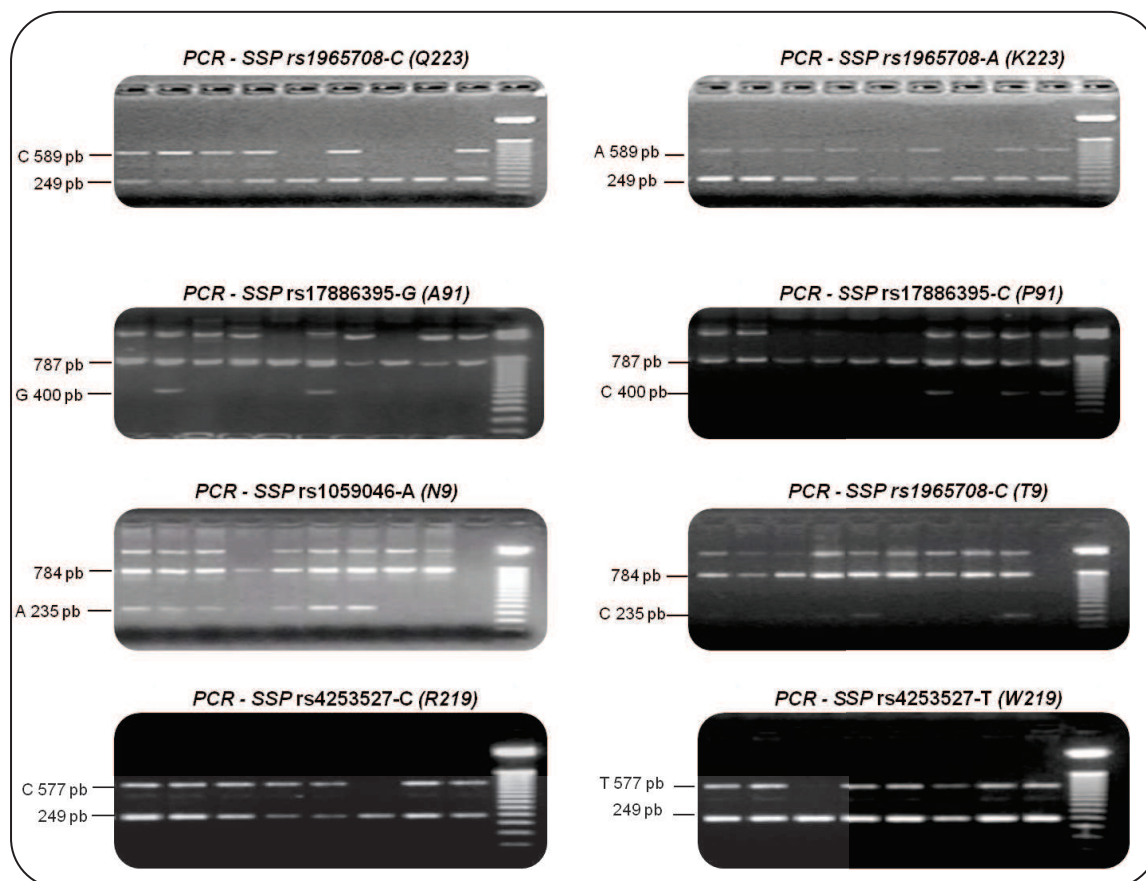


Ilustración 14. Visión ultravioleta tras realizar la electroforesis en gel de agarosa al 2% (I).

Fotografía con luz ultravioleta donde se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa tras realizar la técnica de PCR para determinaciones de los SNPs de *SFTPA2* (*rs1965708*, *rs1059046* y *rs17886395*) y de *SFTPA1* (*rs4253527*).

Tabla 3. Condiciones de PCR, reactivos y primers (II).

Temperatura	Ciclos	Reactivos	μL	Secuencia de primers	μL	Enzima	μL
rs1059047(V19A)							
98°.....3'	x30	<u>1ºPCR</u>					
98°.....10"		ADN	1,00	ACTCCATgACTgACCACCTT	0,09	<i>BbVI</i>	0,15
61°.....20"		MgCl ₂	0,15			H ₂ O	4,85
72°.....1'40"		dNTPs	1,60			tampón	1,00
72°.....10'		tampón10x	4,00	TgCCACAgAgACCTCAgAgT	0,09		
		Taq*iproof	0,09				
rs1136450(L50V)							
95°.....2'	x5	<u>2ºPCR</u>					
95°.....30"		ADN	1,00	ACCTCATCTTgATgTCAgCCTC-	1,5	<i>Ddel</i>	0,15
50°.....1'		amplificado	1,80	TggTgCAg		H ₂ O	4,85
70°.....1'		MgCl ₂	2,40			tampón	1,00
95°.....30'		dNTPs	3,00				
55°.....1'	x27	Tampón10x	0,15	AgggCCAaggTCTCCTCTgA	1,5		
70°.....1'		TaqPol					
72°.....5'							

Detalle de las temperaturas y número de ciclos protocolizados para las determinaciones alélicas de dos SNPs localizados en el gen *SFTPA1* (*rs1059047* y *rs1136450*).

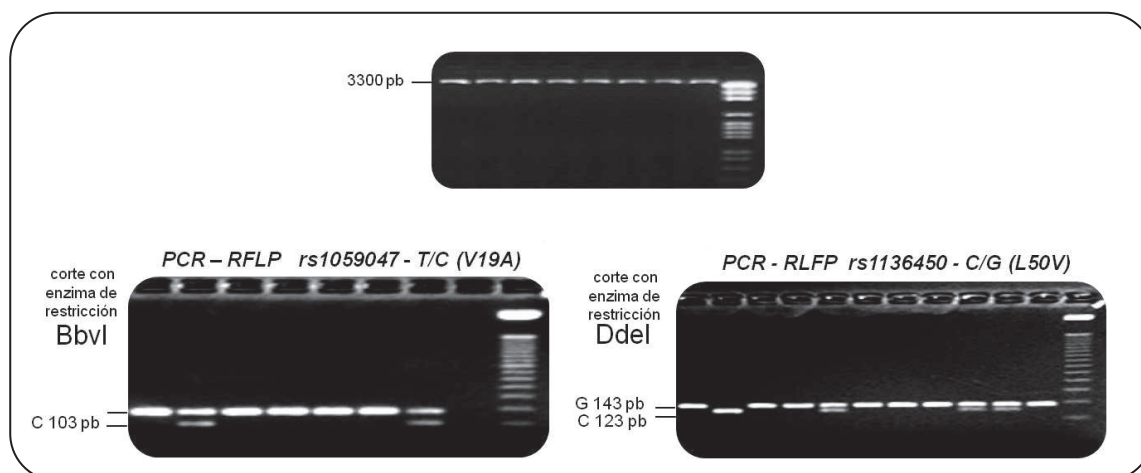


Ilustración 15. Visión ultravioleta tras realizar la electroforesis en gel de agarosa al 2% (II).

Fotografía con luz ultravioleta donde se muestra, en la parte superior, el resultado de la electroforesis en gel de agarosa tras realizar la primera PCR y, en la parte inferior, el resultado tras el corte con la enzima de restricción correspondiente: *BbvI* para la determinación alélica del SNP con *rs105904*, y *DdeI* para la del SNP con *rs1136450*.

2.2.1.3.2 SNPs de SFTPD

La técnica utilizada en la determinación de los nueve SNPs estudiados del gen que codifica la SP-D es la que ha ido reemplazando en gran medida a las otras en los últimos años, la PCR a tiempo real. Se basa en la misma tecnología de amplificación de fragmentos específicos pero se emplean sondas que contienen marcadores fluorescentes, lo que permite la detección de las variantes en los SNPs mediante un ordenador que está conectado al termociclador ciclo a ciclo. La discriminación alélica mediante sondas de hidrólisis *TaqMan* (*Life Technologies*, Carlsbad, Estados Unidos) se basa en cadenas cortas de nucleótidos marcadas con un fluorocromo para cada alelo. Cuando se unen específicamente al ADN, se rompen liberando la fluorescencia a una longitud de onda específica (VIC a ≈ 550 nm y/o FAM a ≈ 520 nm). El genotipado de las SPs se realizó usando sondas *TaqMan* prediseñadas e incluidas en un ensayo para el genotipado específico de SNPs.

De cada una de las muestras, se colocó 1 μ l de ADN, a una concentración aproximada de 100 ng/ μ l, en cada uno de los 96 pocillos que poseen las placas ópticas compatibles con el sistema de genotipado. A su vez, se añadieron 12,5 μ l de *Master Mix*, 11,25 μ l de agua libre de enzimas y 1,25 μ l del ensayo prediseñado (*TaqMan®Predesigned SNP genotyping assay*) a una concentración 20X. Dicho ensayo contenía las sondas y los *primers* específicos

para cada SNP, así como la enzima *Taq* polimerasa necesaria para la amplificación. Los códigos de identificación de cada ensayo se muestran en la **tabla 4**. La información de qué fluorocromo marca cada sonda específica de alelo, y su secuencia contexto, está disponible también en web <http://www.lifetechnologies.com>.

Tabla 4. Datos de identificación de SNPs y de sus ensayos de genotipado.

SNP	NP_003010.4	NC_000010.10	NM_003019.4	Código de ensayo
rs3088308	p.Ser270Thr	g.81697868A>T	c.868T>A	C__26726209_10
rs2243639	p.Thr160Ala	g.81701722T>C	c.538A>G	C__26726205_10
rs10887199	Intrón	g.81702834T>C	c.200-199A>G	C__31530298_10
rs17886286	Intrón	g.81703852C>G	c.200-1217G>C	C__63652102_10
rs7078012	Intrón	g.81705433C>T	c.199+784G>A	C__29213175_10
rs6413520	p.Ser25=	g.81706281A>G	c.135T>C	C__1362981_20
rs721917	p.Met11Thr	g.81706324A>G	c.92T>C	C__1362980_10
rs723192	Intrón	g.81708013C>T	c.-4+809G>A	C__630297_10
rs1885551	Promotor	g.81712353A>G	-	C__12124527_20

En la primera columna se encuentra el código identificador (rs) de cada SNP. En la segunda, el tipo de SNP del que se trata. En la tercera, la posición genómica, en la cuarta, la posición relativa al ARNm y en la última el código identificador del ensayo prediseñado (*TaqMan®Predesigned SNP genotyping assay*).

Todas las PCRs se llevaron a cabo con un volumen final de 25 µl por pocillo y, para el proceso de amplificación del material genético, se empleó el equipo *ViiA™7 Real-Time PCR System* de *Life technologies* siguiendo los protocolos estandarizados: un paso inicial de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos, cada uno de 15 segundos a 92°C y un minuto a 60°C. Ciclo a ciclo en el ordenador se obtuvieron las curvas de fluorescencia que también se podían leer a punto final, a través del análisis y la lectura de las mismas con el programa *ViiA™7 Software Instrument Console*. De esta forma se obtienen las gráficas de discriminación alélica mostradas en las imágenes que se presentan a continuación, referenciadas como **ilustración 16 y 17**.

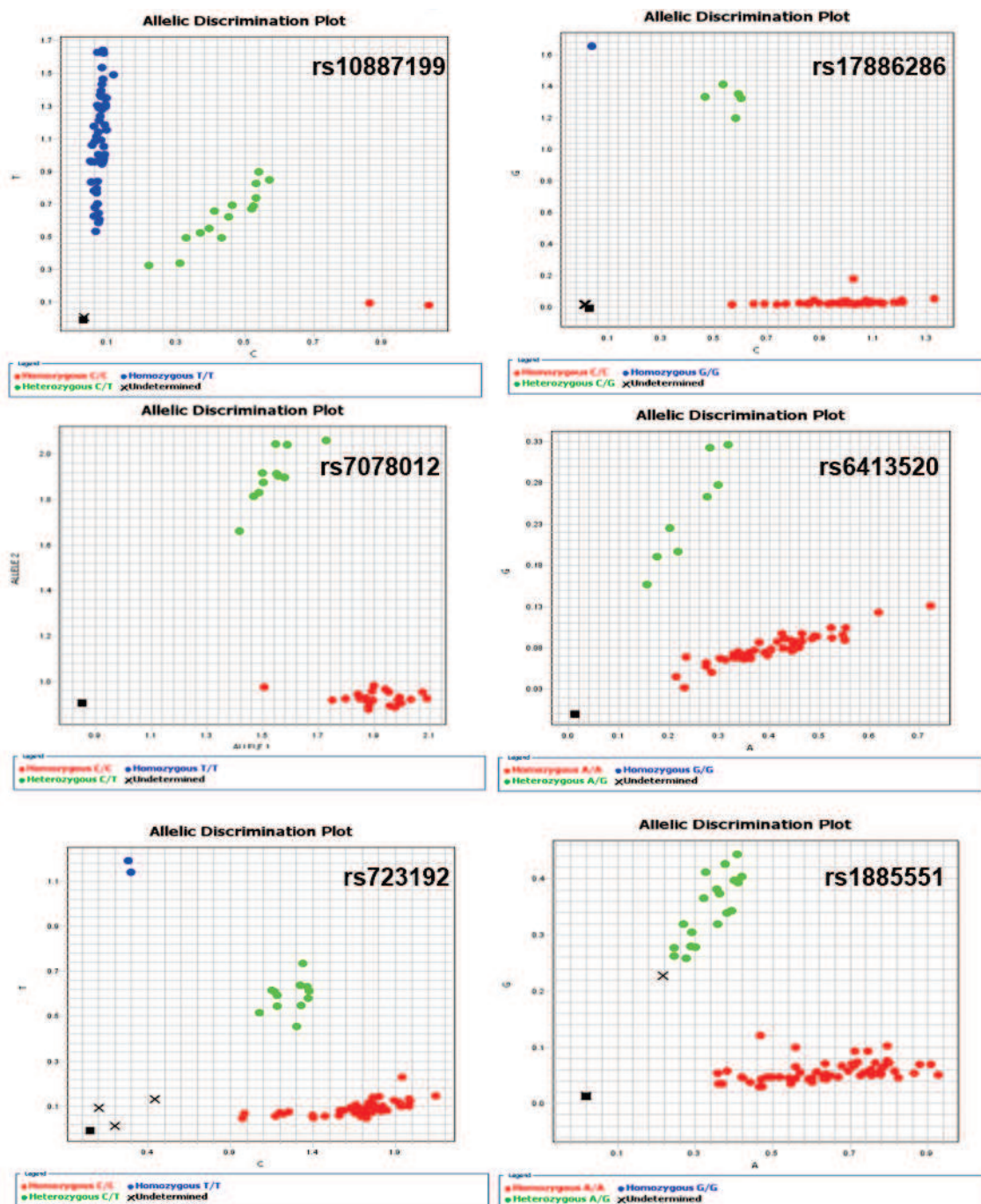


Ilustración 16. PCR a tiempo real en SNPs que no producen cambio de aminoácido en el gen *SFTPD*. Lectura de discriminación alélica a punto final de la PCR a tiempo real. Se representa en el eje Y de cada de las fluorescencias detectada de la sonda VIC, mientras que el eje X se corresponde con la sonda FAM.

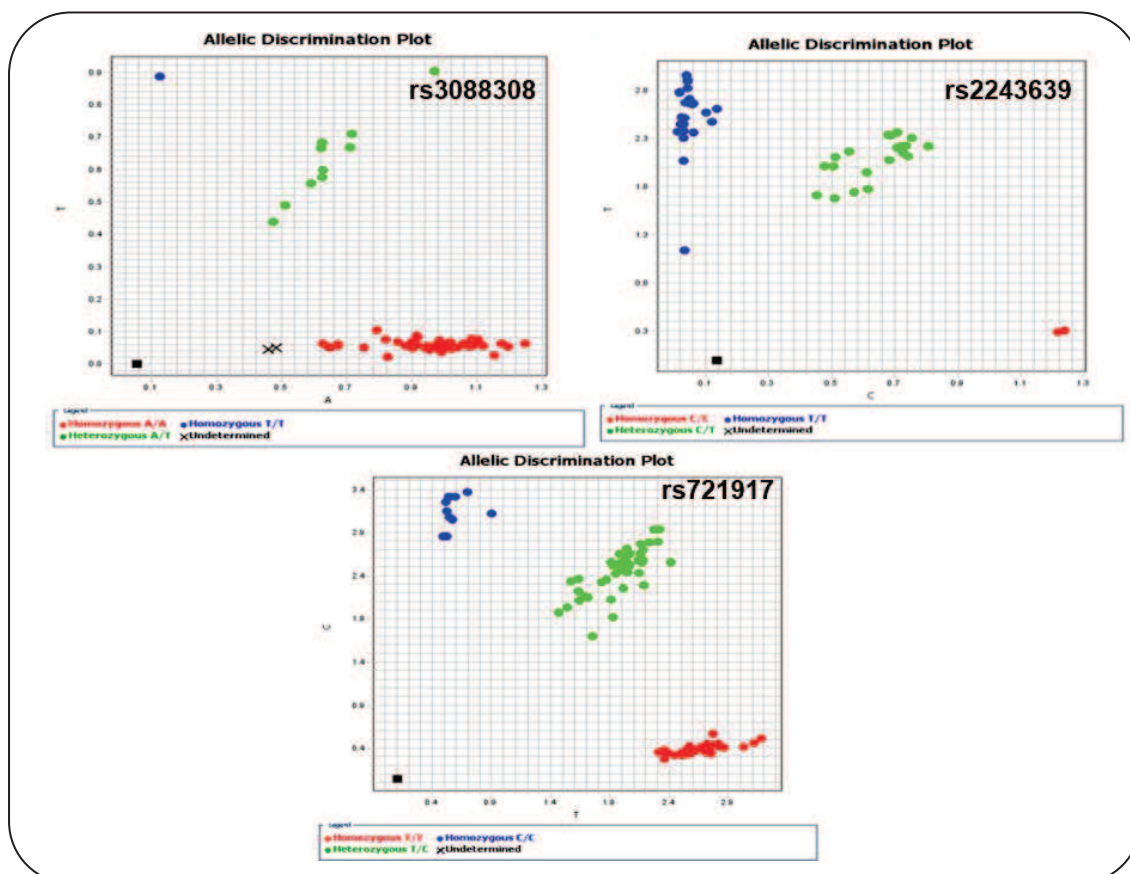


Ilustración 17. PCR a tiempo real de SNPs que producen cambio de aminoácido en el gen *SFTPD*.

En las gráficas de discriminación alélica se presentan en forma de puntos la lectura de la fluorescencia en el punto final de la reacción de amplificación. El eje Y de cada una de ellas se corresponde con la fluorescencia detectada de la sonda VIC, mientras que el eje X se corresponde con la sonda FAM.

2.2.2 Determinaciones séricas

La determinación de los niveles de SP-D en suero fue realizada sólo en individuos de la PGE y en los pacientes alérgicos a ácaros. Se obtuvieron de tres a siete mililitros de sangre de los individuos en un tubo *Vacutainer*, en el cual fue recolectada. Se centrifugó a 3.000 revoluciones por minuto durante 7-10 minutos y se recogió el contenido líquido resultante en la parte superior del tubo, que se corresponde con el suero.

La muestra biológica de cada individuo fue fraccionada en criotubos correctamente identificados para después ser conservados a -40°C hasta el momento de su uso. Se utilizaron sueros sometidos a una única

descongelación producida gradualmente para evitar la alteración en la detección de SP-D.

Las muestras, los controles de calidad y los estándares necesarios se diluyeron (1:11, siguiendo las instrucciones del fabricante) y se dispensaron con una pipeta en los pocillos que contenían el anticuerpo monoclonal anti-SP-D adherido. Después de dos horas de incubación se procedió a realizar lavados retirando el suero de los pocillos. Se añadió el anticuerpo primario marcado con biotina (anticuerpo monoclonal capaz de reconocer la SP-D que había quedado unida al pocillo) incubándolo durante una hora. Tras varios lavados, se añadió un conjugado de streptavidina-HRP que se unía a la biotina por alta afinidad. Esto genera una reacción enzimática que torna los pocillos de color azul cuando se añade la solución de sustrato que contiene tetra-metil-bencidina. La reacción hace que se cambie a color amarillo más o menos intenso según la concentración de SP-D detectada.

Las placas donde se realizaron los ensayos estaban disponibles comercialmente, ya diseñadas y fabricadas con anticuerpos monoclonales anti-SP-D adheridos, capaces de unir específicamente la SP-D humana (*Human SP-D ELISA kit, de Biovendor, Alemania*).

La técnica para la realización de este ensayo se llevó a cabo de manera semiautomática: todo el pipeteo fue manual pero los periodos de incubación, lavado, agitación, así como el análisis de las cuantificaciones, se realizaron con el sistema automatizado analizador TRITURUS 4.01 (*Diagnostic Grifols S.A., España*).

Las absorbancias medidas fueron proporcionales a la cantidad de proteína SP-D (se comparan intensidades tras la lectura a 450 nm tomando como referencia 620 nm en el espectrofotómetro) y se logró la curva de calibración mostrada en la **ilustración 18**.

La curva de calibración se construyó con los puntos de absorbancia de los estándares (con concentraciones de SP-D conocidas), que se muestran en la **tabla 5**, y la concentración de las muestras desconocidas se determinó

utilizando la interpolación de datos desde la curva de calibración estándar para cada ensayo.

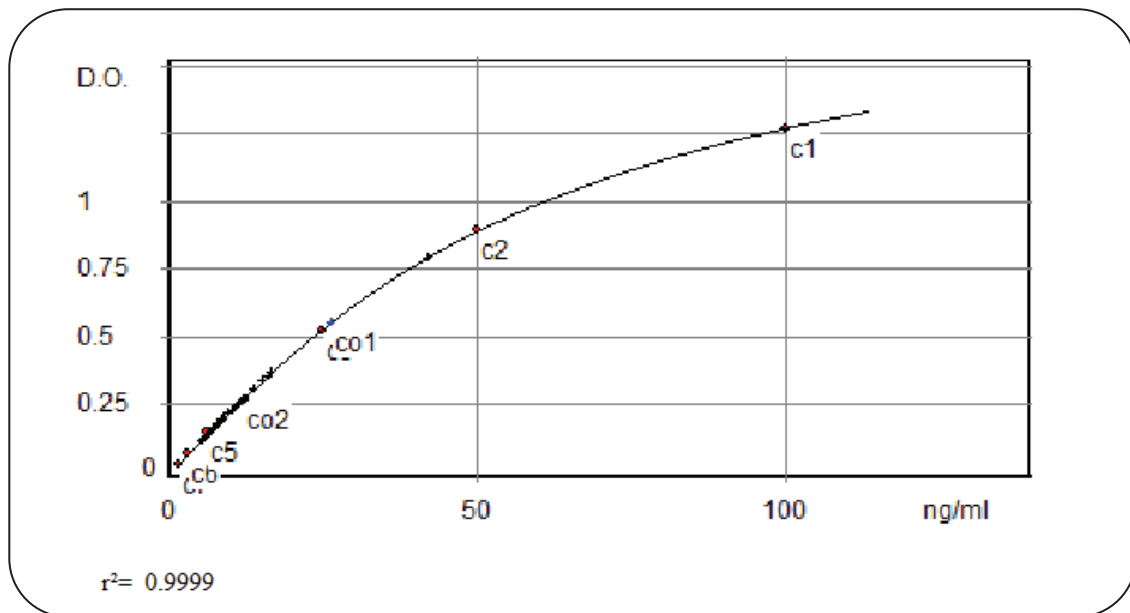


Ilustración 18. Curva de calibración para la extrapolación de los datos a la concentración de SP-D.
El gráfico de la curva de calibración para la extrapolación de los datos a la concentración de SP-D sérica fue obtenido por el método de cálculo de regresión logística de cuatro parámetros (4PL) con los datos mostrados en la **tabla 5**.

Tabla 5. Datos de los calibradores, los controles positivos y el negativo (blanco).

Calibradores	D.O.	Media	CV(%)	ng/ml
C1 (Cal 100)	1.268 1.273	1.271	0.3	100
C2 (Cal 50)	0.896 0.885	0.891	0.9	50
C3 (Cal 25)	0.528 0.521	0.525	0.9	25
C4 (Cal 12.5)	0.259 0.269	0.264	2.7	12.5
C5 (Cal 6.25)	0.145 0.149	0.147	1.9	6.25
C6 (Cal 3.13)	0.066 0.071	0.068	5.2	3.12
C7 (Cal 1.56)	0.029 0.03	0.029	2.4	1.56

Controles	D.O.	Media	CV(%)	ng/ml
CO1 (C ALTO)	0.563 0.544	0.553	2.4	26.3*
CO2 (C BAJO)	0.275 0.262	0.269	3.4	12.1*

Blanco	D.O.	Media	CV(%)	ng/ml
Blanco	0.016 0.017	0.016	4.3	0

Datos para la representación de la curva de calibración por el método de cálculo de regresión logística de cuatro parámetros (4PL).

2.3 Herramientas para el análisis de datos

Se realizó un estudio descriptivo de los datos obtenidos para, posteriormente, efectuar un análisis estadístico univariante y multivariante. La estadística univariante se realizó con el objeto de detectar, mediante tests paramétricos y no paramétricos, la distribución de las variables. El análisis estadístico se llevó a cabo tomando intervalos de confianza al 95% y un nivel de significación del 5%. Para evitar hallazgos no fiables se aplicó la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. Los análisis se realizaron con paquetes estadísticos, softwares específicos y lenguaje R, como se resume en la **ilustración 19**.

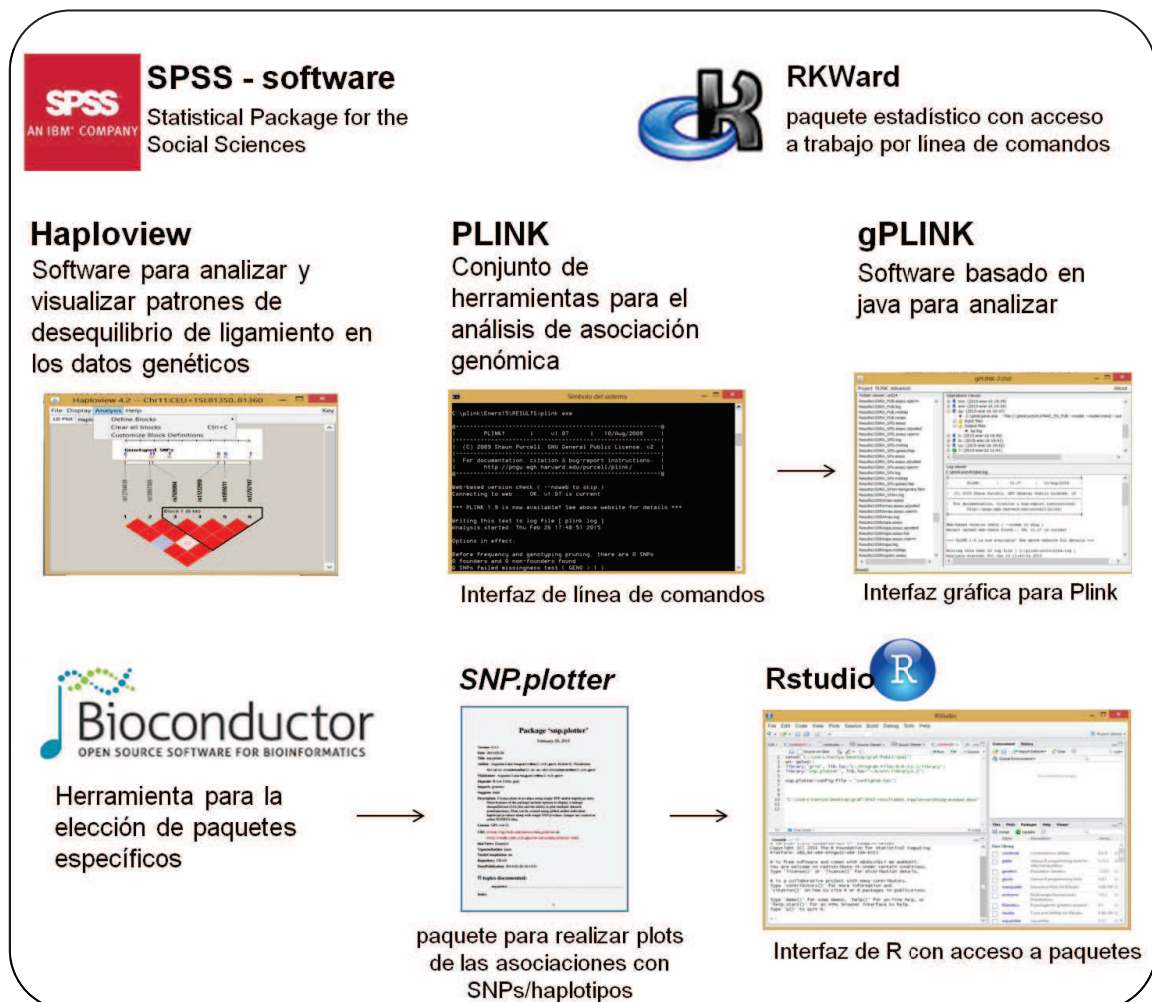


Ilustración 19. Herramientas utilizadas para el análisis y representación de los datos.

En la parte superior se encuentran enunciados los paquetes estadísticos utilizados (SPSS 20.0 y RKward), en la parte intermedia los softwares específicos de genética (Haploview 4.2 y Plink 1.07) y, en la parte inferior, el método llevado a cabo para la representación de las significaciones de las comparaciones alélicas mediante la ejecución de un paquete localizado en Bioconductor, llamado SNPplotter, en Rstudio).

Los análisis estadísticos se ejecutaron mediante el software *SPSS* (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, Estados Unidos) y el *RKwards* 0.6.3 (<https://rkward.kde.org>). La asociación de cada uno de los polimorfismos con la variable fenotípica se resumió en los valores de p del test de la χ^2 y en los supuestos de significación, en odd-ratios, las cuales se estimaron mediante intervalos de confianza al 95%.

Un contraste de hipótesis se consideró significativo cuando el correspondiente valor de p fue inferior a 0,05 aunque finalmente se consideró que superaba la corrección para múltiples comparaciones de Bonferroni cuando el valor de p fue inferior a 0,0033. Dicho valor se corresponde con el análisis de los 15 polimorfismo incluidos en los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral. No obstante, si tenemos en cuenta el DL presente entre tres de los SNPs incluidos se podrían considerar que realizamos 12 comparaciones, por lo que el valor de p que se puede considerar que supera el test de Bonferroni es 0,0041.

Se realizó la comparación de las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas por regresión logística multivariante asumiendo modelos de herencia dominantes y recesivos ajustados por covariables en grupos de pacientes y la PGE, y subgrupos de pacientes según la gravedad de diagnóstico. Con las variantes no cualitativas se analizó la influencia de los SNPs bajo el modelo de regresión lineal ajustado por covariables en cada caso. El análisis de correlación entre variables cuantitativas se realizó mediante el Test de correlación de *Pearson* y de *Spearman*.

Para la selección de *tagSNPs*, la estimación y el cálculo del desequilibrio de ligamiento (D' y r^2) hemos utilizado el *Haploview* 4.2 (en la PGE incluida en nuestra publicación del trabajo realizado en pacientes con NAC (García-Laorden et al., 2011) había sido calculado mediante *Arlequín* 3.11, por lo que se recalculó para esta Tesis Doctoral).

Las frecuencias alélicas y genotípicas observadas se determinaron por recuento directo en cada grupo de estudio. El equilibrio Hardy-Weinberg (HWE, *Hardy-Weinberg equilibrium*) se testó utilizando el test de χ^2 , con corrección de Yates, para comparar las frecuencias genotípicas observadas y las

esperadas, y en esta Tesis se muestran los resultados del cálculo del mismo obtenidos con *PLINK 1.07* (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) (Purcell et al., 2007). La inferencia de haplotipos se realizó mediante el último software mencionado, diseñado exclusivamente para estudios de asociación genética capaz de integrar todo el análisis estadístico específico necesario. Se trata de un conjunto de herramientas de código abierto (*open source*) para el análisis de asociación del genoma.

Los resultados tras el análisis de las comparaciones alélicas se representaron mediante un gráfico en el que el eje Y representa el logaritmo negativo del valor de p ($-\log_{10}$) y el eje X los SNPs analizados de cada uno de los genes. Se utilizó una interfaz de lenguaje de programación estadística R, denominada *Rstudio* (Racine, 2012), que cuenta con acceso a paquetes específicos. Concretamente, el paquete cargado para ejecutar la representación gráfica se denomina *SNP.plotter* (Luna y Nicodemus, 2007) y se encuentra disponible en la web *Bioconductor* (<http://www.bioconductor.org>), que posee una comunidad de usuarios que proporciona herramientas para el análisis y la comprensión de los datos genómicos, su gran ventaja es que es de código abierto y de libre desarrollo (Gentleman et al., 2004). Con la finalidad de mostrar la localización genética de los SNPs se han fusionado dos representaciones gráficas. En la parte inferior de cada uno de los gráficos obtenidos tras ejecutar *SNP.plotter* se representa la distribución espacial de los SNPs en las regiones genéticas obtenidas mediante el software *Locuszoom* (Pruim et al., 2010).

ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA

En este apartado se detallan, de forma clara y concisa, la variabilidad de los genes que codifican las SPs (epidemiología genética y LD) y tres estudios en relación al papel que desempeñan esas variaciones en tres grupos de pacientes con enfermedad pulmonar. Para su mejor comprensión y lectura, en cada uno de los tres estudios se ha incluido la descripción de los pacientes, las hipótesis, los objetivos, la explicación de los resultados obtenidos, la discusión de los mismos y las conclusiones de cada uno de ellos.

2.4 *Epidemiología genética y desequilibrio de ligamiento*

Los genes *SFTPA1* y *SFTPA2* se sitúan muy próximos entre sí (separados por sólo 50,5 Kb) y, en el mismo cromosoma, a 323,5 Kb, se encuentra el gen *SFTPD*. Esta localización hace que sea adecuado el cálculo de LD existente entre ellos.

Las frecuencias de los SNPs y haplotipos correspondientes a los tres genes en los individuos de la PGE utilizada de referencia son parecidas a las previamente descritas para la población europea (Liu et al., 2003). Los mapas de ligamiento genético se utilizaron para representar la segregación de los SNPs. En la **ilustración 20** se representan los valores de D' obtenidos para la PGE cuando se consideraron los 15 SNPs de los tres genes. En la **ilustración 21** se muestran los valores del coeficiente de correlación (r^2) para medir el grado de LD entre los SNPs. El tamaño de la muestra (N) de individuos utilizado en el este análisis fue el máximo número que obtuvo la determinación genética de los 15 SNPs incluidos en el análisis (N=687) debido a la disponibilidad de las muestras de ADN y a las distintas necesidades en las técnicas de genotipado.

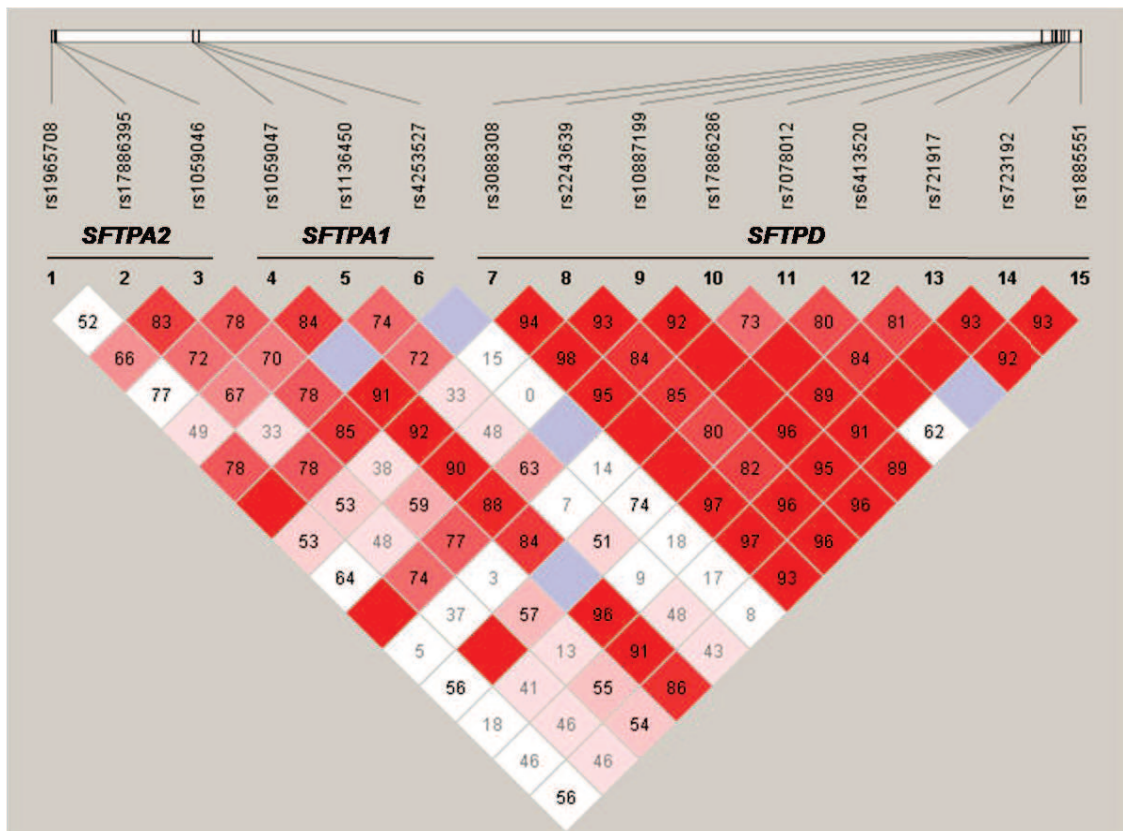


Ilustración 20. Desequilibrio de ligamiento (D') de *SFTP2*, *SFTP1* y *SFTPD* en PGE.

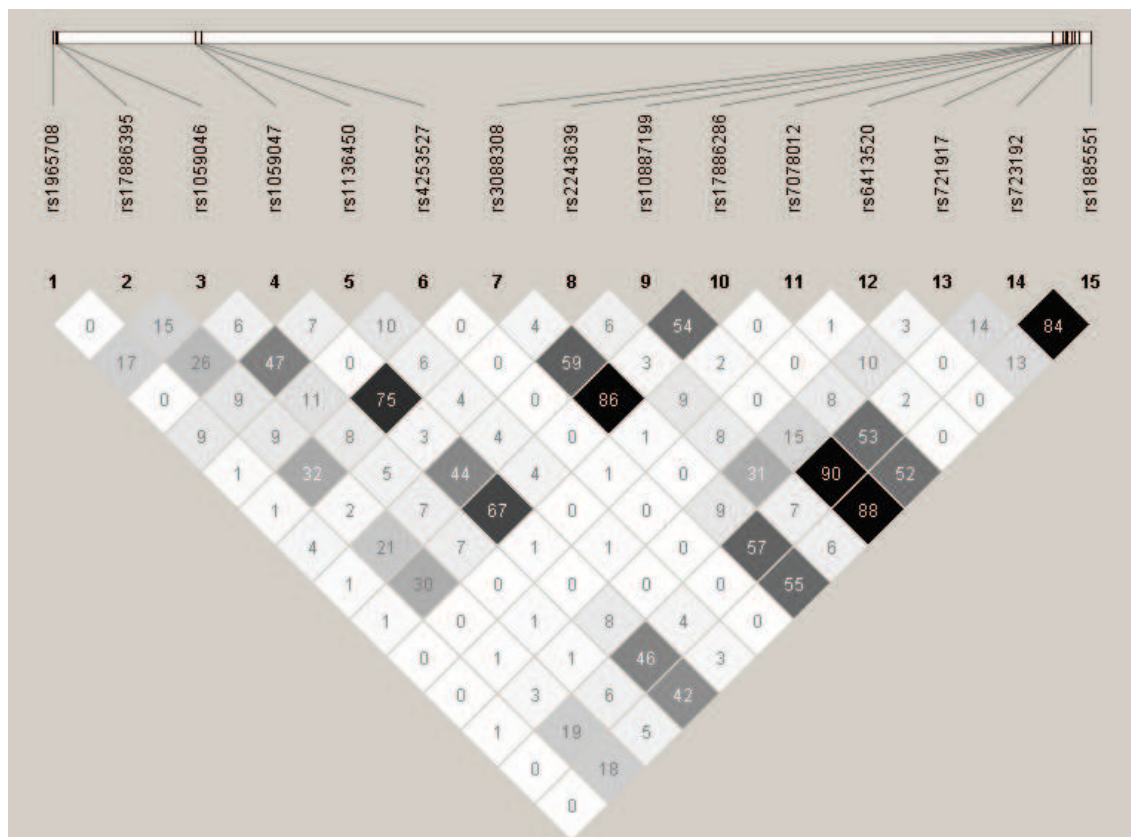


Ilustración 21. Desequilibrio de ligamiento (r^2) en *SFTP2*, *SFTP1* y *SFTPD* en PGE.

En la **tabla 6** se muestran las frecuencias alélicas de los 15 SNPs (tres de *SFTPA2*, tres de *SFTPA1* y seis de *SFTPD*) en la PGE y en las diversas poblaciones distribuidas mundialmente.

Tabla 6. Distribución de frecuencias alélicas en distintas poblaciones.

SNP	alelo	cambio	PGE	EA	EUR	AFR	AMR	ASN	AA	PGA
rs1965708	A	223K	0,19	0,20	0,20	0,39	0,15	0,20	0,36	0,11
rs17886395	C	91P	0,10	0,14	0,14	0,20	0,24	0,27	0,16	0,11
rs1059046	C	9T	0,35	-	0,47	0,23	0,43	0,41	-	0,17
rs1059047	C	19A	0,06	-	0,15	0,04	0,19	0,07	-	0,07
rs1136450	C	50L	0,37	-	0,53	0,34	0,42	0,29	-	0,23
rs4253527	T	219W	0,10	0,08	0,24	0,09	0,07	0,10	0,10	0,02
rs3088308	T	270S	0,07	0,07	0,07	0,01	0,16	0,02	0,02	0,07
rs2243639	C	160A	0,38	0,39	0,40	0,02	0,35	0,22	0,08	0,26
rs10887199	C	-	0,11	-	-	-	-	-	-	0,09
rs17886286	G	-	0,07	-	-	-	-	-	-	0,07
rs7078012	T	-	0,20	-	-	-	-	-	-	0,07
rs6413520	G	25S	0,07	0,07	0,09	-	0,05	0,00	0,02	0,06
rs721917	C	11T	0,40	0,42	0,41	0,41	0,41	0,62	0,40	0,43
rs723192	T	-	0,11	-	-	-	-	-	-	0,09
rs1885551	G	-	0,11	-	-	-	-	-	-	0,09

En la primera columna se identifican los SNPs, en la segunda el alelo menos frecuente, en la tercera el aminoácido que codifica y, a partir de la cuarta columna, las frecuencias de estos alelos en las poblaciones denominadas como PGE (población general española incluida en nuestro estudio), EA (población euroamericana), EUR (población europea), AFR (Población africana), AMR (Mezcla de poblaciones americanas), ASN (población del este de Asia), AA (población afroamericana) y, por último, PGA-EUR (panel de población europea <http://pga.gs.washington.edu>)

Los caracteres heredados en las distintas poblaciones mundiales se encuentran en cada una de ellas con una frecuencia determinada. El estudio de la frecuencia de las variantes en los genes de las SPs en la PGE nos permitirá poder compararlas con otras poblaciones incluidas en esta Tesis Doctoral. Hemos realizado el análisis haplotípico mediante la herramienta PLNK teniendo en cuenta haplotipos que se encuentren al menos en el 5% de los individuos.

En la **tabla 7** se detallan las frecuencias genotípicas presentes en la PGE y se muestra que todos los SNPs tienen una distribución sin diferencias significativas respecto a las esperadas para una población bajo las condiciones de equilibrio enunciadas por Hardy y Weinberg (HWE, Hardy-Weinberg Equilibrium). Es decir, se ha comprobado que la población utilizada como referencia es panmíctica y no está seleccionada para ningún carácter particular.

Tabla 7. Frecuencias genotípicas en la población general española.

Variantes	Genotipos	Población general española	HWE
SFTPA2		N=769	Valor de p
rs1965708 (Q223K)	CC / CA / AA	503 (65,4) / 244 (31,7) / 22 (2,9)	0,24
rs17886395 (A91P)	GG / GC / CC	623 (81,0) / 134 (17,4) / 12 (1,6)	0,13
rs1059046 (T9N)	AA / AC / CC	323 (42,0) / 349 (45,4) / 97 (12,6)	0,86
SFTPA1		N=769	Valor de p
rs1059047 (V19A)	TT / TC / CC	680 (88,4) / 88 (11,4) / 1 (0,1)	0,29
rs1136450 (L50V)	GG / GC / CC	318 (41,4) / 334 (43,4) / 117 (15,2)	0,06
rs4253527 (R219W)	CC / CT / TT	620 (80,6) / 142 (18,5) / 7 (0,9)	0,72
SFTPD		N=963	Valor de p
rs3088308 (S270T)	AA / AT / TT	829 (86,1) / 129 (13,4) / 5 (0,5)	1,00
rs2243639 (T160A)	TT / TC / CC	373 (38,7) / 449 (46,6) / 141 (14,6)	0,78
rs10887199 (Intr)	TT / TC / CC	759 (78,8) / 189 (19,6) / 15 (1,6)	0,42
rs17886286 (Intr)	CC / CG / GG	828 (86,0) / 126 (13,1) / 9 (0,9)	0,10
rs7078012 (Intr)	CC / CT / TT	629 (65,3) / 292 (30,3) / 42 (4,4)	0,30
rs6413520 (S25S)	AA / AG / GG	824 (85,6) / 134 (13,9) / 5 (0,5)	1,00
rs721917 (M11T)	TT / TC / CC	356 (37,0) / 438 (45,5) / 169 (17,5)	0,09
rs723192 (Intr)	CC / CT / TT	757 (78,6) / 195 (20,3) / 11 (1,1)	0,87
rs1885551 (Prom)	AA / AG / GG	766 (79,5) / 182 (18,9) / 15 (1,6)	0,25

En la **tabla 8** se muestran las frecuencias haplotípicas de los seis SNPs analizados de los dos genes que codifican la SP-A (N=769) y de los nueve SNPs seleccionados del gen que codifica la SP-D (N=963).

Tabla 8. Frecuencias haplotípicas en la población general española.

SFTPA2-SFTPA1			frec.hap	SFTPD		frec.hap
ACCTCC	1A ¹⁰ 6A ³	0,0076	ACTCCACCA	D ⁵ -TCCACA		0,0192
AGATCC	1A ³ 6A ³	0,0109	ACTCCATCA	D ¹ -TCCACA		0,2770
AGATGC	1A ³ 6A ²	0,0271	ACTCCGTCA	D ¹ -TCCGCA		0,0505
AGCTCC	1A ¹ 6A ³	0,1185	ACTCTGTCA	D ¹ -TCTGCA		0,0154
AGCTGC	1A ¹ 6A ²	0,0271	ATCCCACTG	D ² -CCCATG		0,0327
CCATGC	1A ⁷ 6A ²	0,0108	ATTCCACCA	D ² -TCCACA		0,2196
CCCCCC	1A ¹ 6A	0,0379	ATTCCATCA	D ³ -TCCACA		0,1092
CCCTCC	1A 6A ³	0,0099	ATTCTACCA	D ² -TCTACA		0,0473
CCCTCT	1A 6A ⁴	0,0325	ATTCTATCA	D ³ -TCTACA		0,1179
CGATCC	1A ⁰ 6A ³	0,0521	TTCGCACTG	D ⁴ -CGCATG		0,0604
CGATGC	1A ⁰ 6A ²	0,4826				
CGATGT	1A ⁰ 6A ¹²	0,0118	ACT	D¹		0,3542
CGCCCC	1A ² 6A	0,0117	ATC	D²		0,3069
CGCTCC	1A ² 6A ³	0,0476	ATT	D ³		0,2421
CGCTCT	1A ² 6A ⁴	0,0467	ACC	D ⁵		0,0246
CGCTGC	1A ² 6A ²	0,0184	TTC	D ⁴		0,0706
N=769			N=963			

Estudio I

2.5 *Neumonía adquirida en la comunidad*

Este primer trabajo propone el análisis de 15 SNPs de las SPs y su posible asociación con la neumonía adquirida en la comunidad (NAC).

La NAC es la causa de hospitalización por infección más común en los países industrializados. Varios microorganismos pueden ser los agentes causales de la NAC pero el principal es *S. pneumoniae* (Mandell et al., 2007). La morbimortalidad de una neumonía viene determinada por el resultado de una compleja interacción entre elementos del microorganismo (virulencia, carga bacteriana, serotipo, infecciones previas o acompañantes...), la intervención terapéutica (cobertura, posología, dosificación, precocidad, combinación, vía de administración...) y, muy especialmente, factores ligados al huésped (edad, comorbilidades, inmunodepresión...). No obstante, en la práctica clínica se continúa observando muertes por neumonía en sujetos sin factores de riesgo ni enfermedades subyacentes, a pesar de recibir un tratamiento antimicrobiano adecuado; también se constata que más de la mitad de los fallecimientos por neumonía neumocócica bacteriémica se producen en pacientes de menos de 65 años; y que la infección por una cepa idéntica de *S. pneumoniae* puede causar shock séptico, SDRA y muerte en un determinado paciente, o una infección banal y autolimitada en otro. La fisiopatología de las infecciones respiratorias explica muchas de las manifestaciones clínicas específicas pero no aclara suficientemente porqué sólo algunos pacientes sufren este tipo de evolución, o ciertas complicaciones.

La dotación genética de cada paciente puede justificar la reconocida variabilidad interindividual en la susceptibilidad y en la evolución de las infecciones en general y de la neumonía en particular. En la actualidad, numerosos datos sugieren que la susceptibilidad a las infecciones tiene un elevado componente hereditario. Las primeras evidencias que apoyaron la hipótesis de que la variabilidad clínica y la inmunodeficiencia eran hereditarias proceden de observaciones de agregación familiar o étnica de infecciones, tanto raras como comunes, que seguían un patrón de herencia mendeliano

(Alcais et al., 2009). Estudios epidemiológicos de niños adoptados también apoyan la tesis de la heredabilidad de la predisposición a sufrir infecciones (Sorensen et al., 1988). Sorensen *et al* publicaron un estudio sobre las causas de muerte prematura en 1.000 familias con niños adoptados a edad temprana y comprobaron que, si los padres biológicos de estos niños habían fallecido por una infección antes de los 50 años de edad, su hijo tenía un riesgo relativo de morir por infección de 5,81 pero si había fallecido por una neoplasia no implicaba para el hijo un mayor riesgo de morir por este motivo; además, el fallecimiento de los padres adoptivos por una infección no confería un mayor riesgo al hijo adoptado de fallecer por esta causa, mientras que si el padre adoptivo moría por cáncer el hijo tenía un riesgo 5,16 veces mayor de morir por una neoplasia. Por tanto, la susceptibilidad y la respuesta a la infección parecen tener una influencia genética sorprendentemente importante, mientras que el desarrollo de cáncer tiene una acentuada influencia ambiental.

Las variantes genéticas en los componentes del sistema inmune influyen en la respuesta frente a las enfermedades infecciosas. Cada vez se describen más trastornos congénitos de la inmunidad innata, conocidos como inmunodeficiencias primarias (IDP) convencionales, que se asocian a múltiples infecciones; también encontramos enfermedades infecciosas comunes, cuya base genética implica, probablemente, la alteración de muchos genes. En todo caso, esta distinción entre predisposición mendeliana en individuos con infecciones raras (un gen, infecciones múltiples), y predisposición compleja o poligénica en poblaciones con infecciones habituales (una infección, múltiples genes), es cada vez menos nítida. Las principales IDP que predisponen a la infección neumocócica en humanos son aquellas que afectan a la opsonofagocitosis (Bustamante et al., 2008, Alcais et al., 2009) y, por tanto, a la capacidad de captura y eliminación innata de los agentes extraños.

2.5.1 Pacientes

Los pacientes incluidos en nuestro estudio fueron diagnosticados de NAC por los especialistas colaboradores en los Servicios de Neumología o en

la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de los cuatro Hospitales participantes en el estudio: el HUGCDN (Las Palmas de Gran Canaria), el Hospital de La Princesa (Madrid), el Hospital San Jorge (Huesca) y el Hospital Clinic y Universitari de Valencia (Valencia).

El diagnóstico de NAC se estableció en presencia de síntomas de infección de vías aéreas inferiores junto con la aparición de un infiltrado radiológico nuevo y sin diagnósticos alternativos durante el seguimiento en los pacientes. La etiología de la NAC fue de presunción si una muestra de esputo válida presentaba una bacteria única o predominante, y fue definitiva cuando se obtuvo un hemocultivo positivo para un patógeno potencial sin otro foco infeccioso aparente; se consideró el diagnóstico de NAC cuando se recuperó un microorganismo de muestras obtenidas con punción transtorácica o en líquido pleural; en presencia de una seroconversión con aumento de al menos cuatro veces el título inicial de IgG para *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii* y para virus respiratorios; cuando se obtuvo un título inicial de IgM >1:32 para *C. pneumoniae*, 1:80 para *C. burnetii*, y cualquier título para *Mycoplasma pneumoniae*; con un antígeno urinario positivo para *L. pneumophila* o para *S. pneumoniae*; o con recuentos $\geq 10^3$ unidades formadoras de colonias (ufc)/ml en muestras de catéter telescópado o biopsia pulmonar y de $\geq 10^4$ ufc/mL en lavado broncoalveolar.

El diagnóstico de NAC grave se estableció cuando se cumplían al menos tres de los siguientes criterios menores de la *American Thoracic Society*: frecuencia respiratoria ≥ 30 /minuto; insuficiencia respiratoria grave ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 250$ mmHg); afectación bilateral en la radiografía de tórax; afectación multilobular en la radiografía torácica; presión arterial sistólica < 90 mmHg; presión arterial diastólica ≤ 60 mmHg; o alguno de los siguientes criterios mayores: necesidad de ventilación mecánica; incremento del tamaño de los infiltrados radiológicos sin respuesta clínica; necesidad de drogas vasoactivas durante más de 4 horas; creatinina sérica >2 mg/dl o incremento de >2 mg/dl en un paciente con enfermedad renal previa o fracaso renal agudo con necesidad de diálisis. Además, los pacientes fueron clasificados en función de su gravedad con diagnósticos de sepsis, sepsis grave, shock séptico, SDRA y

fracaso multiorgánico (FMO), según los criterios definidos por la *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* (Bone et al., 1992, Dellinger et al., 2008). La insuficiencia respiratoria aguda (IRA) y el SDRA se diagnosticaron de acuerdo a la *American European Consensus Conference Definition* (Bernard et al., 1994). En cuanto a los pacientes que tuvieron que ser ingresados en la UCI, la gravedad de la enfermedad se evaluó mediante la puntuación definida por el *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score* (APACHE II), recogiendo la lectura en las primeras 24 horas de ingreso en UCI. También se registraron las complicaciones que aparecieron en los siguientes 30 días de la presentación de la NAC, incluyendo cualquier empeoramiento de las enfermedades de base del paciente y/o la presencia de shock (presión arterial sistólica <90 mm Hg no corregida por líquidos intravenosos, o que requiriera medicación vasopresora); coagulación intravascular diseminada; insuficiencia renal (creatinina sérica >1,5 mg/dl y/o urea >40 mg/dl en pacientes con función renal previa normal); insuficiencia respiratoria ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ <300 mmHg o <200 mm Hg cuando si se trataba de pacientes con EPOC); y metástasis sépticas (meningitis, empiema, artritis séptica, endocarditis, pericarditis purulenta, otitis). También se registró la necesidad de traslado del paciente a la UCI o de ventilación mecánica y la mortalidad a los 28 y a los 90 días de la presentación de la neumonía. Igualmente se recogió la duración del tratamiento antibiótico (oral e intravenoso), su adecuación de acuerdo a las recomendaciones de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) (Menendez et al., 2010) y la duración de la estancia hospitalaria.

Se excluyeron los pacientes con diagnóstico de neumonía intrahospitalaria, neumonía obstructiva por neoplasia, cuando la NAC fue considerada un evento terminal de una enfermedad crónica o la etiología fue *M. tuberculosis*. Tampoco se incluyeron los pacientes portadores del VIH, los trasplantados de médula ósea o de órgano sólido, los que recibían tratamiento con esteroides sistémicos a dosis superiores a 20 mg/día (prednisona, o su equivalente) durante dos semanas o más y aquellos con una inmunodepresión grave (IDP o con una neutropenia significativa, neutrófilos $<1,0 \times 10^9/\text{L}$).

Los pacientes incluidos en este estudio fueron reclutados durante el periodo comprendido entre 2002 y 2012. Se registraron los datos de los pacientes que cumplieron los criterios mencionados y que firmaron el consentimiento informado correspondiente a este trabajo.

Los análisis genéticos de los SNPs se realizaron en 1.009 pacientes con NAC para el estudio de asociación genética con *SFTPA2* y *SFTPA1* y en 724 para el estudio de *SFTPD*. Para cada uno de los dos estudios la procedencia de estos pacientes fue la siguiente: 290 (2,7%) y 192 (26,5%) procedentes de HUGCDN; 210 (20,8%) y 150 (20,7%) del Hospital de La Princesa; 311 (30,8%) y 231 (3,9%) del Hospital Clinic Universitari de Valencia, y 198 (19,6%) y 151 (20,9%) del Hospital San Jorge de Huesca. La edad media de los pacientes fue de $62,65 \pm 17,67$ y de $61,59 \pm 18,32$ años, siendo hombres el 66,2% y 65,9%, y fumadores el 39,7% y el 39,4%, respectivamente para cada uno de los dos estudios. En la **tabla 9** se muestran las características principales de estos pacientes y sus co-morbididades asociadas. La mayoría de los pacientes presentaba al menos una enfermedad de base; sólo 363 (36%) y 258 (35,6%) no presentaron ninguna co-morbilidad.

Tabla 9. Características clínicas de los pacientes (I).

Diagnóstico positivo	A (N=1.009)		D (N=724)		Co-morbididades*	A (N=1.009)		D (N=724)	
	N	(%)	N	(%)		N	(%)	N	(%)
IRA	664	(65,8)	482	(66,6)	EPOC	284	(28,1)	219	(30,2)
SDRA	52	(5,2)	44	(6,1)	Asma	48	(4,8)	196	(27,1)
shock	167	(16,6)	122	(16,9)	Neoplasia	104	(10,3)	40	(5,5)
FMO	152	(15,1)	117	(16,2)	Cardiopatía isquémica	114	(11,3)	80	(11)
Bacteriemia	103	(10,2)	84	(11,6)	Diabetes	216	(21,4)	83	(11,5)
Exitus	62	(6,1)	41	(5,7)	Insuficiencia renal	76	(7,5)	153	(21,1)
					Insuficiencia hepática	60	(5,9)	53	(7,3)
PNAC	257	(25,5)	213	(29,4)	Patología neurológica	121	(12)	42	(5,8)
UCI	284	(28,1)	216	(29,9)	Patología autoinmune	28	(2,8)	85	(11,7)
VM	190	(18,8)	150	(20,7)	Patología psiquiátrica	35	(3,5)	25	(3,5)

N=número de individuos y (%) porcentaje de individuos para cada característica. Se resume la información clínica disponible de los pacientes, en dos grupos (A, para los estudios de *SFTPA2-SFTPA1* en 1.009 pacientes y D para los 724 pacientes), mediante su recuento (N) y porcentaje (%). *De la relación de patologías de base que se pueden tratar como co-morbilidad para la enfermedad, algunos pacientes con NAC no presentaron ninguna y otros presentaron varias. IRA: insuficiencia respiratoria aguda, SDRA: síndrome distress respiratorio agudo, FMO: fallo multiorgánico, PNAC: NAC neumocócica, UCI: unidad de cuidados intensivos VM: ventilación mecánica, EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

2.5.2 Hipótesis

Las variantes en *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* modulan la predisposición que presentan los individuos a sufrir una NAC.

Las variantes en *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* influyen en la gravedad de los pacientes hospitalizados con NAC y/o en su evolución.

2.5.3 Objetivos

Comparar la distribución de las frecuencias de cada variante de los genes *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* (evaluadas a nivel de alelo, genotipo) en la PGE y en el grupo de pacientes con NAC.

Comparar las frecuencias de alelos y genotipos de los genes *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* entre subgrupos de pacientes con NAC según su gravedad.

Inferir los haplotipos y comparar las frecuencias de las distintas combinaciones con los 15 SNPs incluidos de los genes *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* entre pacientes con NAC y la PGE y en subgrupos de pacientes según su gravedad.

Con este planteamiento tratamos de encontrar respuesta a las siguientes preguntas:

- ¿Existe una distribución de alelos y genotipos de los SNPs de *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* diferente entre la PGE y el grupo de pacientes con NAC?
- ¿Existen SNPs de *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* significativamente asociados con la NAC y/o con la predisposición a una NAC más grave?
- ¿Existen combinaciones de dichos SNPs en haplotipos que se asocien?

2.5.4 Resultados

Para responder a estas preguntas hemos realizado el análisis de asociación genética empleando el tratamiento estadístico de los datos que ya se señaló en Métodos (página 52), y hemos obtenido los resultados que se detallan a continuación.

Al analizar las frecuencias alélicas que presentaron cada uno de los SNPs, se detectó que la mayoría de los alelos poco frecuentes en los sujetos de la PGE se encontraban presentes en mayor medida en los pacientes con NAC, (ver en la siguiente **Ilustración**):

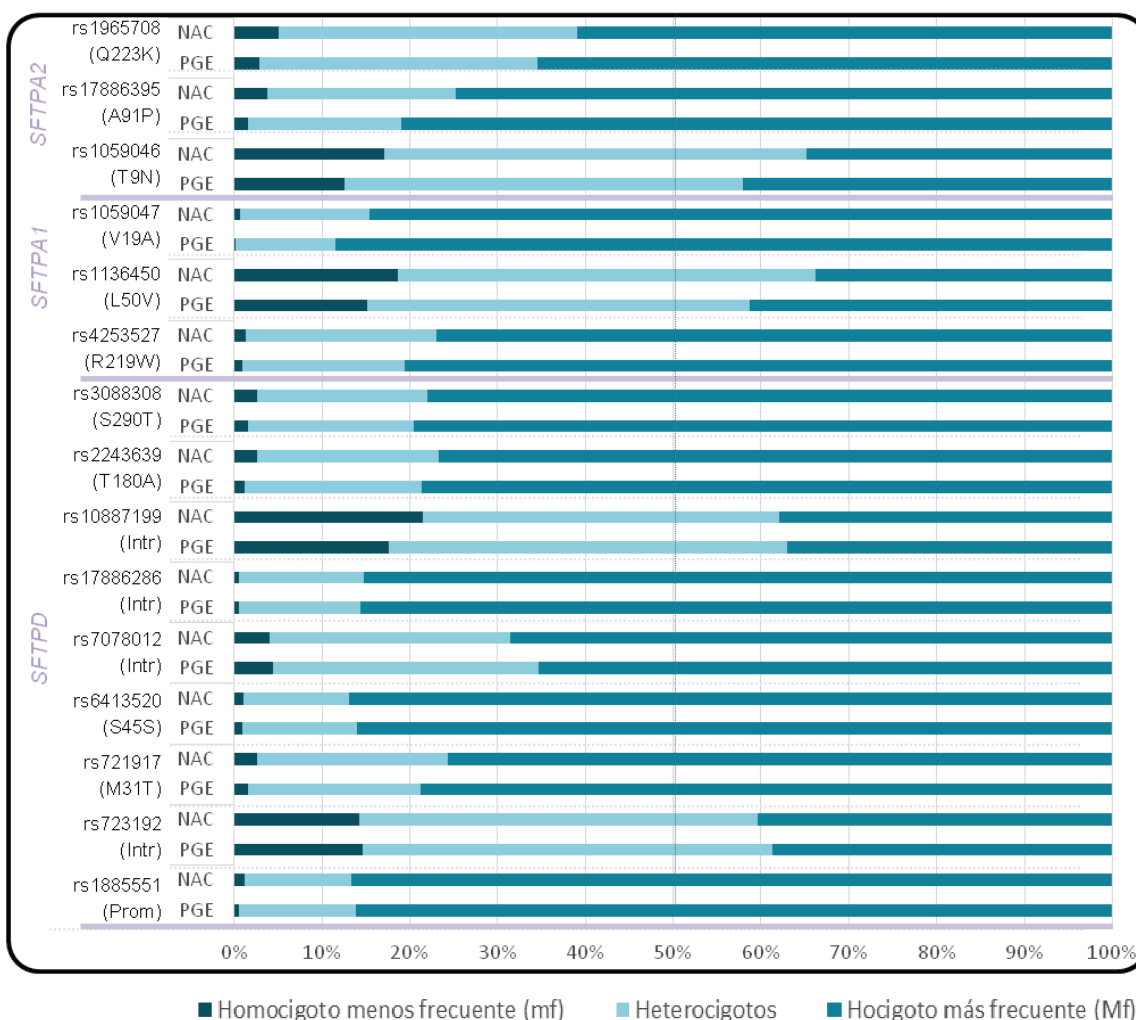


Ilustración 22. Frecuencias genotípicas en pacientes y en sujetos de la PGE (I).

NAC: neumonía adquirida en la comunidad. PGE: población general española. Distribución de las frecuencias de cada uno de los 15 SNPs incluidos en el estudio.

No obstante, solamente dos de los SNPs de *SFTPA2*, el alelo *rs17886395-C* ($P=0,00016$, OR 1,484, CI 95% 1,207-1,823) y *rs1059046-C*

($P=0,00041$, OR 1,280, CI 95% 1,116-1,468) y uno de *SFTPA1*, *rs1136450-C* ($P=0,00094$, OR 1,258, CI 95% 1,098-1,441), presentaron una diferencia significativa entre los 769 sujetos de la PGE y los 1.009 pacientes con NAC, tras realizar corrección para múltiples comparaciones y analizados con el género, la edad y el hábito tabáquico como co-variables. Al analizar las frecuencias genotípicas, el modelo de herencia fue dominante para los alelos detectados en el análisis de los SNPs de *SFTPA2* ($P=0,0013$ y $P=0,0022$) y recesivo para el SNP asociado de *SFTPA1* ($P=0,0041$). Por otro lado, el análisis alélico de los nueve SNPs seleccionados para el estudio del *SFTPD* se realizó en 724 pacientes con NAC y en 963 sujetos de la PGE y no encontrándose ninguna asociación significativa tras el ajuste. Sólo las asociaciones encontradas con el gen de *SFTPA2* permanecieron significativas tras la corrección de Bonferroni en este análisis.

Los pacientes con NAC incluidos en el estudio de la evaluación de la relación de los SNPs seleccionados con la predisposición a una NAC más grave fueron los ya mencionado para cada grupo de SNPs. Para la comparación de acuerdo a su gravedad, los pacientes se agruparon según tuvieran o no un diagnóstico de IRA, de SDRA, o de FMO,; hubieran ingresado o no en la UCI; y hubieran sobrevivido o no tras 90 días desde el ingreso hospitalario. La **ilustración 23** muestra los resultados de todas estas comparaciones alélicas para los 1.009 pacientes incluidos en el estudio de los SNPs de *SFTPA2* y *SFTPA1* y para los 724 de *SFTPD*. De los SNPs analizados, tanto de *SFTPA2* como de *SFTPA1*, ninguno presentó una diferencia significativa cuando comparamos los diagnósticos clínicos relacionados con una mayor gravedad de la NAC, ajustando por co-variables como género, edad y hábito tabáquico. De las variantes incluidas en el estudio de los SNPs de *SFTPD*, el alelo menos frecuente del SNP, que se sitúa en el promotor del gen *SFTPD* (*rs1885551-G*), se asoció con una mayor tasa de ingreso en la UCI ($P=0,0058$, OR 3,424, CI 95% 1,357-8,637). El alelo *rs2243639-C* también se asoció marginalmente. No obstante, dicho alelo, mediante un modelo de herencia recesivo ($P=0,0042$, OR 2,651, CI 95% 1,732-4,058) se asoció, además, con un mayor riesgo en las comparaciones

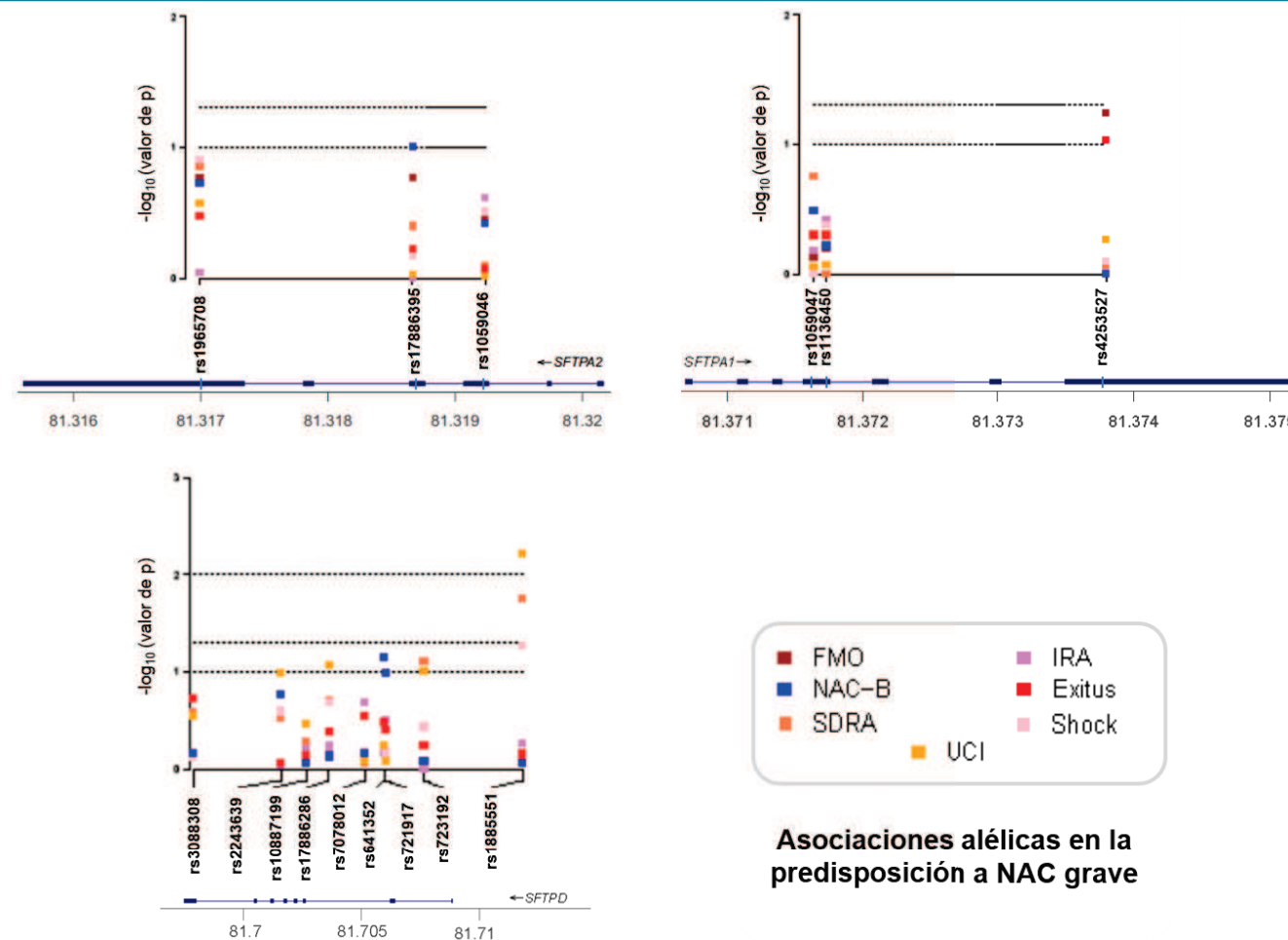


Ilustración 23. Significación estadística de las comparaciones alélicas (I).

FMO: Fallo multiorgánico. NAC-B: Neumonía bacteriémica. SDRA: Síndrome de distrés respiratorio agudo. IRA: insuficiencia respiratoria aguda. UCI: Unidad de Cuidados intensivos. Se ilustran las significaciones estadísticas (representadas como el $-\log_{10}$) de las diferencias de las frecuencias alélicas de los SNPs entre grupos de pacientes con NAC según presentaran o no los diagnósticos detallados en la leyenda. En la parte superior, seis SNPs de los genes que codifican para la SP-A y, en la parte inferior los nueve seleccionados del gen que codifica para la SP-D.

entre los pacientes con y sin FMO ($P=0,0021$, OR 2,144, CI 95% 1,308- con y 3,512), sin SDRA ($P=0,0021$, OR 2,144, CI 95% 1,308-3,512) y con y sin shock ($P=0,0025$, OR 2,093, CI 95% 1,284-3,404). Además, hemos observado que mediante un modelo de herencia co-dominante las significaciones son mayores en las comparaciones realizadas en los pacientes con FMO ($P=0,0014$), SDRA ($P=0,0014$) y en los que ingresaron en la UCI ($P=0,0007$).

Las combinaciones de los seis SNPs no sinónimos de *SFTPA2* y de *SFTPA1* en haplotipos fueron denominados según la nomenclatura ya descrita ($1A^n6A^n$) y se analizaron en 1.009 pacientes con NAC, mientras que el análisis del total de los SNPs seleccionados para *SFTPD* (nueve SNPs en los que se incluyen los tres no sinónimos) se realizó en 724 pacientes y se denominó según la nomenclatura ahora propuesta para los no sinónimos (D^n), seguido de los otros SNPs según su posición en el cromosoma.

Tabla 10. Asociaciones haplotípicas de *SFTPA2-SFTPA1* (I).

Comparación	Haplotipo	Valor de p	Factor
NAC / PGE	$1A^06A^2$ [0,45640 / 0,52610]	($P=0,00004$)*	PROTECTOR
NAC / PGE	$1A^76A^2$ [0,01503 / 0,00507]	($P=0,00434$)	RIESGO
SHOCK / No	$1A^{10}6A^2$ [0,009608 / 0,00134]	($P=0,00807$)	RIESGO
MUERTE / No	$1A^{10}6A^2$ [0,02075 / 0,00159]	($P=0,00010$)*	RIESGO
MUERTE / No	$1A^26A^4$ [0,10110 / 0,04573]	($P=0,00707$)	RIESGO

NAC: neumonía adquirida en la comunidad. PGE: población general española. El asterisco indica el valor de p que supera las correcciones realizadas para múltiples comparaciones.

En el análisis de las frecuencias haplotípicas para *SFTPA2-SFTPA1* (ver la **tabla 10**), se detectó que el haplotipo $1A^06A^2$, mayoritario en todas las poblaciones mundiales, era significativamente más frecuente en los sujetos de la PGE que en el grupo de pacientes con NAC (entre corchetes se presentan las frecuencias de los sujetos caso/control y entre paréntesis el valor de p para cada comparación): $1A^06A^2$ [0,4564 / 0,5261] ($P=0,0000399$).

Se encontraron otros haplotipos asociados: $1A^76A^2$ [0,01585 / 0,003654] ($P=0,007348$); $1A^6A^2$ [0,0005366 / 0,004765] ($P=0,01041$); $1A^{10}6A^4$ [0,006256 / 0,000518] ($P=0,01496$); $1A^{16}A^3$ [0,1294 / 0,1066] ($P=0,03817$); $1A^{10}6A^3$ [0,01023 / 0,004327] ($P=0,04627$). No obstante, sólo $1A^06A^2$ se mantuvo significativo tras la corrección para múltiples comparaciones y tras ajustar para

edad, sexo, co-morbilidad y hospital de procedencia. Es importante mencionar que el haplotipo $1A^76A^2$ era significativamente más frecuente en los sujetos de la PGE que en el grupo de pacientes con NAC neumocócica (PNAC) aunque no superó la corrección para múltiples comparaciones ($P=0,00735$).

En nuestro estudio evaluamos el papel de las variantes genéticas en la gravedad de la NAC y nos encontramos con un haplotipo, poco frecuente en las poblaciones generales, que se encuentra significativamente asociado a la mortalidad de los 1.009 pacientes con NAC analizados: $1A^{10}6A^2$ [0,02075 / 0,00159] ($P=0,00011$). Este haplotipo también se asoció a shock séptico [0,00961 / 0,00134] ($P=0,00807$) y SDRA, $1A^{10}6A^2$ [0,01762 / 0,00208] ($P=0,00841$). Además, el haplotipo $1A^26A^2$ se asoció al desarrollo de IRA [0,02561 / 0,00872] ($P=0,01018$), mientras que otros haplotipos se asociaron al desarrollo de FMO: $1A^{10}6A^4$ [0,00906 / 0,00163] ($P=0,02312$) y $1A^{16}A^2$ [0,05497 / 0,02428] ($P=0,04322$), aunque estas últimas comparaciones no superaron las correcciones estadísticas realizadas.

Tabla 11. Asociaciones haplotípicas de *SFTPD* (I).

Comparación	Haplotipo	Valor de p	Factor
NAC / PGE	D^2 -CCCACA [0,00680 / 0,00108]	($P=0,00603$)	RIESGO
NAC / PGE	D^3 -CCTACA [0,00583 / 0,00088]	($P=0,00992$)	RIESGO
NAC / PGE	D^6 -CGCACA [0,00356 / 0,01307]	($P=0,00424$)	PROTECTOR
NAC / PGE	D^4 -TGCATG [0,00819 / 0,00105]	($P=0,00147$)*	RIESGO
SHOCK / No	D^1 -TCCACG [0,01254 / 0,00017]	($P=0,00023$)*	RIESGO
UCI / No	D^1 -TCCACG [0,00715 / 0,00021]	($P=0,01145$)	RIESGO
SHOCK / No	D^1 -TGTACA [0,00836 / 0]	($P=0,00159$)*	RIESGO
MUERTE / No	D^1 -TGTACA [0,01220 / 0,00074]	($P=0,00702$)	RIESGO
UCI / No	D^1 -TGTACA [0,00477 / 0]	($P=0,02802$)	RIESGO
UCI / No	D^4 -TGCATG [0,01806 / 0,00396]	($P=0,00672$)	RIESGO
FMO / No	D^4 -TGCATG [0,02239 / 0,00547]	($P=0,00962$)	RIESGO
SDRA / No	D^4 -TGCATG [0,02239 / 0,00547]	($P=0,00962$)	RIESGO

NAC: neumonía adquirida en la comunidad. PGE: población general española. UCI: Unidad de Cuidados Intensivos. FMO: fallo multioránico. SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo. El asterisco indica el valor de p que supera las correcciones realizadas para múltiples comparaciones.

En el análisis de las frecuencias haplotípicas de los nueve SNPs de *SFTPD* (tabla 11), encontramos un haplotipo asociado como factor de protección frente a la NAC, D^6 -CGCACA [0,00356 / 0,00105] ($P=0,0004$) y tres haplotipos significativamente más frecuentes en los pacientes con NAC que en el grupo de sujetos de la PGE: el haplotipo D^2 -CCCACA [0,00680 / 0,00108]

($P=0,00603$), el D^3 -CCTACA [0,00583 / 0,00088] ($P=0,00992$) y el haplotipo D^4 -TGCATG [0,00819 / 0,00105] ($P=0,00147$).

Este último haplotipo, D^4 -TGCATG, fue el más asociado como factor de riesgo. Sin embargo, realizando esa misma comparación para haplotipos combinados $SFTPA2$ - $SFTPA1$ - $SFTPD$ (tabla 12) no obtuvimos ninguna asociación significativa, probablemente debido a la diferencia de tamaño muestral disponible al combinar el análisis de los 15 SNPs sumado a que esa variante es poco frecuente en la población.

Tabla 12. Asociaciones haplotípicas de $SFTPA2$ - $SFTPA1$ - $SFTPD$ (I).

Comparación	Haplotipo	Valor de p	Factor
NAC / PGE	Ninguna asociación con $p < 0,0033$ o similar		
MUERTE/ No	$1A^16A^2D^3$ -TCCACA	[0,01529 / 0,00034]	($P=0,00041$) RIESGO
MUERTE/ No	$1A^26A^4D^2$ -TCCACA	[0,04469 / 0,00742]	($P=0,00228$) RIESGO
FMO/ No	$1A^06A^2D^2$ -CCTATG	[0,01012 / 0,00032]	($P=0,00319$) RIESGO
FMO/ No	$1A$ $6A$ D^4 -TGCATG	[0,01949 / 0,00238]	($P=0,00171$) RIESGO
SHOCK/ No	$1A^06A^2D^1$ -TCCACG	[0,00900 / 0]	($P=0,00214$) RIESGO

NAC: neumonía adquirida en la comunidad. PGE: población general española. FMO: fallo multiorgánico. El asterisco indica el valor de p que supera las correcciones realizadas para múltiples comparaciones.

El análisis genético realizado nos reveló también la asociación entre el haplotipo D^4 -TGCATG y neumonía más grave ya que dicho haplotipo fue 4,5 veces más frecuente en el grupo de pacientes que ingresaron en la UCI ($P=0,00672$) y/o sufrieron SDRA y/o FMO ($P=0,00962$). Aunque estas asociaciones no superaron las correcciones estadísticas, cuando se analizaron los 15 SNPs, el haplotipo $1A6AD^4$ -TGCATG se asoció significativamente al FMO tras el ajuste ($P=0,00171$), y fue aproximadamente ocho veces más frecuente en los pacientes que tuvieron esta evolución. El haplotipo D^1 -TGTACA también se encontró más frecuentemente en los pacientes que ingresaron en la UCI ($P=0,02802$), en los que padecieron shock ($P=0,00159$) y/o fallecieron ($P=0,00702$), siendo en estos últimos 16 veces más frecuente. El haplotipo D^1 -TCCACG también se presenta como factor de riesgo en la comparación de pacientes con y sin shock ($P=0,00023$). De hecho, no se encontraron pacientes que no sufrieran shock y portaran el haplotipo $1A^06A^2D^1$ -TCCACG ($P=0,00214$) y, a su vez, se detectó que los pacientes con el haplotipo $1A^06A^2D^2$ -CCTATG, que también contenía el $1A^06A^2$, padecían FMO con más frecuencia.

Dos de los haplotipos que comprende el estudio de los 15 genes se asociaron como factor de riesgo a la muerte por NAC. Se trata de los haplotipos $1A^16A^2D^3$ -TCCACA ($P=0,00041$) y $1A^26A^4D^2$ -TCCACA ($P=0,00228$), los cuales comparten el haplotipo de los SNPs de *SFTPD* que no producen un cambio de aminoácido. Esta significación se mantiene tras las correcciones para múltiples comparaciones. Hay que destacar que el haplotipo $1A^16A^2D^3$ -TCCACA se asoció con una mayor significación cuando se evaluó la muerte tras sólo 28 días [0,02299 / 0,0003334] ($P=0,0000104$), lo que también se demostró para el $1A^26A^4D^2$ -TCCACA [0,05572 / 0,007693] ($P=0,001215$). Además, se encontró otro haplotipo, el $1A^06A^3D^3$ -TCTACA, asociado a la mortalidad en los primeros 28 días [0,04598 / 0,00609] ($P=0,002656$).

2.5.5 Discusión

Hasta la fecha no se han publicado otros trabajos en los que se analice la asociación entre las variantes genéticas de *SFTPA2*, *SFTPA1* y *SFTPD* con la susceptibilidad, la gravedad o la mortalidad de la NAC. Nuestro estudio muestra diversas asociaciones entre estas variables de la NAC y SNPs no sinónimos y haplotipos de esos genes.

Las frecuencias de los diferentes SNPs y haplotipos de *SFTPA2*, *SFTPA1* y *SFTPD* observadas en nuestro estudio son similares a los publicados en otras poblaciones europeas (detallado en el estudio de epidemiología genética realizado en esta Tesis Doctoral). En otros trabajos se ha observado la existencia de DL entre *SFTPA2* y *SFTPA1*, comprobándose que varios haplotipos de estos *loci* tienden a segregar conjuntamente, siendo $6A^21A^0$ el haplotipo más frecuente. En este primer estudio hemos observado un efecto protector de este haplotipo de *SFTPA2*-*SFTPA1*, $1A^06A^2$, frente a la NAC y un efecto de riesgo aportado por el haplotipo $1A^76A^2$ y el D^4 -TGCATG de *SFTPD* (que se encuentra sólo en aproximadamente el 1% de la PGE).

En nuestro estudio, varios SNPs y haplotipos se asociaron con una mayor gravedad y/o mortalidad de la NAC. El haplotipo $6A^21A^{10}$ se asoció con

una mayor mortalidad a 90 días, y también con la predisposición a shock. Por otra parte, dos haplotipos de *SFTPD* que comparten el haplotipo D^1 (*ATT* para los SNPs no sinónimos de *SFTPD*) se asocian a una mayor gravedad de la NAC: el haplotipo D^1 -*TCCACG* a FMO y el haplotipo D^1 -*TGTACA* a shock séptico. Además, identificamos que el haplotipo D^4 -*TGCATG* (asociado con la predisposición a la NAC) se asociaba, aunque en menor medida, con el ingreso en la UCI y con la predisposición al FMO y al SDRA, es decir, con una neumonía más grave.

El papel de la variabilidad genética de *SFTPA1* y *SFTPA2* en las poblaciones se ha evaluado sólo en unos pocos estudios (Floros et al., 2000, Lofgren et al., 2002, Thomas et al., 2009). Con respecto a las infecciones bacterianas, la homocigosidad para el haplotipo $1A^1$ se ha asociado con infección meningocócica (Jack et al., 2006). Hay que destacar que el haplotipo $6A^2$ - $1A^0$ ha mostrado un efecto protector en estudios en los que se evaluó el desarrollo de otitis media aguda en niños (Ramet et al., 2001). Estos resultados están en línea con los observados en nuestro trabajo, ya que *S. pneumoniae* y *H. influenzae* son patógenos frecuentes tanto en la OMA como en la NAC, y la SP-A es producida, como ya se ha mencionado. además de en el pulmón, en la trompa de Eustaquio. Por otra parte, se ha observado que los haplotipos $6A^2$ y $1A^0$ podrían ser también protectores frente a la bronquiolitis por VRS (El Saleeby et al., 2010).

Si se tiene en cuenta que estos haplotipos son, con diferencia, los más frecuentes en la población, es tentador proponer que $6A^2$, $1A^0$ y $1A^06A^2$ podrían haberse mantenido a alta frecuencia en la población debido a su papel protector frente a infecciones respiratorias. Por otra parte, el haplotipo $6A1A$ se asoció, en niños con riesgo de asma, a un aumento de la probabilidad de cuadro catarral desencadenado por infecciones respiratorias o por contaminantes ambientales y de que éste se hiciera persistente (Pettigrew et al., 2007). En nuestro estudio, el $1A6A^4$ -*TGCATG* se asoció a una mayor predisposición al FMO. Curiosamente, el alelo *rs721917-C* (*Thr¹¹*) de *SFTPD*, presente en el haplotipo D^4 (*TTC*), se ha asociado con tuberculosis (Floros et al., 2000).

Al contrario de lo que cabría esperar por el efecto pro-inflamatorio de las colectinas tras el reconocimiento de microorganismos, los ratones deficientes en SP-A o SP-D presentan respuestas inflamatorias muy elevadas y, los ratones deficientes en SP-D, enfisema pulmonar (Botas et al., 1998, Borron et al., 2000, Hawgood et al., 2002). Ya se ha detallado en la introducción de esta Tesis Doctoral que SP-A y SP-D juegan un papel dual en la respuesta inflamatoria. Ambas colectinas interactúan con los patógenos a través de su CRD, y se unen al receptor celular calreticulina/CD91 a través de su región colágeno N-terminal, promoviendo la fagocitosis y la respuesta inflamatoria (Vandivier et al., 2002, Bustamante et al., 2008). Sin embargo, la unión del CRD de SP-A o SP-D a SIRP α de los macrófagos alveolares suprime la activación de NF- κ B y la inflamación, lo que permite al pulmón permanecer en estado quiescente en ausencia de infección (Gardai et al., 2003, Fine et al., 1997). Un efecto similar de SP-A y SP-D se ha observado en la promoción o la inhibición de la apoptosis (Janssen *et al.*, 2008) y, tanto SP-A como SP-D pueden también inhibir la inflamación mediante la unión del dominio CRD a TLR2 y TLR4 (Guillot et al., 2002, Murakami et al., 2002).

Son poco conocidas las implicaciones funcionales de las variantes genéticas de SP-A1 y SP-A2 (Wang et al., 2000, Wang et al., 2004, Mikerov et al., 2007). Las variantes en los residuos *aa50* (*rs1136550*, *Val⁵⁰Leu*), *aa91* (*rs17886395*, *Ala⁹¹Pro*) y *aa160* (*rs2243639*, *Thr¹⁶⁰Ala*) se localizan en la región de tripletes Gly-X-Y que conforman el dominio colágeno y, por consiguiente, pueden afectar a la oligomerización y a la unión a receptores como calreticulina/CD91, o la actividad de la proteína. Las variantes *aa219* (*rs4253527*, *Arg²¹⁹Trp*), *aa223* (*rs1965708*, *Gln²²³Lys*) y *aa270* (*rs3088308*, *Thr²⁷⁰Ser*) se localizan en la región del CRD, y podrían afectar directamente a la capacidad de unión de estas proteínas a los microorganismos o a los receptores de superficie como SIRP α o TLR4. De hecho, se ha sugerido que el cambio en el *aa219* produce modificaciones específicas en la capacidad de agregación de la proteína (Wang et al., 2004, Wang et al., 2007). Por otro lado, tras la escisión del péptido señal, se pierde el residuo *aa9*, y debido a la variabilidad en el punto de escisión, sólo unas pocas moléculas de SP-A contienen el residuo *aa19*. La variación en el residuo *aa11* (*aa31* si abarcamos

el péptido señal de *SFTPD*) situado en la región N-terminal de la proteína puede implicar también un cambio en la multimerización de la misma (Leth-Larsen *et al.*, 2005).

Además, es importante señalar que no se puede descartar que las variantes analizadas se encuentren en LD con otras variantes en regiones reguladoras que afecten a la traslocación y/o la estabilidad del RNA (Wang *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2005).

Se sospecha que la SP-A consiste en hetero-oligómeros de SP-A1 y SP-A2, y de hecho las propiedades de las moléculas SP-A1/SP-A2 se sitúan entre las de SP-A1 y SP-A2 (Sanchez-Barbero *et al.*, 2007). Sin embargo, el grado de oligomerización de la SP-A, así como la relación SP-A1/SP-A2, pueden verse alteradas en varias enfermedades y pueden diferir en distintas enfermedades pulmonares (Hickling *et al.*, 1998, Tagaram *et al.*, 2007). La co-expresión de SP-A1 y SP-A2 tiene una mayor estabilidad térmica que la SP-A1 y la SP-A2, lo que indica que la combinación de las dos proteínas es importante para alcanzar una conformación nativa estable. De hecho, se ha visto recientemente en un modelo murino humanizado, que tanto la SP-A1 como la SP-A2 son necesarias para la formación de un entramado natural del surfactante denominado mielina tubular (Wang *et al.*, 2010). Por tanto, el efecto de un determinado haplotipo en uno de los genes puede verse influenciado por el haplotipo en el otro gen. De hecho, nuestros resultados sugieren que el haplotipo $1A^06A^2$ ($P=0,00001$) tiene un efecto protector frente a la NAC mayor que el de $6A^2$ y $1A^0$ por separado ($P=0,00019$).

A pesar de disponer de antimicrobianos potentes, la NAC es todavía una causa frecuente de mortalidad. La búsqueda de nuevos tratamientos se está redirigiendo hacia las terapias no antibióticas (Rodriguez *et al.*, 2009). Se ha observado que los niveles de SP-A se encuentran reducidos en el lavado broncoalveolar de pacientes con SDRA, sepsis, fibrosis quística o neumonía (Pison *et al.*, 1990, Noah *et al.*, 2003), y que la SP-D también podría encontrarse en niveles inferiores a los normales en pacientes con SDRA (Greene *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha demostrado en ratones *Sftpa*^{-/-} que la administración intratraqueal de SP-A o SP-D induce la eliminación de

microorganismos y corrige la inflamación (LeVine *et al.*, 2001). La administración intratraqueal de SP-A y SP-D también ha sido efectiva en varios modelos murinos de sensibilización alérgica por vía respiratoria (Madan *et al.*, 2001) y, hoy en día, los preparados de proteínas surfactantes que contienen SP-B y SP-C son ampliamente utilizados como terapia sustitutiva en el pRDS. También se ha observado que la instilación intratraqueal de SP-C recombinante reduce la mortalidad de pacientes con SDRA grave secundario a neumonía por aspiración (Taut *et al.*, 2008, LeVine *et al.*, 2001).

Algunas de las variantes genéticas analizadas en nuestro estudio, como $1A^{10}$, aunque raras, pueden tener un impacto importante en la susceptibilidad, en la gravedad y en la mortalidad de la NAC.

Por tanto, sería deseable la validación de nuestros resultados en otras poblaciones, además de profundizar en el conocimiento de las implicaciones clínicas de la variabilidad genética en *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD*. Esta información podría ser relevante para futuras investigaciones acerca del uso de estas colectinas en el tratamiento de la NAC.

2.5.6 Conclusiones

En coherencia con los resultados obtenidos y discutidos en el estudio que hemos desarrollado, se han extraído las siguientes **conclusiones**:

Los cromosomas que contienen el haplotipo $1A^06A^2$ de los genes *SFTPA2-SFTPA1*, o el haplotipo D^6 -CGCACA del gen *SFTPD* se asocian a un efecto protector frente al desarrollo de NAC.

Los cromosomas que contienen el haplotipo $1A^76A^2$ de los genes *SFTPA2-SFTPA1* y el haplotipo D^4 -TGCATG del gen *SFTPD* se asocian a una mayor susceptibilidad a la NAC y, marginalmente, a una mayor tasa de ingreso en la UCI, a una mayor predisposición al SDRA y a una mayor predisposición al FMO.

Los cromosomas que contienen el haplotipo $1A^{10}6A^2$ de los genes *SFTPA2-SFTPA1* y, los haplotipos D^1 -TGTACA y D^1 -TCCACG del gen *SFTPD*, así como el $1A^06A^2D^1$ -TCCACG se asocian a una mayor predisposición a shock. Los haplotipos $1A^06A^2D^2$ -CCTATG y $1A6AD^4$ -TGCATG se asocian a una mayor predisposición al FMO.

Los cromosomas que contienen el haplotipo $1A^{10}6A^2$ y $1A^26A^4$ de los genes *SFTPA2-SFTPA1* se han identificado como de riesgo de mortalidad, así como los haplotipos combinados $1A^16A^2D^3$ -TCCACA y $1A^26A^4D^2$ -TCCACA de los genes *SFTPA2-SFTPA1-SFTPD*.

En resumen, nuestros resultados indican que la variabilidad en los genes de la SP-A y SP-D influye en la susceptibilidad, en la gravedad y en la mortalidad de la NAC.

Estudio II

2.6 *Gripe pandémica por A (H1N1) 2009*

Este segundo trabajo propone el análisis de 15 SNPs de las SPs y su posible asociación con la gripe pandémica (H1N1) 2009.

La enfermedad conocida como gripe es producida por el virus influenza A, cuyo reservorio es múltiple. Puede afectar a animales, tanto domésticos como salvajes, entre ellos a 16 tipos de mamíferos (Neumann et al., 2009, Gatherer, 2009). El material genético de dichos virus está compuesto por 8 segmentos de ARN monocatenario envueltos con cinco proteínas internas no glicosiladas y tres proteínas integrales de membrana, conocidas como hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y proteínas de la matriz.

El AIV posee tres subtipos de HA (H1, H2, H3) que han circulado, o circulan habitualmente en humanos, y dos subtipos de NA (N1 y N2) aunque algunos de los otros subtipos también se pueden encontrar de forma poco frecuente (H5, H6, H7, H9, H10, N6, N7, N8 y N9). La existencia de diferencias antigénicas en el subtipo de HA o de NA ocasionan variantes para las que la población general no tiene ningún tipo de inmunidad previa, lo que permite al virus evadir la respuesta inmune preexistente. A lo largo de la historia se han registrado periodos de epidemia, siendo especialmente grave la pandemia de 1918-1919, conocida como gripe española, responsable de alrededor de 50-100 millones de muertes en todo el mundo (Sullivan et al., 2010). Además de la aparición del virus H1N1 en 1918, se registraron también cambios de este tipo en el virus H2N2 en 1957 o el H3N2 en 1968 (Boni, 2008).

El virus se encuentra en las secreciones respiratorias desde el periodo de incubación (uno o dos días), siendo la fase de máximo contagio los tres primeros días del cuadro clínico. La vía de transmisión se produce directamente por las microgotas emitidas por las vías aéreas del sujeto infectado. El elevado contagio de esta enfermedad, probablemente, se debe a que el virus es infectivo a baja dosis, se presenta a una alta concentración en las secreciones y se propaga eficazmente por la tos.

En el mes de Abril del año 2009, la OMS informó de la existencia de un brote epidémico por un nuevo virus de la gripe, el A (subtipo H1N1) de origen animal, concretamente de origen porcino, y declaró una urgencia de salud pública de importancia internacional, días después subiría el nivel de alerta pandémica a Fase 4 y posteriormente a Fase 5. En Junio de 2009 se estableció la fase 6 de alerta pandémica con cerca de 30.000 casos confirmados en 74 países y, tras comprobar la existencia de transmisión elevada y sostenida del virus en todo el mundo, no alcanzó, sin embargo, los niveles epidemiológicos esperables. http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/

Probablemente esto se pueda explicar porque desde 1917 los subtipos H1N1 han permanecido en constante circulación y, la mayoría de las personas nacidas antes del año 1956 han tenido contacto previo con cepas H1N1 en la era anterior al predominio de cepas H2N2 y, por tanto, tienen cierta inmunidad frente a esta nueva variante.

El AIV pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y posee una especial afinidad por los mucopolisacáridos y las glucoproteínas, en particular por los receptores celulares que contienen ácido siálico. Los individuos infectados por el AIV producen anticuerpos para neutralizar al virus. Estos anticuerpos están dirigidos frente a HA, por lo que estas proteínas tiene un papel crucial en la inmunidad frente a la infección. De hecho, una variación en esta molécula permite al virus evadir la respuesta inmune del huésped adquirida con anterioridad (debida a una infección o vacunación previa). Por su lado, la NA actúa eliminando el ácido siálico del virus y de las células infectadas, evitando la autoagregación y permitiendo la liberación de los viriones. Los anticuerpos producidos contra la NA restringen el nivel de replicación viral pero sólo a altas concentraciones logran neutralizar la infectividad del virus.

La infección por el AIV normalmente cursa de forma leve y autolimitada por las condiciones de cada individuo. También lo hace así la gripe pandémica por AIV (H1N1) 2009 que, frecuentemente, cursa como una gripe sin complicaciones. Sin embargo, algunos individuos, incluso adultos y jóvenes sin factores de riesgo conocidos, llegan a desarrollar formas graves de la infección como la neumonía viral primaria (PVP), IRA y SDRA (Bautista et al., 2010).

Parece que la variabilidad genética interindividual es responsable, al menos en parte, de las diferencias encontradas en la gravedad que presentan los pacientes. Hasta ahora, los factores que pueden estar influyendo son desconocidos (Albright et al., 2008, Horby et al., 2012, Keynan et al., 2013). Un estudio importante publicado en 2008 (Albright et al., 2008) demostró que la susceptibilidad a morir por infección respiratoria por el virus influenza es heredada.

Antes del desarrollo de la inmunidad adquirida, en los primeros días de vida, la inmunidad innata juega un papel esencial en la neutralización y control del virus por lo que respuestas con menor inflamación pueden ser cruciales en la defensa inmune contra el virus. Las SP-A y SP-D son esenciales en la regulación de la inflamación pulmonar y en la neutralización de agentes extraños. Concretamente, numerosos experimentos realizados en el laboratorio han mostrado que son capaces de unir y aglutinar partículas virales. Normalmente lo hacen reconociendo ciertos motivos glicosilados del virus a través de sus CRDs. La alteración de estas proteínas a nivel funcional o estructural por la presencia de ciertos polimorfismos puede influir en el reconocimiento y procesamiento posterior del material viral. Por tanto, la variabilidad en los genes que codifican estas proteínas puede estar influyendo en la respuesta a la infección.

2.6.1 Pacientes

En este estudio se incluyeron pacientes adultos que ingresaron con el diagnóstico de gripe pandémica por AIV H1N1 (2009) en cualquiera de los cuatro hospitales españoles colaboradores: HUGCDN y Complejo Hospitalario Insular-Materno Infantil, (Las Palmas de Gran Canaria); Hospital del Mar, (Barcelona); Hospital San Jorge, (Huesca); y Hospital Clinic Universitari de Valencia, (Valencia).

Para la detección del virus se utilizaron las muestras de los pacientes recogidas en hisopos nasofaríngeos. El procesamiento de la muestra, mediante

kits de detección del AIV (H1N1) 2009, tras la amplificación del material genético del virus por PCR a tiempo real (*Real-Time ready Influenza A (H1N1) Detection Set*, Roche Diagnostics, Alemania) se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y permitió confirmar la infección por el virus.

Los pacientes incluidos padecían síntomas gripales compatibles y con diagnóstico de etiología confirmada para AIV (H1N1) 2009. Este diagnóstico se estableció por la presencia de síntomas de infección de vías aéreas inferiores, y sin diagnósticos alternativos durante el seguimiento de los pacientes no hospitalizados, al menos en los diez días previos al episodio actual. Un 70% de las muestras se obtuvieron de manera prospectiva, mientras que el 30% restante lo fueron de manera retrospectiva. Finalmente, tras excluir a aquellos enfermos de origen no español (ver **ilustración 24**), en los análisis realizados en este estudio la muestra final se compuso de 70 pacientes hospitalizados:

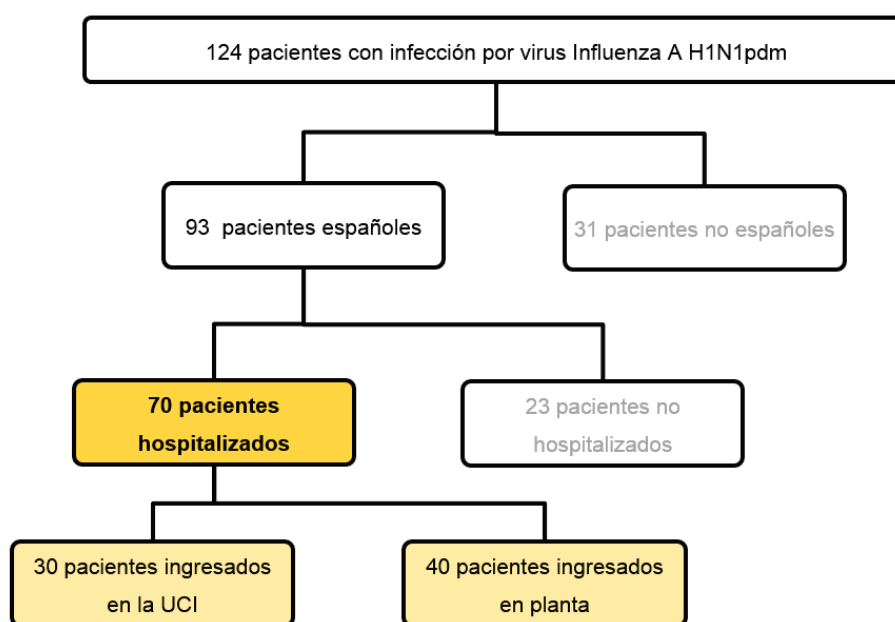


Ilustración 24. Diagrama de selección de pacientes (II).

Se consideraron como factores de riesgo: padecer diabetes, enfermedades pulmonares previas, trasplantes de órgano sólido, inmunosupresión, índice de masa corporal mayor de 30 (IMC>30), infección por VIH y embarazo. Los criterios utilizados en los diagnósticos de sepsis, shock séptico y FMO fueron los definidos por la *American College of Chest*

Physicians/Society of Critical Care Medicine (Bone et al., 1992). La IRA y el SDRA se diagnosticaron según los criterios del *American European Consensus Conference Definition* (Bernard et al., 1994). En los pacientes admitidos en la UCI, la gravedad de la enfermedad fue evaluada a través de la puntuación en APACHE II, recogiendo la lectura de las primeras 24 horas de ingreso en la UCI.

El análisis genético del estudio de asociación de los genes *SFTPA2* y *SFTPA1* y *SFTPD* se realizó en los 70 pacientes hospitalizados con gripe A (H1N1) 2009. La procedencia de estos pacientes fue la siguiente: 41 (58,6%) de Gran Canaria, 14 (20,0%) de Barcelona, 9 (12,9) de Huesca y 6 (8,6%) de Valencia. La edad media de los pacientes fue de 46,81 ± 17,35, siendo hombres el 55,7%, y fumadores el 24,3% del total. En la siguiente tabla se resumen las características clínicas de los 70 pacientes con gripe pandémica (H1N1)2009 incluidos en este estudio:

Tabla 13. Características clínicas de los pacientes (II).

Pacientes hospitalizados por infección por AIV (H1N1) 2009 (N= 70)									
	SÍ		NO			SÍ		NO	
Diagnóstico	N	(%)	N	(%)	Factor de riesgo	N	%.	N	(%)
IRA	48	(68,6)	22	(22,9)					
SDRA	16	(22,9)	54	(77,1)	Broncopatías*	30	(57,1)	40	(42,9)
Shock	16	(22,9)	54	(77,1)	Diabetes mellitus	53	(75,7)	17	(24,3)
FMO	6	(8,6)	64	(91,4)	Trasplante	2	(7,1)	68	(92,7)
Bacteriemia	7	(10)	63	(90)	Inmunosupresión	2	(2,9)	68	(97,1)
Exitus	4	(5,71)	66	(94,3)	VIH	2	(2,9)	68	(97,1)
Neumonía secundaria	10	(14,3)	60	(85,7)	Embarazo	0	(0)	70	(100)
PVP	51	(72,9)	19	(27,1)	IMC ≥ 30	18	(25,7)	52	(74,3)
VM	24	(34,3)	46	(65,7)					

AIV: virus influenza A. N= número de individuos. (%): porcentaje de individuos para cada característica. IRA: insuficiencia respiratoria aguda, SDRA: síndrome distrés respiratorio agudo, FMO: fallo multiorgánico, PVP: neumonía viral primaria. VM: ventilación mecánica. VIH: virus inmunodeficiencia humana. IMC: índice de masa corporal. *Las broncopatías incluyen: EPOC, asma, bronquiectasias y otras broncopatías. Nota: diez pacientes tuvieron neumonía bacteriana secundaria y siete tuvieron bacteriemia (cuatro de los cuales padecieron neumonía bacteriana secundaria).

2.6.2 Hipótesis

Variantes genéticas de las SPs en *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* modulan la predisposición que presentan los individuos a sufrir la gripe pandémica (H1N1).

Variantes genéticas de las SPs en *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* influyen en la gravedad de la infección por el AIV (H1N1) en pacientes hospitalizados y/o en su evolución.

2.6.3 Objetivos

Comparar la distribución de las frecuencias, alélicas y genotípicas, de cada variante de los genes *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* entre la PGE y el grupo de pacientes hospitalizados con gripe pandémica AIV (H1N1) 2009.

Comparar la distribución de las frecuencias de alelos y genotipos de los genes *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* entre los pacientes, hospitalizados con infección por AIV (H1N1), según su gravedad.

Inferir los haplotipos y comparar las frecuencias de las distintas combinaciones con los 15 SNPs incluidos, de los genes *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* entre pacientes con gripe pandémica (H1N1) 2009 y la PGE y, en subgrupos de pacientes según su gravedad.

Pretendemos encontrar respuesta a las siguientes preguntas:

¿Existe una distribución de alelos y genotipos de los SNPs de *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* diferente entre la PGE y el grupo de pacientes con gripe pandémica (H1N1) 2009? ¿Existen SNPs de *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* significativamente asociados con la predisposición a una enfermedad más grave? ¿Existen combinaciones de dichos SNPs en haplotipos que se asocien?

2.6.4 Resultados

Para responder a estas preguntas hemos realizado el análisis de asociación genética y hemos obtenido los resultados que se detallan a continuación.

Las frecuencias genotípicas que presentaron cada uno de los SNPs en los pacientes hospitalizados por AIV (H1N1) y en los sujetos de la PGE se muestran en la siguiente **Ilustración**:

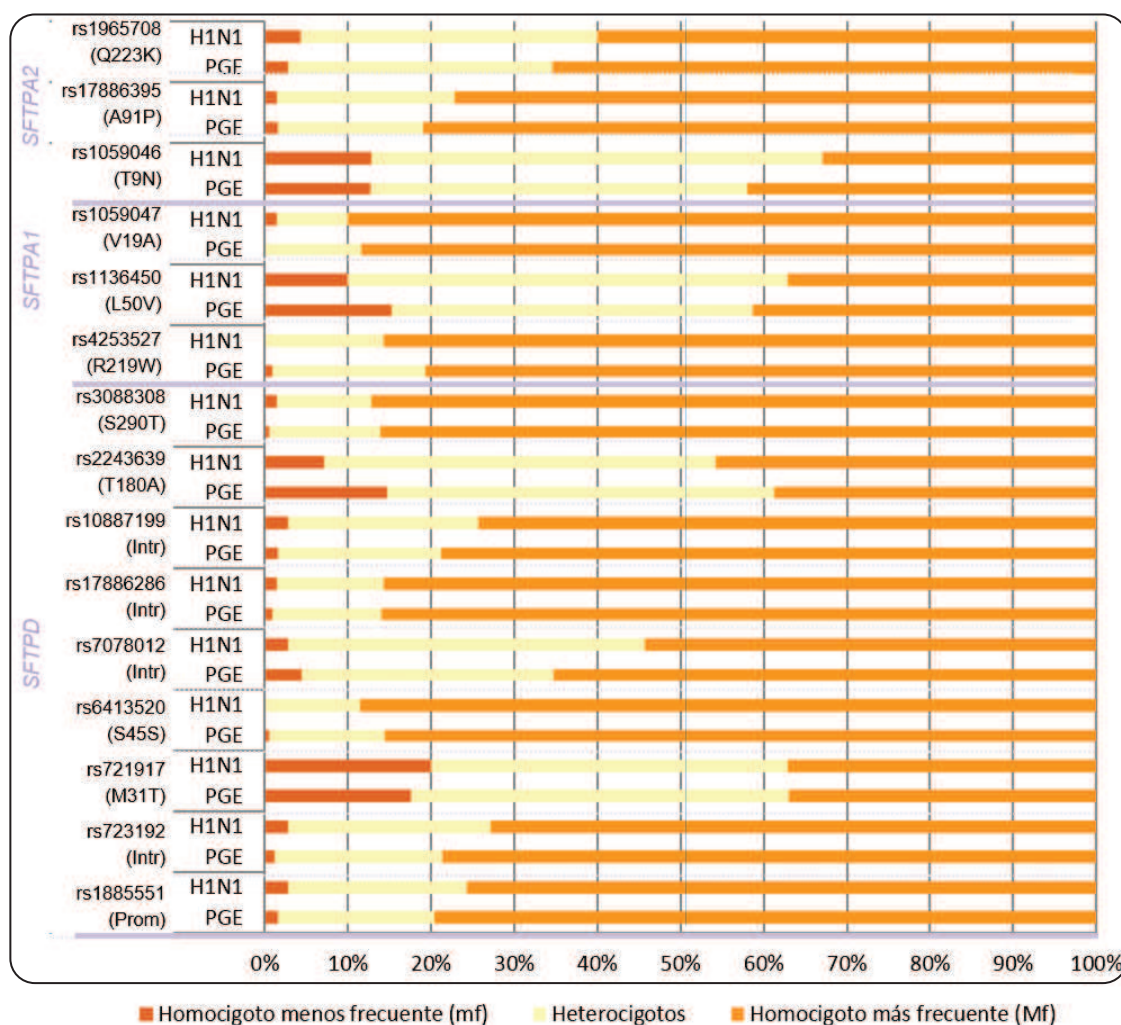


Ilustración 25. Frecuencias genotípicas en pacientes y en sujetos de la PGE (II).

H1N1: pacientes hospitalizados con infección por AIV (H1N1). PGE: población general española. Distribución de las frecuencias de cada uno de los 15 SNPs incluidos en el estudio.

Al analizar los alelos, no encontramos ninguno de los SNPs de *SFTPA2* o de *SFTPA1* asociados a diferencias significativas entre los 769 sujetos de la PGE y los 70 pacientes con infección por AIV (H1N1). Al analizar las frecuencias genotípicas, testando los diferentes modelos de herencia, ninguno de los SNPs se asoció, tampoco, en esta comparación. Por otro lado, el estudio

alélico de los nueve SNPs seleccionados para el estudio del *SFTPD* se realizó en esos mismos 70 pacientes y en 963 sujetos de la PGE, sin encontrarse ninguna asociación significativa ni en dicho análisis alélico ni en el genotípico.

Los pacientes con infección por AIV (H1N1) incluidos en el estudio, se compararon entre ellos de acuerdo a su gravedad de la siguiente forma: se agruparon según tuvieran o no diagnóstico de IRA, de SDRA, o de FMO; hubieran ingresado o no en la UCI; o si hubieran sobrevivido tras 90 días desde el ingreso hospitalario o no. La **ilustración 26** muestra los resultados de todas las comparaciones alélicas de los SNPs de *SFTPA2*, *SFTPA1* y *SFTPD* para los 70 pacientes.

De los SNPs analizados de los genes que codifican la SP-A, dos de *SFTPA2* y ninguno de *SFTPA1* presentaron una diferencia significativa cuando comparamos los diagnósticos clínicos relacionados con una mayor gravedad de la gripe, ajustando por co-variables como género, edad y hábito tabáquico. El alelo *rs1965708-A* se asoció con una menor gravedad, en concreto con un menor riesgo en las comparaciones de pacientes con y sin IRA ($P=0,0061$, OR 0,32, CI 95% 0,14-0,73), con y sin SDRA ($P=0,0137$, OR 0,18 CI 95%, 0,04-0,81) y con o sin shock ($P=0,0137$, OR 0,18 CI 95%, 0,04-0,81). Este alelo también se asoció con una menor tasa de ingreso en la UCI ($P=0,0097$, OR 0,31 CI 95% 0,12-0,78). El modelo de herencia bajo el que influye este polimorfismo es recesivo ya que de los 48 pacientes que sufrieron IRA ninguno era homocigoto para este alelo, mientras que el 14% de los pacientes que no lo padecieron ($N=22$) sí portaba el genotipo *rs1965708-AA*. Ninguno de los pacientes con dicho genotipo ingresaron en la UCI y/o desarrollaron SDRA y/o shock, ni requirieron ventilación mecánica. El modelo de herencia asociado con un mayor riesgo es el recesivo para la variante más frecuente (*Gln²²³*) ($P=0,027$, OR 3,18 CI 95% 1,12-9,01). Encontramos también una asociación marginal del alelo *rs1059046-C* (*Thr⁹*) con protección frente al desarrollo de IRA ($P=0,01739$, OR 0,417 CI 95%, 0,201-0,864). De las variantes incluidas en el estudio de los SNPs de *SFTPD*, el alelo *rs2243639-C* se asoció con el riesgo de IRA. No obstante, hay que destacar que las significaciones halladas no soportan la corrección para múltiples comparaciones ni por alelos, ni por los modelos de herencia.

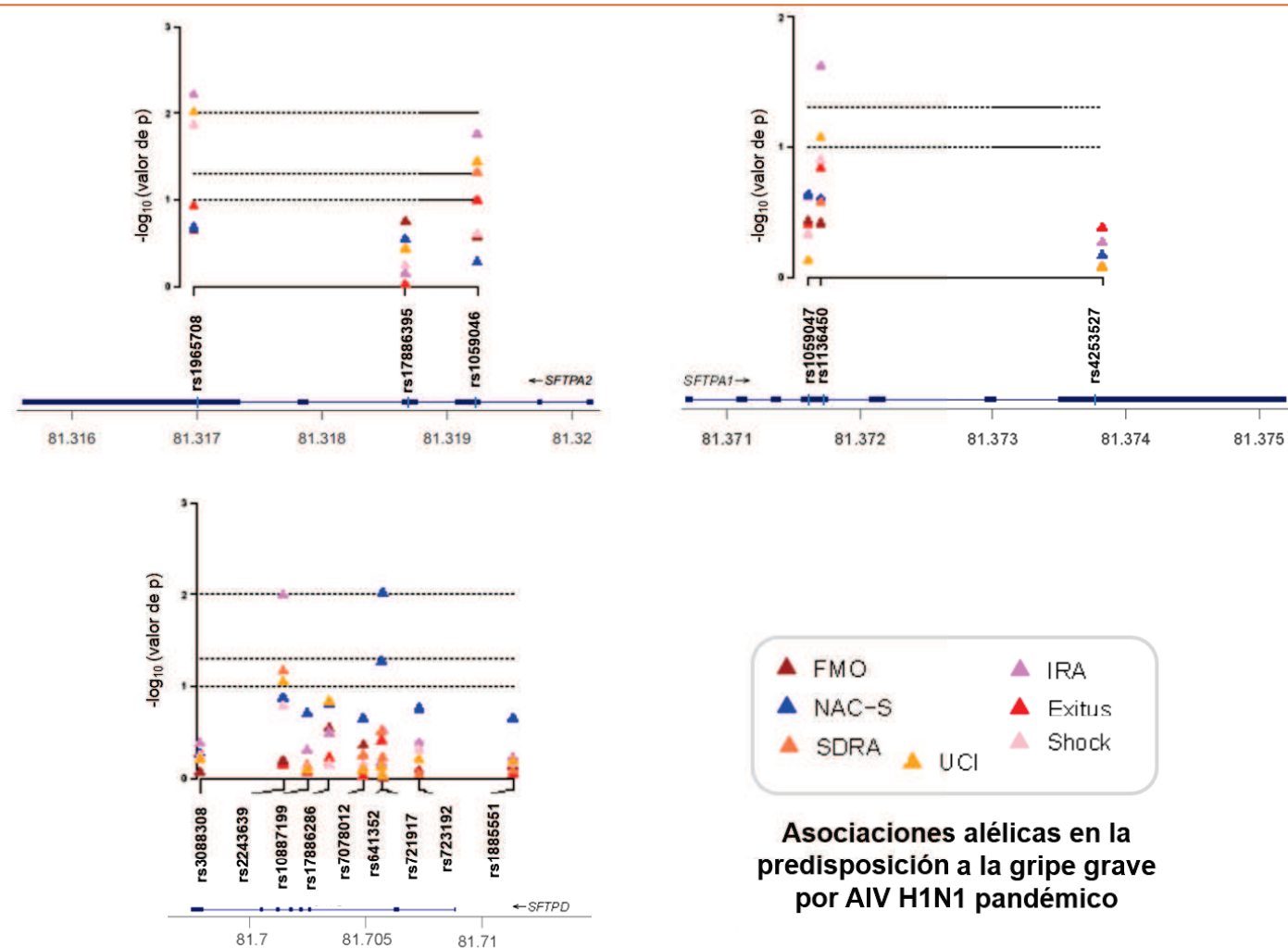


Ilustración 26. Significación estadística de las comparaciones alélicas (II).

FMO: Fallo multiorgánico. NAC-S: Neumonía bacteriana secundaria. SDRA: Síndrome de distrés respiratorio agudo. IRA: insuficiencia respiratoria aguda. UCI: Unidad de Cuidados intensivos. Se ilustran las significaciones estadísticas (representadas como el $-\log_{10}$) de las diferencias de las frecuencias alélicas de los SNPs entre grupos de pacientes con gripe por A (H1N1) 2009 según presentaran o no los diagnósticos detallados en la leyenda. En la parte superior, seis SNPs de los genes que codifican la SP-A y, en la parte inferior los nueve seleccionados del gen que codifica la SP-D.

Las combinaciones de los seis SNPs no sinónimos de *SFTPA2* y de *SFTPA1* se estudiaron según la nomenclatura ya descrita ($1A^n6A^n$) y el análisis del total de los SNPs seleccionados para *SFTPD* se denominó según la nomenclatura propuesta para los tres SNPs sinónimos (D^n), seguido de los otros seis SNPs incluidos en el estudio según su orden en el cromosoma.

En el análisis de las frecuencias haplotípicas para *SFTPA2-SFTPA1* (ver **tabla 14**), se detectó que el haplotipo $1A6A^3$, un haplotipo no muy común en todas las poblaciones mundiales, era significativamente más frecuente en el grupo de pacientes con gripe que en los sujetos de la PGE (entre corchetes se presentan las frecuencias de los sujetos caso/control y entre paréntesis el valor de p para cada comparación): $1A6A^3$ [0,0269 / 0,00537] ($P=0,003868$). Aunque ésta fue la única asociación encontrada marginalmente significativa tras aplicar la corrección de Bonferroni, se hallaron también otras dos asociaciones leves, mostradas en la tabla.

En nuestro estudio evaluamos el papel de las variantes genéticas en la gravedad de los 70 pacientes con infección por AIV (H1N1) y no encontramos ningún haplotipo que estuviera significativamente asociado tras las correcciones. No obstante, en la parte inferior de la **tabla 14**, donde se muestran estos resultados, el haplotipo $1A^1$ de *SFTPA2* se relaciona con una menor gravedad en los siguientes diagnósticos clínicos.

Tabla 14. Asociaciones haplotípicas de *SFTPA2-SFTPA1* (II).

Comparación	Haplotipo	Valor de p	Factor
H1N1 / PGE	$1A6A^3$ [0,02692 / 0,005365]	($P=0,00387$)	RIESGO
H1N1 / PGE	$1A6A^5$ [0,01217 / 0,002256]	($P=0,04328$)	RIESGO
H1N1 / PGE	$1A^26A^4$ [0,00518 / 0,04292]	($P=0,02914$)	PROTECTOR
UCI / No	$1A^16A^3$ [0,04886 / 0,202]	($P=0,00898$)	PROTECTOR
VM / No	$1A^16A^3$ [0,04024 / 0,1865]	($P=0,01667$)	PROTECTOR
SDRA / No	$1A^06A^3$ [0,09578 / 0,01296]	($P=0,01918$)	RIESGO
IRA / No	$1A^16A^3$ [0,09069 / 0,236]	($P=0,02002$)	PROTECTOR
NB-S / No	$1A^{10}6A^3$ [0,05 / 0,0009443]	($P=0,02221$)	RIESGO
VM / No	$1A6A^3$ [0,08088 / 0,01087]	($P=0,03209$)	RIESGO
IRA / No	$1A^06A^2$ [0,5872 / 0,4033]	($P=0,04307$)	RIESGO
Muerte / No	$1A^06A^2$ [0,875 / 0,5084]	($P=0,04370$)	RIESGO
SDRA / No	$1A^16A^3$ [0,03018 / 0,1678]	($P=0,04629$)	PROTECTOR
shock / No	$1A^16A^3$ [0,03018 / 0,1678]	($P=0,04629$)	PROTECTOR

H1N1: pacientes hospitalizados con infección por AIV (H1N1). PGE: población general española. UCI: Unidad de Cuidados intensivos. VM: ventilación mecánica. SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo. IRA: insuficiencia respiratoria aguda. NB-S: Neumonía bacteriana secundaria

Dado el bajo tamaño muestral de los subgrupos que se han comparado por la estratificación de los pacientes, hemos realizado, además, la comprobación de la asociación de los haplotipos de *SFTPA2* separado de los de *SFTPA1* (analizando mayor tamaño muestral en los subgrupos) y comprobamos de este modo que el haplotipo $1A^1$ se asociaba con menor gravedad, en concreto, con respecto a la IRA [0,1211 / 0,312] ($P=0,00645$) y a la tasa de ingreso en UCI [0,0803 / 0,2567] ($P=0,00732$).

El haplotipo $1A^0$ tiende a relacionarse con más gravedad en esta gripe pandémica. Aunque no supera las correcciones estadísticas, aparece más frecuentemente en los individuos con SDRA y/o IRA, en los que precisaron ventilación mecánica o en los que fallecieron.

Además, encontramos que el haplotipo D^2 -CGCATG estaba presente 10 veces más en los pacientes que en la PGE [0,02111 / 0,002045] ($P=0,00019$).

Tabla 15. Asociaciones haplotípicas de *SFTPD* (II).

Comparación	Haplotipo	Valor de p	Factor
H1N1 / PGE	D^2 -CGCATG [0,02111 / 0,002045]	($P=0,00019$)*	RIESGO
IRA /No	D^2 -TCCACA [0,2073 / 0,38]	($P=0,03335$)	PROTECTOR
NB-S /No	D^1 -TCCGCA [0,15 / 0,0339]	($P=0,02867$)	RIESGO
SDRA /No	D^5 -TCCACA [0,09419 / 0,00118]	($P=0,00199$)*	RIESGO
UCI /No	D^5 -TCCACA [0,05139 / 0,00071]	($P=0,04777$)	RIESGO
VM /No	D^5 -TCCACA [0,06337 / 0,00108]	($P=0,01942$)	RIESGO

H1N1: pacientes hospitalizados con infección por AIV (H1N1). PGE: población general española. IRA: insuficiencia respiratoria aguda. NB-S: Neumonía bacteriana secundaria. UCI: Unidad de Cuidados intensivos. VM: ventilación mecánica. SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo. El asterisco representa el valor de p que supera las correcciones realizadas para múltiples comparaciones.

En el análisis de las frecuencias haplotípicas de los nueve SNPs de *SFTPD* (**tabla 15**), hallamos un haplotipo asociado significativamente a la gravedad en los subgrupos formados a partir de los 70 pacientes con infección por AIV (H1N1). Es el haplotipo D^5 -TCCACA, que se encuentra asociado al SDRA [0,09419 / 0,00118] ($P=0,00199$) y, con menos intensidad a la necesidad de ingresar en la UCI y/o de ventilación mecánica. Este haplotipo, en combinación con el $1A^06A^3$, de los genes que codifican para la SP-A, fue el que más se asoció con el riesgo de SDRA, ya que se encontraba en el 6,7% del grupo de pacientes que lo padecieron, pero no en el grupo que no tuvo este diagnóstico ($P=0,0068$, que es mayor que 0,00333, por lo que esa comparación no supera las correcciones estadísticas realizadas).

Al realizar la comparación para haplotipos combinados *SFTPA2-SFTPA1-SFTPD* encontramos que el haplotipo *1A6A³D²-CGCATG* no está presente en ninguno de los 769 sujetos de la PGE, y si lo está en el 2,4% de los pacientes hospitalizados por la AIV (H1N1) 2009 ($P=0,0000278$). Además de este haplotipo, otro que también se asoció fue el *1A⁰6A²D³-TCTACA* ($P=0,00039$), haplotipo que está presente en el 6,9% de la PGE y hasta en el 15,7% de los 70 pacientes estudiados.

Tabla 16. Asociaciones haplotípicas de *SFTPA2-SFTPA1-SFTPD* (II).

Comparación	Haplotipo		Valor de p	Factor
H1N1 / PGE	<i>1A6A³D²-CGCATG</i>	[0,02356 / 0]	($P=0,0000278$)*	RIESGO
H1N1 / PGE	<i>1A⁰6A²D³-TCTACA</i>	[0,1564 / 0,06885]	($P=0,0003899$)*	RIESGO
FMO /No	<i>1A⁰6A³D²-CCCATG</i>	[0,09238 / 0]	($P=0,000560$)	RIESGO
FMO /No	<i>1A²6A³D⁶-TCTACA</i>	[0,10 / 0,001176]	($P=0,000933$)	RIESGO
NB-S /No	<i>1A¹⁰6A³D¹-TCCACA</i>	[0,05556 / 0]	($P=0,010170$)	RIESGO
SDRA /No	<i>1A⁰6A³D⁵-TCCACA</i>	[0,06667 / 0]	($P=0,006873$)	RIESGO

H1N1: pacientes hospitalizados con infección por AIV (H1N1). PGE: población general española. NB-S: Neumonía bacteriana secundaria. SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo. El asterisco representa el valor de p que supera las correcciones realizadas para múltiples comparaciones ($p<0,0033$).

El análisis efectuado reveló también la asociación entre el haplotipo *1A²6A³D⁶-TCTACA* ($P=0,0009$) y el FMO, que comparte el haplotipo de los seis SNPs de *SFTPD* (*TCTACA*) con el segundo haplotipo significativamente más frecuente en los pacientes que en la PGE. El haplotipo *1A⁰6A³D²-CCCATG* se encontraba en el 9,2% de los pacientes con FMO y en ningún sujeto sin este diagnóstico ($P=0,0006$). Cabe mencionar que *1A⁰6A³* se asoció con SDRA pero ninguna de estas últimas comparaciones superaron las correcciones realizadas.

La neumonía bacteriana secundaria fue una de las complicaciones registradas y comparadas entre subgrupos de pacientes. Aunque ninguna de las asociaciones fue significativa, se encontró el alelo *rs721917-C* [0,15 / 0,4583] ($P=0,0096$) más frecuentemente en los pacientes sin esta complicación. En cuanto a los haplotipos, encontramos que el *1A¹⁰6A³D¹-TCCACA* está presente en más del 5% de los pacientes que la padecieron ($P=0,01017$) y en ninguno de los que no la desarrollaron.

Para profundizar en la asociación de las variantes genéticas incluidas en este trabajo, hemos planteado el análisis de un parámetro cuantitativo

relacionado con el estado pulmonar. Se trata del cociente entre la presión parcial de O₂ en sangre arterial y la fracción inspiratoria de O₂ (Pa₂FIO₂). Es un parámetro determinante para el diagnóstico del daño pulmonar agudo. Los pacientes con SDRA se caracterizan por un Pa₂FIO₂ menor de 200 mm Hg. En este estudio, evaluamos el impacto que ejercen los polimorfismos estudiados y sus haplotipos sobre este parámetro mediante el análisis de regresión lineal.

En el análisis alélico, dos de los polimorfismos estudiados mostraron asociación con el cociente Pa₂FIO₂, teniendo en cuenta la edad y el sexo. En los pacientes que tenían el dato disponible (N=52) se detectó que los siguientes alelos: *rs1965708-A* (Beta=53,05, P=0,00720) y *rs1059046-C* (Beta=58,12, P=0,000764) se asociaron con mayor Pa₂FIO₂. Vale la pena mencionar que estas variantes en homocigosis son las que se presentan normalmente de manera menos frecuente en las poblaciones europeas en que se ha estudiado. Los alelos más frecuentes se relacionan con menores niveles en los pacientes con gripe pandémica por A (H1N1).

En el análisis haplotípico, los haplotipos que combinan esos dos alelos (1A¹) se asociaron positivamente con el Pa₂FIO₂, mientras los que contienen los alelos complementarios (alelos *rs1965708-C* y *rs1059046-A*) se asociaron negativamente (1A⁰). Un valor del coeficiente de regresión lineal (Beta) de 61,94 implica un aumento de la variable dependiente en casi 62 unidades del valor de Pa₂FIO₂, con una significación de 0,0055. El grado en el que cada variante ejerce su influencia sobre la variable dependiente (Pa₂FIO₂) se puede observar detalladamente en la columna de valores de Beta de la **tabla 17**.

Tabla 17. Análisis haplotípico con el parámetro funcional Pa₂/FIO₂.

Haplotipo	Valor de Beta	Valor de p	Relación con el Pa ₂ FIO ₂
1A ⁰	-57,81	0,00141	negativa
1A ¹	61,94	0,00546	positiva
6A ²	37,19	0,04352	positiva
1A ¹ 6A ³	67,2	0,01016	positiva
1A ⁰ 6A ²	-47,11	0,01509	negativa
1A ⁰ 6A ³	-108,8	0,03200	negativa
1A ¹ 6A ⁴	177,8	0,03855	positiva
1A ¹ 6A ⁴ D ² CCCATG	177,8	0,03855	positiva

Influencia de las variantes haplotípicas sobre el cociente entre la presión parcial de O₂ en sangre arterial y la fracción inspiratoria de O₂ (Pa₂/FIO₂). Cálculo de la regresión lineal e interpretación mediante el valor de Beta.

2.6.5 Discusión

La infección por el virus influenza A (AIV) se inicia mediante la unión de la hemaglutinina viral a los motivos de ácido siálico de la superficie de las células del hospedador. La glicosilación de las hemaglutininas resulta un mecanismo mediante el cual el AIV puede evadir el ser reconocido por los anticuerpos. Sin embargo, estas glicosilaciones hacen que el virus resulte sensible al reconocimiento por parte de colectinas como las SPs por el CRD. De éstas, la SP-A además posee largas cadenas de ácido siálico, en ese dominio de reconocimiento, que se unen a la hemaglutinina viral y le permiten neutralizar la infectividad del virus influenza. *In vitro*, se observó que la unión del virus influenza A no estaba influenciada por la extensión de la glicosilación de la hemaglutinina, además la SP-A destacó por ser más efectiva en la neutralización de cepas no glicosiladas (Hartshorn et al., 1997). Entre las colectinas humanas, la SP-D parece tener la mayor capacidad de neutralizar la actividad del virus influenza A (Hartshorn et al., 1997, Job et al., 2013, Ng et al., 2012). La mayoría de las cepas de virus influenza A estacionales son neutralizadas rápidamente por la unión de la SP-D a los glicanos de las hemaglutininas y neuroaminidasas. Sin embargo, la hemaglutinina de los virus de cepas pandémicas cuenta significativamente con menos sitios glicosilados comparado con los virus de cepas estacionales. El virus influenza A H1N1pdm2009, y otros virus pandémicos, se muestran resistentes a las actividades antivirales de la SP-D *in vitro* (Job et al., 2013, Job et al., 2010, Ng et al., 2012) mientras que la SP-A es capaz de neutralizar cepas resistentes a la SP-D (Hartshorn et al., 1997).

La SP-A parece jugar un papel antiinflamatorio *in vivo*. Cuando se compara la respuesta inflamatoria en ratones sin SP-A con infección por el virus influenza y en ratones de tipo salvaje, los deficientes en la SP-A presentan menos eliminación del virus, más inflamación pulmonar y sufren enfermedad más grave (Li et al., 2002, LeVine et al., 2002).

Todos los estudios funcionales muestran que SP-A2 es más activa que SP-A1 (Silveyra y Floros, 2012, Wright, 2005) y por eso, no es extraño que

entre las variantes genéticas analizadas de los genes *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* en este estudio, sólo unos pocos alelos y haplotipos de *SFTPA2* se asociaron a mayor gravedad en pacientes hospitalizados por AIV (H1N1) 2009. En humanos, se han detectado cantidades muy bajas de SP-A en prematuros con pSDRA. El haplotipo $1A^0$ o los haplotipos combinados de *SFTPA1-SFTPA2* que lo contienen han sido repetidamente asociados con su desarrollo, mientras que haplotipos que contienen el haplotipo $1A^1$ lo han sido con la protección frente a esa afección (Silveyra y Floros, 2012, Wright, 2005). En contraste con los ratones, que sólo tienen un gen para codificar la SP-A, los humanos tienen dos genes funcionales. *In vitro*, los polipéptidos de SP-A2 y SP-A1 son capaces de inhibir la actividad de cepas del virus influenza A con HA poco glicosilados o sin glicosilar (Mikarov et al., 2008b). Además, en el análisis de Kaplan-Meier incluido en nuestra publicación relacionada con este trabajo (Herrera-Ramos et al., 2014), muestra que el efecto de las variantes de *SFTPA2* es detectado en los primeros días después de la hospitalización, como cabría esperar de componentes de la inmunidad innata involucrados en la inflamación y en la defensa frente a la infección por el AIV.

El significado funcional de las diferencias entre las variantes de los dos genes que codifican la SP-A no se conoce muy bien, pero se ha visto que aquéllas que se encuentran en regiones reguladoras, y que pueden afectar tanto a la estabilidad como a la traducción del ARN mensajero, están en LD con polimorfismos de los haplotipos $1A^0$ y $1A^1$ (Silveyra y Floros, 2012, Wright, 2005). Hay que destacar que, después de pasar por un estrés oxidativo, la variante $1A^1$ tiene menos actividad productora de TNF α que variantes como $1A^0$ y $1A$ en una línea celular humana derivada de macrófagos conocidas como TPH-1 (Wang et al., 2002). Estos datos sugieren el efecto protector, en la gravedad de la infección por AIV (H1N1) 2009, de los haplotipos que contienen la variante $1A^1$ puede ser consecuencia de su baja actividad proinflamatoria.

La variante (*rs1965708*) que produce el cambio de aminoácido en el residuo 223 (*Gln²²³Lys*), situado en el CRD de la SP-A2, podría directamente influir en la unión al AIV o al receptor antiinflamatorio SIRP α . El residuo 9 (*rs1059046*, *Asn⁹Thr*) se localiza en el péptido señal, y no se conoce si puede afectar a su función y/o expresión. Precisamente, los haplotipos $1A^0$ y $1A^1$

difieren en esos dos residuos, 223 y 9; el haplotipo $1A^0$ caracteriza individuos con *rs1059046-C* y *rs1965708-A* (*Thr*⁹ y *Lys*²²³), mientras que el $1A^1$ lo hace con *rs1059046-A* y *rs1965708-C* (*Asn*⁹ y *Gln*²²³).

Sea cual sea el polimorfismo causal, nuestros datos sugieren que el haplotipo $1A^0$ de *SFTPA2* se asocia a una mayor gravedad tras la infección por el virus pandémico, mientras que haplotipos como el $1A^1$ se asocia con un efecto protector dominante frente a las formas más graves de la infección. Pudimos comprobar esta relación cuando identificamos que estas variantes influyen en los valores del parámetro de función pulmonar Pa_2/FIO_2 .

Reconocemos varias limitaciones en este trabajo. La población de referencia con la que contamos (PGE), y que consideramos grupo control para el estudio de susceptibilidad, es considerada como una muestra representativa de la población española en lugar de una representación de individuos no afectados por la infección AIV (H1N1) 2009. Además, en todo caso habría una alta representación de pacientes hospitalizados que haría difícil valorar realmente la predisposición a la infección en ausencia de síntomas graves. Por ello, nos hemos centrado en el estudio de la gravedad de la infección en los pacientes que han sido ingresados en los hospitales españoles colaboradores. El bajo tamaño muestral inicial es ya un inconveniente del estudio, que se acentúa al estratificar agrupando los individuos según parámetros de gravedad. Por tanto, este trabajo no tiene un poder estadístico suficiente para detectar el papel que pueden estar desempeñando algunas de las variantes incluidas en la gravedad de la infección. Sin embargo, con 84,17% de poder estadístico ($\alpha=0,05$, $\beta=0,8$) las asociaciones de la variante *rs1965708-C* se confirman de riesgo para el desarrollo de SDRA y shock séptico.

2.6.6 Conclusiones

En coherencia con los resultados obtenidos y discutidos en este segundo estudio, se han alcanzado las siguientes **conclusiones**:

- Ninguno de los 15 SNPs estudiados de los genes *SFTPA2*, *SFTPA1* y *SFTPD* se asociaron a la necesidad de hospitalización por gripe pandémica (H1N1) 2009.
- Los cromosomas que contienen el haplotipo $1A^6A^3$ de los genes *SFTPA2*-*SFTPA1*, el D^2 -CGCATG del gen *SFTPD*, y el $1A^0A^2D^3$ -TCTACA, de los tres genes, se asociaron a la necesidad de hospitalización por gripe pandémica (H1N1) 2009.
- El alelo *rs1965708-A* del gen de *SFTPA2* se asoció con una menor gravedad, en concreto con un menor riesgo de IRA, SDRA y shock, así como con una menor tasa de ingreso en la UCI. El haplotipo $1A^1$, que porta dicho alelo, se asoció con gripe por AIV (H1N1) 2009 menos grave, en concreto, con menor predisposición al desarrollo de IRA y menor tasa de ingreso en UCI. El haplotipo $1A^0$, que porta la otra variante de ese SNP, tiende a asociarse con más gravedad, relacionándose con el desarrollo de IRA, SDRA, la necesidad de ventilación mecánica y un menor Pa_2/FIO_2 .
- Los cromosomas que contienen el haplotipo D^5 -TCCACA y, concretamente, el haplotipo combinado $1A^0A^3D^5$ -TCCACA se asocia al desarrollo de SDRA en pacientes hospitalizados con la gripe por AIV (H1N1) 2009. El haplotipo $1A^2A^3D^6$ -TCTACA se asocia a una mayor predisposición al FMO, junto con la combinación de $1A^0A^3$ con el haplotipo D^2 -CGCATG.

Nuestros resultados sugieren que la variabilidad en los genes de la SP-A y, en menor medida, de SP-D influye en la gravedad de la gripe pandémica por AIV (H1N1) 2009, aunque los resultados de las variantes haplotípicas poco frecuentes deben ser interpretados con cautela debido al bajo tamaño muestral de los subgrupos.

Estudio III

2.7 Asma y alergia a los ácaros

Este tercer trabajo propone el análisis de 15 SNPs de las SPs y su posible asociación con el asma y la alergia a los ácaros del polvo doméstico.

El asma es un problema de salud mundial que afecta a millones de personas de cualquier edad, sexo, grupo étnico y área geográfica. Esta afección se caracteriza por su marcada heterogeneidad, que viene determinada por una gran diversidad en interacciones genéticas y ambientales, mecanismos fisiopatológicos, exposiciones ambientales, comorbilidades, edad, gravedad y cronicidad de la enfermedad de base, accesibilidad a los servicios sanitarios y cuidados recibidos, factores psicológicos, respuesta al tratamiento y características generales de la enfermedad, incluidas las exacerbaciones y la tasa de mortalidad asociada (Bousquet et al., 2010). Se trata de una de las enfermedades respiratorias crónicas más frecuentes en la edad adulta y, sin ningún género de duda, la más prevalente en la infancia. De las 7.000 millones de personas que habitan en todo el mundo, se estima que padecen asma más de 300 millones. Es más frecuente en mujeres y en niños, y aunque su prevalencia varía según la región geográfica considerada, es claramente mayor en países industrializados.

Se considera que esta enfermedad es responsable de aproximadamente 250.000 muertes al año (Pawankar et al., 2012, Pawankar, 2014). En España, la prevalencia media de asma en población infantil, utilizando la metodología del *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC), es del 10%, una cifra similar a la de la Unión Europea, siendo más frecuente en zonas húmedas (Arnedo-Pena et al., 2009). En población adulta de nuestro país, el asma afecta al 5% de la población adulta, aunque su prevalencia ha aumentado en los últimos años, probablemente en relación con el desarrollo industrial (Urrutia et al., 2007). Entre un 5 y un 10% de los pacientes diagnosticados de asma padece asma grave, y son estos pacientes los que representan el mayor reto médico, ya que su control y estabilización es más difícil que en el 90% restante.

La Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA 2015, www.gemasma.com) ha definido el asma como un síndrome en el que se incluyen diversos fenotipos clínicos que, aunque comparten manifestaciones clínicas similares, son probablemente de etiologías diferentes. Esto condiciona la necesidad de una definición precisa, que de forma pragmática se podría concretar en la de una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, en cuya patogenia intervienen diversas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos y que cursa con una obstrucción variable al flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea por la acción de medicamentos o espontáneamente.

Esta enfermedad cursa en forma de trastorno respiratorio crónico y se caracteriza por ataques recurrentes de disnea y sibilancias. Aunque varía en gravedad y frecuencia de una persona a otra, los síntomas pueden aparecer varias veces al día o a la semana, y pueden ser más intensos durante la actividad física o por la noche. Según la OMS, algunas causas y desencadenantes son comunes a todas las personas que sufren la enfermedad, pero existen también diferencias individuales. La heredabilidad de las enfermedades alérgicas y del asma se ha estudiado a través de parejas de gemelos, y se ha estimado que supone entre el 35-95% (Ober y Yao, 2011). Un número cada vez mayor de trabajos sugieren que el asma muestra un patrón de herencia complejo, que implica la interacción de muchos *loci* (cada uno con un efecto pequeño) y de factores ambientales.

Aunque las causas últimas del asma no se conocen, entre los factores de riesgo más importantes para su desarrollo destacan la exposición a alérgenos en espacios cerrados (como los ácaros del polvo doméstico presentes, sobre todo, en alfombras y en ropa de cama, y los derivados dérmicos de los animales domésticos), la exposición a alérgenos en espacios exteriores (como pólenes y mohos), la inhalación de sustancias tóxicas (como el humo del tabaco o productos químicos irritantes) y algunas infecciones virales. Se habla de asma alérgica, atópica o extrínseca cuando la causa principal de la enfermedad es la exposición a uno o varios alérgenos, y de asma no alérgica, no atópica o intrínseca cuando no se demuestra relación alguna entre la exposición a alérgenos y la aparición de la enfermedad. Una

vez ha debutado, actúan como desencadenantes del asma, además de los ya citados con anterioridad, la exposición al aire frío, factores emocionales y el ejercicio físico. En algunos pacientes, el asma puede agravarse o incluso desencadenarse en respuesta a algunos medicamentos, como la aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos, o por betabloqueantes. Durante una exacerbación o crisis de asma, se produce una inflamación de la mucosa bronquial, lo que provoca una obstrucción bronquial y una disminución del flujo aéreo. Si los síntomas son recurrentes causan con frecuencia insomnio, fatiga diurna, disminución de la actividad y absentismo escolar y laboral, con las evidentes repercusiones individuales y sociales que esto supone.

Aunque una de las principales características del asma es la presencia de reversibilidad total o parcial, espontánea o tras tratamiento, algunos pacientes con asma desarrollan una obstrucción irreversible de las vías aéreas. Entre los factores que predisponen a esta evolución destacan: la exposición al humo del tabaco, las exacerbaciones frecuentes, la elevación de la IgE sérica, la atopia y la existencia de hiperreactividad bronquial que cursa con inflamación de las vías aéreas (Lange, 2013).

Se deduce de lo hasta ahora expuesto que el asma no es una enfermedad sencilla sino que se trata de un síndrome complejo en el que se incluyen diferentes formas clínicas de la enfermedad que pueden variar dependiendo de las interacciones con el ambiente (Wenzel, 2013). Se han descrito diferentes fenotipos de asma, según la gravedad, el grado de afectación de la función respiratoria, la edad de comienzo, la respuesta a los tratamientos convencionales y también por el contenido celular predominante en muestras esputo (Wenzel, 2006).

Parece probable que los alérgenos generen un patrón de respuesta inmunológica particular, especialmente al principio, provocando un asma de tipo alérgico o extrínseco. Aunque comparte mecanismos patogénicos con el asma intrínseco (no alérgico), la forma extrínseca es más prevalente y es en la que se centra el tercer estudio incluido en esta Tesis.

Se han identificado más de 40.000 especies de ácaros, pero sólo 25 de ellas están relacionadas con el desarrollo de enfermedades alérgicas. Los ácaros más relevantes desde el punto de vista alergológico son los que se encuentran en los domicilios, los llamados ácaros del polvo doméstico. Pertenecen a la familia *Pyroglyphidae* y los predominantes son el *D. pteronnyssinus* y el *D. farinae*. Los factores ambientales que influyen en la presencia y proliferación de estos ácaros en el interior de las viviendas son que la temperatura oscile entre 25 y 35°C y que la humedad relativa esté entre un 50% y un 70%. En las Islas Canarias se dan estas dos condiciones casi de forma permanente y por ello es la región de España en la que se produce una mayor exposición a los ácaros del polvo doméstico (Iraola y Fernández-Caldas, 2009) y la que cuenta con un mayor número de pacientes sensibilizados a estos ácaros (Caballero-Martínez F., 2009). De hecho, se estima que el 80% de los pacientes atendidos en las consultas de Alergología de un hospital terciario como el HUGCDN están sensibilizados a los ácaros del polvo doméstico.

Se han descrito hasta 22 grupos de alérgenos en los ácaros del polvo doméstico. Los alérgenos más importantes pertenecen a los dos primeros grupos y son Der p 1, del grupo I (una glicoproteína de 25 kDa, contenida en las partículas fecales del ácaro) y Der p 2, del grupo II (una proteína de unión de lípidos de 15 Kda que se encuentra en el cuerpo del ácaro). Se sabe que Der p 1 es muy abundante en las viviendas de nuestra isla y que es capaz de aumentar la producción de mediadores proinflamatorios producidos por macrófagos alveolares, lo cual se relaciona, a su vez, con el desarrollo de la sensibilización alérgica y la inflamación de las vías aéreas. La exposición a estos alérgenos logra inducir la producción de IgE específica en pacientes sensibilizados. En concreto, en el caso de la sensibilización a los ácaros domésticos, los pacientes no parecen desarrollar tolerancia a altas dosis de exposición (Erwin et al., 2005). Se ha sugerido que existen diferencias en la progresión de la enfermedad en la alergia a los ácaros del polvo doméstico en comparación con otros alérgenos inhalados. Esto es debido, muy posiblemente, a que muchos de los alérgenos de los ácaros tienen actividad proteolítica, lo cual amplifica la respuesta inmunológica e inflamatoria.

Los alérgenos del grupo I (Der p 1) son cisteína-proteasas y su papel potenciador de la respuesta alérgica ha sido descrito ampliamente en la literatura. Pueden degradar CD23 y CD25, potenciando la síntesis de IgE (John et al., 2000), e inducir, en células del epitelio bronquial, una fuerte respuesta tipo Th2 mediada por la secreción de IL-6, IL-8, GM-CSF, RANTES, citocinas responsables del reclutamiento y de la activación de las células dendríticas, linfocitos Th2 y granulocitos (eosinófilos, neutrófilos y basófilos) (Lambrecht y Hammad, 2012). Estas proteasas también pueden degradar las estrechas uniones intercelulares en el epitelio bronquial y aumentar así la permeabilidad celular (Deb et al., 2007); además, en modelos animales pueden producir remodelado directo en la vía aérea (Cates et al., 2007). Por todo ello, este grupo de alérgenos juegan un papel fundamental en el desencadenamiento de la respuesta alérgica.

Las moléculas tipo lectina, como en apartados anteriores se ha mencionado, pueden unir específicamente secuencias de carbohidratos o glicoconjugados que contienen muchos de los alérgenos inhalados en su superficie. En las vías aéreas, la SP-A y la SP-D son capaces de unir los carbohidratos de extractos enteros y purificados de Der p 1 de manera calcio dependiente. También puede inhibir la unión de la IgE con Der p 1 a través de una unión competitiva o por impedimento estérico (Wang et al., 1996, Wang et al., 1998). En modelos animales, los ratones deficientes para el gen que codifica la SP-D (*Sftpd*^{-/-}) son más susceptibles a presentar sensibilización alérgica que los ratones no deficientes para esta proteína (Schaub et al., 2004). Por tanto, las SPs desempeñan un papel regulador en la respuesta inflamatoria y en el secuestro de los alérgenos, por lo que pueden influir en la sensibilización a alérgenos inhalados.

2.7.1 Pacientes

Los pacientes incluidos en nuestro estudio fueron diagnosticados por los especialistas colaboradores del Servicio de Alergología del HUGCDN (Las Palmas de Gran Canaria).

El diagnóstico de la sensibilización alérgica en pacientes con historia clínica compatible se efectuó mediante la realización de pruebas cutáneas en prick con una batería de los aeroalérgenos más comunes en nuestra zona, utilizando controles positivos (histamina al 1%) y negativos (suero glicerinado) en todas las determinaciones. Se testaron los siguientes alérgenos: derivados de los ácaros del polvo domésticos (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* y *Blomia tropicalis*), derivados de los ácaros de depósito (*Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor* y *Tyrophagus putrescentiae*), hongos (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium*), pólenes (*Phleum pratense*, *Artemisia vulgaris* y *Olea europea*), derivados dérmicos de animales (mezcla de plumas, perro, gato, conejo, caballo) y cucarachas (ALK-Abello S.A., España). Las pruebas se consideraron positivas si el diámetro mayor de la pápula a los 15 minutos fue de 3 mm o superior.

El diagnóstico final de alergia a derivados de los ácaros se realizó en base a una historia clínica sugestiva y a la presencia de pruebas cutáneas en prick positivas a ácaros. A todos los pacientes, y como parte de la práctica clínica habitual, se les realizó una espirometría basal (Flowscreen, Viasys, Alemania) en cada visita registrándose, entre otros, un parámetro funcional que nos informa de la capacidad pulmonar del paciente el FEV₁. En el presente estudio se han incluido en el análisis el porcentaje de los valores espirométricos obtenidos en el momento del diagnóstico con respecto al valor teórico normal.

El grupo de pacientes asmáticos se clasificó de acuerdo a la gravedad de la enfermedad, a los parámetros de función respiratoria y a los requerimientos de medicación de Guía Gina 2008 (*Global strategy from asthma management and prevention* (<http://www.ginasthma.com>)) (Bateman et al., 2008). A su vez el diagnóstico y estratificación del grupo de pacientes con rinitis se realizó de acuerdo a los criterios de la Guía ARIA 2008 (*Allergic Rhinitis and its Impact on Astma*) (Bousquet et al., 2008).

La recogida de datos para este estudio fue llevada a cabo entre Enero del año 2010 y Agosto del 2012 de manera prospectiva. Se incluyeron un total de 1207 pacientes que acudieron de forma consecutiva al Servicio de Alergología del HUGCDN (ver **ilustración 27**). Este Servicio atiende anualmente un número próximo a los a 17.000 pacientes (5.000 primeras visitas y 12.000 visitas sucesivas) procedentes del área norte de la isla de Gran Canaria. Se incluyeron en este trabajo sólo pacientes de origen español que estuvieran clínicamente bien controlados y que fueran alérgicos a los ácaros del polvo doméstico; se seleccionó sólo población adulta y tras testar si había familiares en el estudio, se incluyó únicamente al miembro de la familia con más años de seguimiento en consulta en el Servicio de Alergología.

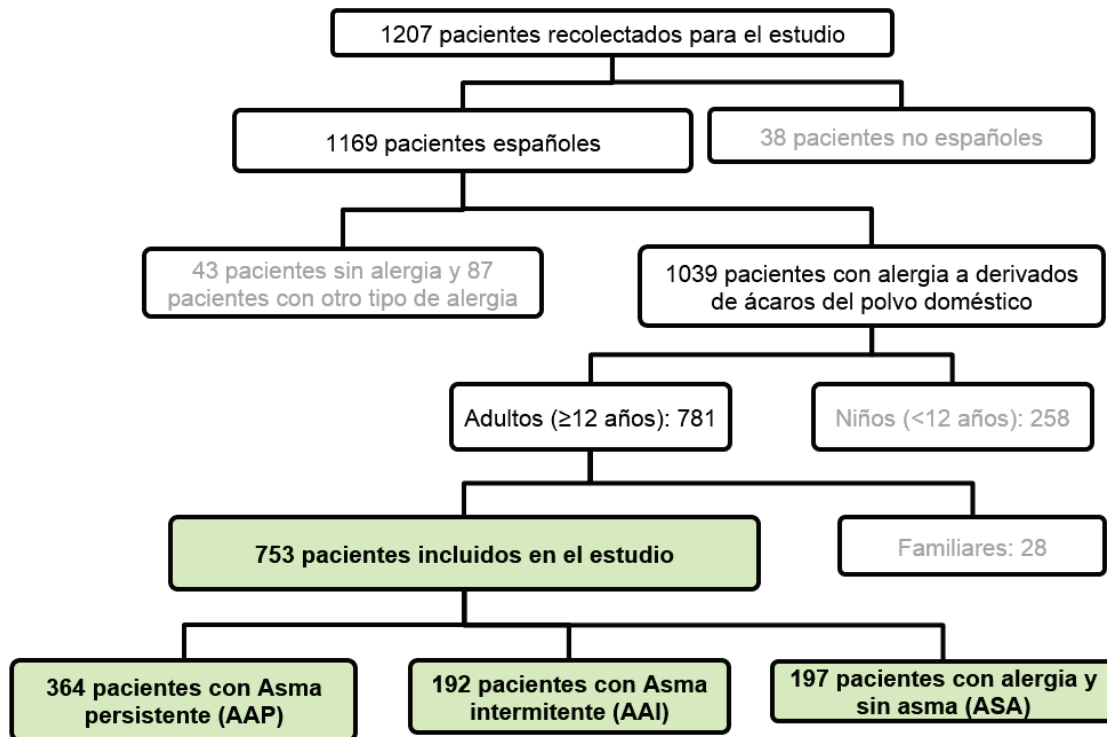


Ilustración 27. Diagrama de selección de pacientes (III).

AAP: Alergia con asma persistente. AAI: Alergia con asma intermitente. ASA: Alergia sin asma.

A continuación se muestran las características clínicas de los 753 pacientes con alergia a los ácaros del polvo doméstico, las características demográficas y la media de los parámetros funcionales pulmonares en los subgrupos de pacientes.

Tabla 18. Características clínicas de los pacientes (III).

Pacientes adultos con alergia (N=753)								
<u>Diagnóstico</u>	<u>SÍ</u>		<u>NO</u>			<u>SÍ</u>		
	<u>N</u>	<u>(%)</u>	<u>N</u>	<u>(%)</u>		<u>Clasificación</u>	<u>N</u>	<u>(%)</u>
Rinitis	745	(98,9)	8	(1,1)	Rinitis (N=745)	Intermitente	56	(7,4)
						Persistente	689	(91,5)
Asma	556	(73,8)	197	(26,2)		leve	422	(61,2)
						moderado	254	(36,9)
Conjuntivitis	144	(19,1)	609	(80,9)	Asma (N=556)	grave	13	(1,9)
Sinusitis crónica	43	(5,7)	144	(19,1)		Intermitente	192	(34,5)
Dermatitis atópica	21	(2,8)	732	(97,2)		Persistente	364	(65,5)
Poliposis	17	(2,3)	736	(97,7)		leve	208	(57,1)
Tabaco	60	(8)	693	(92)		moderado	97	(26,6)
						grave	59	(16,2)
		<u>ASA</u>		<u>AAI</u>		<u>AAP</u>		
		<u>(n=197)</u>		<u>(n=192)</u>		<u>(n=364)</u>		
Hombres (%)		79 (40,1)		80 (41,7)		118 (32,4)		
Edad (años)		29,1 ± 11,40		28,1 ± 11,8		30,5 ± 13,3		
Fumador (%)		19 (9,6)		17 (8,9)		24 (6,6)		
Años de seguimiento		3,4 ± 5,5		5,1 ± 5,7		6,0 ± 5,9		
FEV₁		100,0 ± 11,0		96,4 ± 13,6		83,8 ± 17,0		
FVC		98,7 ± 10,5		95,3 ± 12,9		86,0 ± 15,0		

N= número de individuos: %: porcentaje de individuos con cada característica. ASA: Pacientes con alergia sin asma. AAI: Pacientes con alergia y asma intermitente. AAP: Pacientes con alergia y asma persistente. FEV₁: volumen de aire máximo espirado en el primer segundo de la espiración forzada. FVC: capacidad vital forzada.

2.7.2 Hipótesis

Variantes en *SFTP A1*, *SFTP A2* y *SFTPD* modulan la predisposición a la alergia a los ácaros del polvo doméstico.

Variantes en *SFTP A1*, *SFTP A2* y *SFTPD* influyen en la predisposición al desarrollo de formas más grave de asma en pacientes alérgicos a los ácaros del polvo doméstico.

2.7.3 Objetivos

Comparar la distribución de las frecuencias de cada variante de los genes *SFTP A1*, *SFTP A2* y *SFTPD* (evaluadas a nivel de alelo, genotipo) en la PGE y en el grupo de pacientes alérgicos a los ácaros del polvo doméstico.

Comparar las frecuencias de alelos y genotipos de los genes *SFTP A1*, *SFTP A2* y *SFTPD* entre el subgrupo de pacientes alérgicos a ácaros domésticos diagnosticados de asma persistente o no.

Inferir los haplotipos y comparar las frecuencias de las distintas combinaciones con los 15 SNPs incluidos en el estudio entre pacientes alérgicos a los ácaros del polvo doméstico y la PGE, y entre subgrupos de pacientes alérgicos a los ácaros según diagnóstico o no de asma persistente.

Con este planteamiento tratamos de encontrar respuesta a las siguientes preguntas:

¿Existe una distribución de alelos y genotipos de los SNPs de *SFTP A1*, *SFTP A2* y *SFTPD* diferente entre la PGE y el grupo de pacientes alérgicos a los ácaros del polvo doméstico? ¿Existen SNPs de *SFTP A1*, *SFTP A2* y *SFTPD* significativamente asociados con la alergia a los ácaros y/o con la predisposición al desarrollo de un asma persistente? ¿Existen combinaciones de dichos SNPs en haplotipos que se asocien?

2.7.4 Resultados

Para responder a estas preguntas hemos realizado el análisis de asociación genética y hemos obtenido los resultados detallados a continuación.

Las frecuencias alélicas que presentaron cada uno de los SNPs en los pacientes con alergia a los ácaros del polvo doméstico (ALER, N=753) y de la PGE se representan en la siguiente **ilustración**:

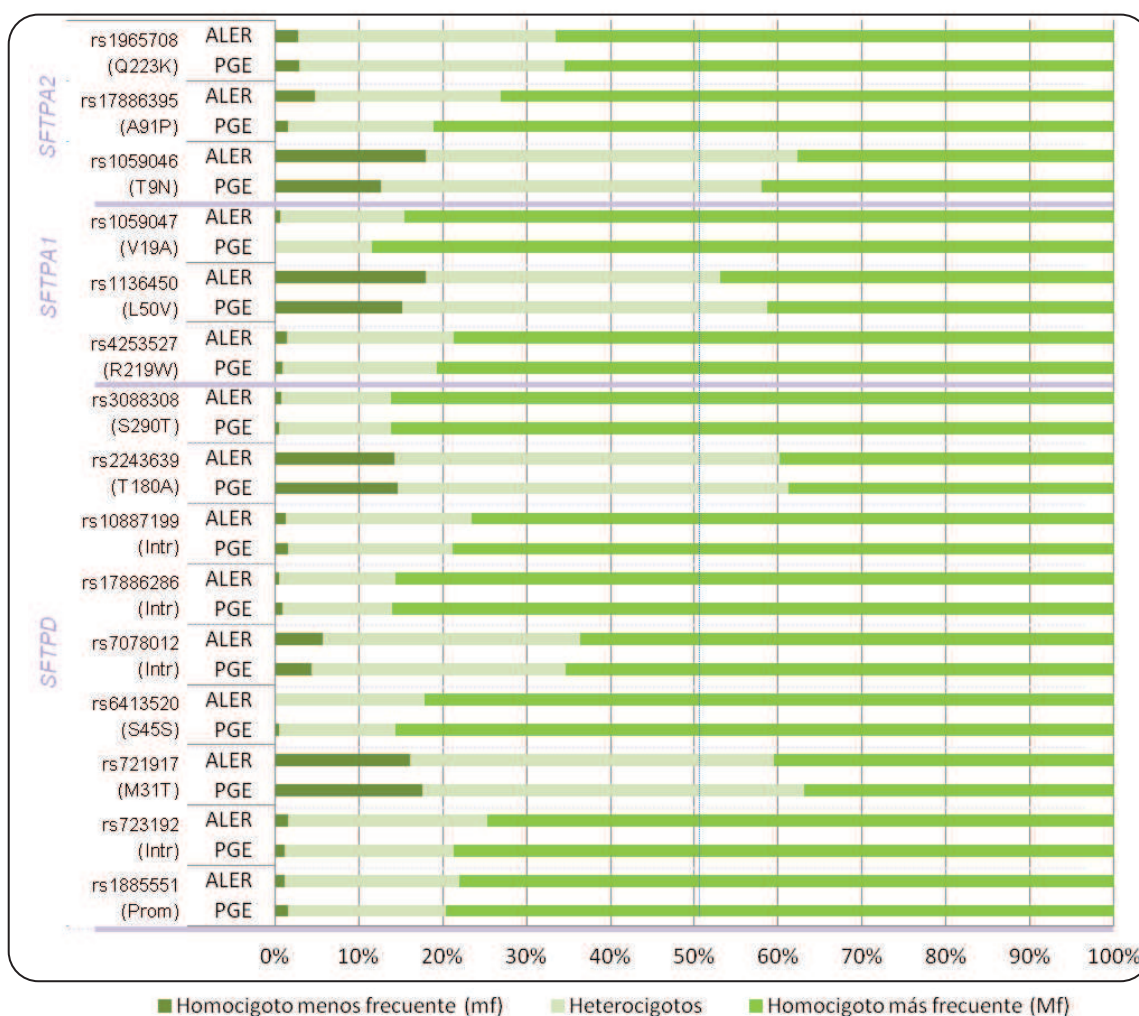


Ilustración 28. Frecuencias genotípicas en pacientes y en sujetos de la PGE (III).

ALER: pacientes con alergia a los ácaros del polvo doméstico; PGE: población general española. Distribución de las frecuencias de cada uno de los 15 SNPs incluidos en el estudio, en pacientes alérgicos a ácaros del polvo doméstico y en la PGE.

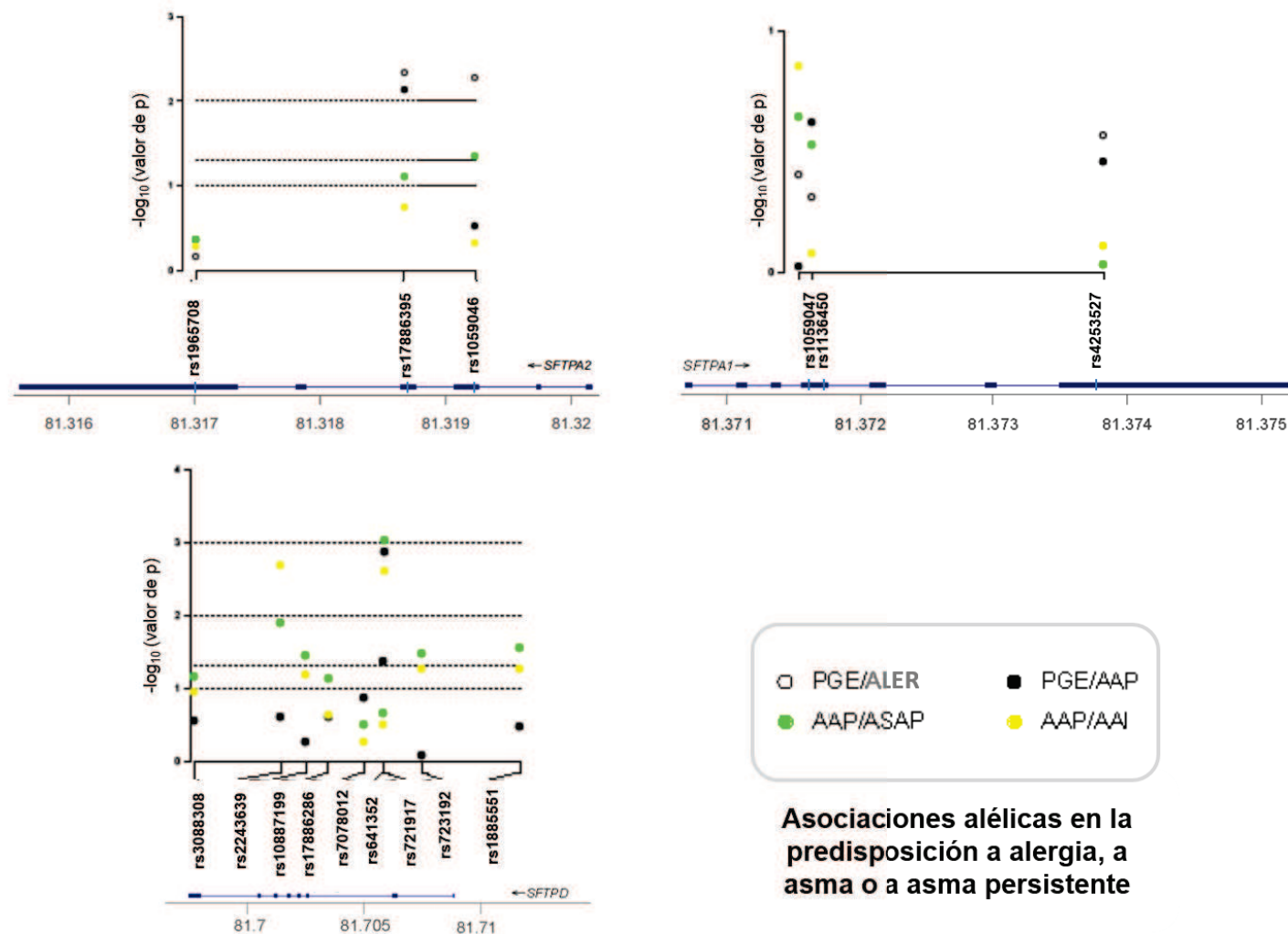
Al realizar el análisis de asociación alélica sólo dos de los SNPs de *SFTPA2* eran significativamente más frecuentes en los pacientes que en la PGE (entre corchetes se presentan las frecuencias de los casos y controles respectivamente, y entre paréntesis el valor de p para cada comparación) el

alelo *rs17886395-C* [0,1588 / 0,1027] ($P=0,004642$, OR 1,649, CI 95% 1,329-2,046) y el alelo *rs1059046-C* [0,4021 / 0,3531] ($P=0,005318$, OR 1,233 CI 95% 1,064-1,428), aunque las asociaciones no permanecieron significativas tras la corrección de Bonferroni.

Cuando realizamos la comparación de las frecuencias alélicas entre el grupo de sujetos de la PGE y el grupo de los pacientes alérgicos con asma persistente (AAP, N=364) hallamos que el alelo *rs17886395-C* [0,1415 / 0,1027] se encontraba más frecuentemente en los pacientes con AAP ($P=0,007352$, OR 1,439 CI 95% 1,102-1,880) y el alelo *rs721917-C* [0,3352 / 0,4029] de *SFTPD* era significativamente más frecuente en los individuos de la PGE, siendo esta comparación la única que superó las correcciones estadísticas aplicadas para múltiples comparaciones ($P=0,001370$, OR 0,747 CI 95% 0,625-0,893).

En este estudio también se realizó el análisis entre los pacientes que padecieron alergia a los ácaros domésticos tras agruparlos según su diagnóstico para el asma: los pacientes con alergia sin asma persistente (ASAP, N=389) se compararon con los pacientes con AAP (N=364); y los pacientes con alergia y asma intermitente (AAI, N=192) con los pacientes con AAP (ver **Ilustración 29**).

En las comparaciones realizadas, encontramos que, nuevamente, el alelo *rs721917-C* [0,3352 / 0,4177] se encontraba más frecuentemente en los pacientes que no padecían AAP, o lo que es lo mismo, en pacientes con ASAP ($P=0,000957$, OR 0,703 CI 95% 0,570-0,867). Este SNP provoca el cambio de una metionina por una treonina en el aminoácido 11 (*Thr¹¹*) de la SP-D y, nuestro estudio revela a *rs721917-C* como factor protector. Esta es la asociación más potente del estudio, la cual permaneció significativa tras aplicar la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. El mismo alelo *rs721917-C* se mantuvo significativo cuando comparamos al grupo de pacientes con AAP con el grupo de pacientes con AAI [0,3352 / 0,4271] ($P=0,002495$, OR 0,676 CI 95% 0,524-0,872).



Nota:

– $\log_{10}(p)=1$ equivale a un valor de **p** de **0,1**

– $\log_{10}(p)=2$ equivale a un valor de **p** de **0,01**

– $\log_{10}(p)=3$ equivale a un valor de **p** de **0,001**

– $\log_{10}(p)=4$ equivale a un valor de **p** de **0,0001**

Ilustración 29. Significación estadística de las comparaciones alélicas (III).

PGE: población general española. ALER: pacientes con alergia. AAP: pacientes con alergia y asma persistente. ASAP: pacientes con alergia sin asma persistente. AAI: pacientes con alergia y asma intermitente. Se ilustran las significaciones estadísticas (representadas como el $-\log_{10}$) de las diferencias de las frecuencias alélicas de los SNPs entre el grupo de PGE y pacientes con alergia (PGE/ALER) o asma persistente (PGE/AAP) y entre grupos de pacientes alérgicos: con y sin asma persistente (AAP/ASAP). En la parte superior, seis SNPs de los genes que codifican para la SP-A y, en la parte inferior los nueve seleccionados del gen que codifica para la SP-D.

Sin embargo, también hallamos un alelo, el *rs2243639-C*, como factor de riesgo para el desarrollo de AAP tanto cuando comparamos los pacientes con AAP y los pacientes con ASAP [0,4038 / 0,3419] ($P=0,012930$, OR 1,304 CI 95% 1,058-1,608), como cuando comparamos los pacientes con AAP y los pacientes con AAI [0,4038 / 0,3099] ($P=0,002050$). Esta última comparación fue estadísticamente significativa tras aplicar las correcciones de Bonferroni.

Se analizó también, en los 753 individuos con alergia a ácaros, el papel de los haplotipos de *SFTPA1* y *SFTPA2* (según la nomenclatura ya descrita $1A^n6A^n$) y de los haplotipos de *SFTPD* (denominados según la nomenclatura propuesta para los no sinónimos (D^n) seguidos de los otros SNPs según su orden en el cromosoma). Se compararon las frecuencias de estos haplotipos en individuos alérgicos con los observados en población general y entre los individuos con asma persistente y asma intermitente.

En el análisis de las frecuencias haplotípicas para *SFTPA2-SFTPA1* (ver la **tabla 19**), se detectó que el haplotipo $1A6A^3$ era marginalmente más frecuente en el grupo de pacientes con alergia a los ácaros del polvo doméstico que en los sujetos de la PGE (entre corchetes se presentan las frecuencias de los sujetos caso / control y entre paréntesis el valor de p para cada comparación), no obstante, no se mantuvo significativa ninguna de las asociaciones tras la correcciones aplicadas. En el análisis de las frecuencias haplotípicas para *SFTPA2* y *SFTPA1*, realizados por separado, encontramos una asociación significativa que señalaba como factor de riesgo al haplotipo $1A$ de *SFTPA2* [0,1304 / 0,0841] ($P=0,00004$).

Tabla 19. Asociaciones haplotípicas de *SFTPA2-SFTPA1* (III).

Comparación	Haplotipo	Valor de p	Factor
ALER / PGE	$1A$ [0,1304 / 0,08413]	($P=0,000038$)*	RIESGO
ALER / PGE	$1A6A^3$ [0,01682 / 0,005702]	($P=0,01279$)	RIESGO
ALER / PGE	$1A^76A^2$ [0,009196 / 0,003439]	($P=0,04545$)	RIESGO
ALER / PGE	$1A^36A^3$ [0,006054 / 0,01315]	($P=0,04676$)	PROTECTOR
APP/AAI	$1A^66A^{12}$ [0,004237 / 0,01919]	($P=0,01488$)	PROTECTOR

ALER: pacientes con alergia. PGE: población general española. AAP: pacientes con alergia y asma persistente. AAI: pacientes con alergia y asma intermitente. *Valor de p que supera las correcciones realizadas para múltiples comparaciones.

En el análisis de las frecuencias haplotípicas de los nueve SNPs de *SFTPD* (tabla 20), hallamos un haplotipo asociado como factor de predisposición frente a la alergia a los ácaros domésticos, el haplotipo *D¹-TCCGTA* [0,0045 / 0] (P=0,0033), que no se encuentra en ningún individuo de la PGE. Este haplotipo también se asoció como factor de predisposición frente a asma persistente al comparar individuos con asma persistente y sujetos de la PGE [0,0053 / 0] (P=0,0015). Las dos asociaciones encontradas superaron la corrección para múltiples comparaciones.

Tabla 20. Asociaciones haplotípicas de *SFTPD* (III).

Comparación	Haplotipo	Valor de p	Factor
ALER / PGE	<i>D¹-TCCGTA</i> [0,004533 / 0]	(P=0,003284)*	RIESGO
ALER / PGE	<i>D⁵-TCCACA</i> [0,007836 / 0,0188]	(P=0,007032)	PROTECTOR
AAP / PGE	<i>D¹-TCCGTA</i> [0,005287 / 0]	(P=0,001486)*	RIESGO
APP/AAI	<i>D¹-TCCACA</i> [0,2885 / 0,221]	(P=0,01602)	RIESGO

ALER: pacientes con alergia. PGE: población general española. AAP: pacientes con alergia y asma persistente. AAI: pacientes con alergia y asma intermitente. *Valor de p que supera las correcciones realizadas para múltiples comparaciones.

Realizando la comparación para haplotipos combinados *SFTPA2-SFTPA1-SFTPD* encontramos que el haplotipo *1A⁰6A²D⁵-TCCACA* está presente en el 1,6% de los sujetos de la PGE y sólo lo está en el 0,3% de los pacientes con alergia a los ácaros del polvo doméstico (P=0,002). Por otro lado, además de éste, otro haplotipo encontrado en asociación fue el *1A⁰6A²D³-TCCACA* [0,04912 / 0,02527] (P=0,005), que se trata de un haplotipo que está presente en el 5% de los pacientes con AAP pero en el 2,5% de la PGE.

Tabla 21. Asociaciones haplotípicas de *SFTPA2-SFTPA1-SFTPD* (III).

Comparación	Haplotipo	Valor de p	Factor
ALER / PGE	<i>1A⁰6A²D⁵-TCCACA</i> [0,00303 / 0,01604]	(P=0,002038)*	PROTECTOR
AAP / PGE	<i>1A⁰6A²D³-TCCACA</i> [0,04912 / 0,02527]	(P=0,005256)	RIESGO
AAP / PGE	<i>1A⁰6A²D¹-TCCGTA</i> [0,00497 / 0]	(P=0,01102)	RIESGO
AAP / PGE	<i>1A⁰6A²D⁵-TCCACA</i> [0,004542 / 0,01626]	(P=0,02525)	PROTECTOR
AAP / PGE	<i>1A¹6A³D²-TCCACA</i> [0,02399 / 0,04375]	(P=0,02779)	PROTECTOR
AAP / PGE	<i>1A²6A³D²-TCCACA</i> [0,001754 / 0,01026]	(P=0,03651)	PROTECTOR
AAP / PGE	<i>1A⁶A²D²-TCCACA</i> [0,00455 / 0,0004752]	(P=0,04692)	RIESGO

ALER: pacientes con alergia. PGE: población general española. AAP: pacientes con alergia y asma persistente. *Valor de p que supera las correcciones realizadas para múltiples comparaciones.

Uno de los objetivos principales de este trabajo es averiguar si existen variantes en los genes de las SPs que influyan en la evolución del asma, calificada en función de su periodicidad, como persistente o intermitente, en los individuos que son alérgicos a los ácaros del polvo doméstico. Pero al realizar las comparaciones de las distribuciones de las frecuencias de los 15 SNPs combinados en haplotipos, no hallamos ninguna asociación estadísticamente significativa.

La asociación significativa encontrada en la variante *rs721917* se puede leer en ambos sentidos: el alelo *rs721917-C* (*Thr¹¹*) como factor protector o el alelo *rs721917-T* (*Met¹¹*) como factor de riesgo para el desarrollo de asma persistente ($P=0,0010$; OR 0,70; 95% CI 0,570-0,867). Asociación que se mantuvo significativa tras realizar un análisis multivariante. La potencia estadística de estas asociaciones fue mayor del 99% cuando se establecieron los siguientes parámetros para estimarlo: un 80% como punto de corte de fiabilidad y un 99,7% de seguridad ($\beta=0,80$ y un alfa ajustada de $\alpha=0,003$). Se asoció, mediante el modelo dominante para el alelo C ($P=0,0037$) y mediante el modelo recesivo ($P=0,0225$), el alelo C en homocigosis parece ejercer una influencia protectora mayor que para la comparación alélica ($P=0,022$; OR 0,63; 95% CI 0,424-0,939).

Función pulmonar en función de las variantes genéticas

Para profundizar en el estudio de cómo pueden influir estas variantes genéticas en el asma, evaluamos el parámetro de función pulmonar FEV₁. Se analizó el impacto de estas variantes en los individuos alérgicos sin asma (ASN, N=178) y en individuos con AAP (N=352) con este dato disponible (ver **tabla 22**).

El genotipo menos frecuente de uno de los SNPs, el más asociado hasta ahora con la susceptibilidad a la alergia y al asma persistente en nuestro estudio, se asoció significativamente con un menor valor de porcentaje del FEV₁ ($\text{Beta}=-2,64$, $P=0,017$) en los pacientes con ASA. En los pacientes con AAP, los genotipos menos frecuentes de las variantes genéticas se

relacionaron con menor valor del porcentaje del FEV₁ (*rs1885551-GG*, *rs723192-TT*, *rs721917-CC*, *rs17886286-GG* y *rs10887199-CC*).

Tabla 22. Asociaciones de los SNPs con el porcentaje de FEV₁.

Pacientes	Genes	SNPs	N	BETA	SE	P	P ^a
ASA	<i>SFTPD</i>	<i>rs721917</i>	178	-2,64	1,10	0,017	0,013
ASA	<i>SFTPA2</i>	<i>rs1059046</i>	178	-2,58	1,11	0,021	0,036
AAP	<i>SFTPD</i>	<i>rs723192</i>	352	-5,17	1,97	0,009	0,004
AAP	<i>SFTPD</i>	<i>rs10887199</i>	352	-5,11	2,01	0,011	0,007
AAP	<i>SFTPD</i>	<i>rs721917</i>	352	-3,32	1,29	0,011	0,009
AAP	<i>SFTPD</i>	<i>rs1885551</i>	352	-5,22	2,06	0,012	0,012
AAP	<i>SFTPD</i>	<i>rs7078012</i>	352	3,10	1,45	0,033	0,018
AAP	<i>SFTPD</i>	<i>rs17886286</i>	352	-5,49	2,73	0,045	0,038
AAP	<i>SFTPA1</i>	<i>rs1059047</i>	342	-5,55	2,73	0,043	> 0,05

ASA: pacientes alérgicos sin asma. AAP: pacientes alérgicos con asma persistente. SE: Error del estadístico de Beta. P^a=valor de *p* obtenido tras el análisis ajustado para la edad, el género y el tabaquismo.

Hemos hallado la presencia de dos haplotipos que, en individuos con AAP, se relacionan con valores de porcentaje de FEV₁ menores, y parecen estar ejerciendo una influencia mayor los SNPs por separado que las combinaciones de haplotipos. Se trata de los haplotipos denominados *1A⁰6A²D²-CCCATG* (Beta=-26,44, P=0,00047) y *1A⁰6A³D²-TCCACA* (Beta=-20,84, P=0,00596), de *SFTPA2-SFTPA1-SFTPD*, que coinciden en el haplotipo *1A⁰* y en el *D²*. Hay que destacar que el haplotipo *D²* de *SFTPD* abarca los alelos *rs721917-C* (*Thr¹¹*) y *rs2243639-T* (*Thr¹⁶⁰*).

Niveles séricos de SP-D en función de las variantes genéticas

La SP-D se cuantificó mediante un inmunoensayo disponible y diseñado comercialmente. En cada uno de los ensayos se testó un control negativo, un control para concentración alta y otro para concentraciones bajas. Cada muestra se analizó por duplicado y el valor asignado a cada individuo es la media de los dos valores cuantificados en ng/μl. La metodología fue descrita en el subapartado *Determinaciones séricas* (página 46) de **Métodos**.

En los individuos de la PGE (N=150) la media de SP-D sérica fue de 144 ng/μl, en los pacientes con ASA (N=42) fue de 162 ng/μl y en los pacientes con AAP (N=64) fue de 129 ng/μl aproximadamente.

Al explorar la variable que se obtuvo de esas determinaciones se detectó que no seguía una distribución normal. Para poder aplicar los análisis estadísticos, la hipótesis de normalidad en la distribución de los datos se debe cumplir por lo que transformamos la variable a escala logarítmica con el objetivo normalizarla. Se evaluó el impacto que ejercen los SNPs sobre la concentración sérica de SP-D mediante el análisis de regresión lineal. Algunas variantes mostraron asociación con los niveles séricos de SP-D teniendo en cuenta la sólo la edad y el sexo, ya que ninguno de los pacientes era fumador. En los individuos alérgicos sin asma, las siguientes variantes: *rs1885551-G*, *rs723192-T*, *rs721917-C (Thr¹¹)* y *rs10887199-CC* se asociaron con los niveles más bajos de SP-D. Vale la pena mencionar que estas variantes en homocigosis son las que se presentan normalmente de manera menos frecuente en las poblaciones europeas en que se han estudiado.

Los resultados revelaron que el polimorfismo localizado en la zona promotora del gen, el *rs1885551*, contaba con el mayor coeficiente Beta de regresión. Su coeficiente Beta de $-0,690$, que se muestra en la **tabla 23**, significa una disminución de la variable dependiente (la concentración de SP-D en el suero) en $0,690$ unidades logarítmicas, con una significación de $0,0013$. El grado en el que la variante genética ejerce su influencia sobre la SP-D sérica se puede observar mejor si se muestra la concentración en la unidad en la que se midió originalmente, ng/ml. En el caso del coeficiente mencionado ($-0,690$), el alelo *rs1885551-G* se asoció significativamente con una disminución media de aproximadamente $2,00$ ng/ml de SP-D sérica en los 42 individuos con alergia ASA analizados.

La cuantificación de esta proteína también se realizó en 66 individuos con asma persistente pero no se detectó ninguna asociación significativa con los polimorfismos en este grupo de pacientes. Este grupo concreto de pacientes con AAP reciben tratamiento regular con corticoides inhalados que podrían alterar los valores séricos de esta proteína.

En los individuos de la población general encontramos variantes asociadas con los niveles séricos, siendo la variante *rs7078012-T* vinculada a

mayor concentración y otros dos SNPs, *rs723192-C* y *rs1885551-G*, con menores niveles de esta proteína en el suero.

Tabla 23. Impacto de los SNPs de *SFTPD* en la concentración de SP-D.

Individuos	SNPs	Beta	N	Valor de <i>p</i>
ASA	<i>rs1885551</i>	-0,6897	42	0,0013
ASA	<i>rs723192</i>	-0,5681	42	0,0019
ASA	<i>rs10887199</i>	-0,6071	42	0,0043
ASA	<i>rs721917</i>	-0,3239	42	0,0136
PGE	<i>rs7078012</i>	0,2486	150	0,0022
PGE	<i>rs723192</i>	-0,2623	150	0,0357
PGE	<i>rs1885551</i>	-0,2581	150	0,0448

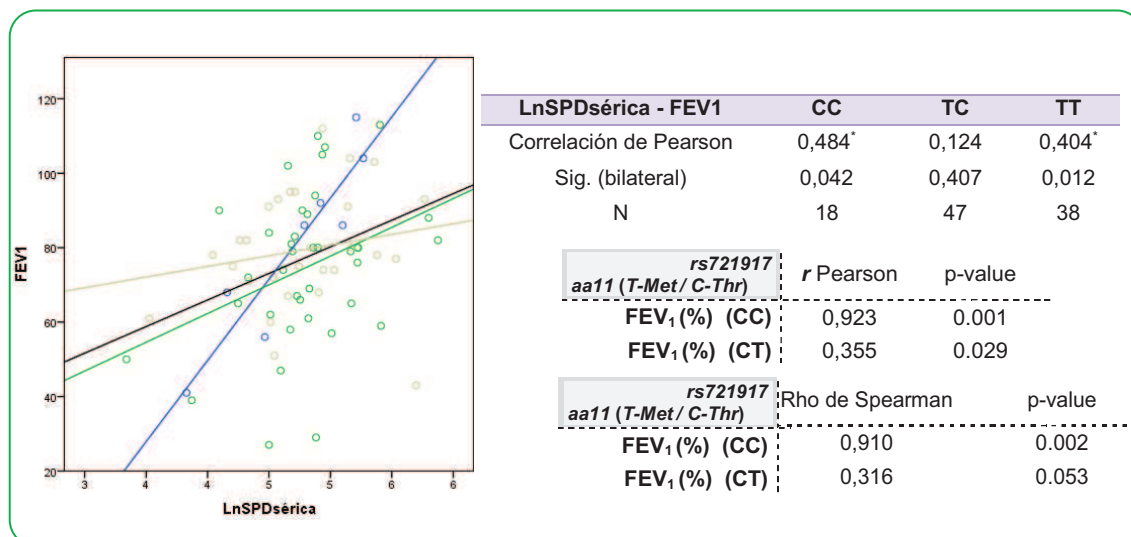
ASA: Pacientes con alergia sin asma. PGE: individuos de la población general española. Se muestran los valores significativos obtenidos para el análisis realizado mediante regresión lineal. Los valores de Beta negativos indican que la relación del SNP y la concentración de SP-D sérica, en ng/μl, es de disminución cuando se porta el alelo menos frecuente. Los valores de Beta positivos indican que la relación del SNP y la concentración de SP-D sérica, es de aumento cuando se porta el alelo menos frecuente.

La comparación de la concentración de SP-D fue realizada bajo el modelo recesivo para el alelo más frecuente. Los pacientes ASA mostraban valores significativamente más altos que los pacientes con AAP con el mismo genotipo. Las diferencias principales entre estos dos grupos se encontraron con los siguientes genotipos: *rs1885551-A* ($P=0,0018$); *rs723192-C* ($P=0,0004$); *rs721917-T* (*Met*¹¹) ($P=0,0018$); y *rs10887199-T* ($P=0,0027$). Al evaluar la relación entre los niveles séricos de SP-D y los individuos alérgicos incluidos ($N=106$), hallamos el mayor efecto en el SNP con el *rs723192* (Beta=-0,381, $P=0,0001$) mediante un modelo lineal ajustado para los diagnósticos de AAP o ASA (datos no mostrados en la tabla).

En pacientes con AAP, nuestros resultados indican que los niveles de SP-D tienen relación con el porcentaje del FEV₁ con una correlación de Pearson (r) de 0,361 ($P=0,0016$). En la **tabla 24** se muestran las correlaciones en subgrupos de pacientes según la variante *rs721917*. Encontramos que en los pacientes AAP con el genotipo *rs721917-CC* ($N=8$) existe una alta correlación entre los niveles de SP-D y FEV₁, a pesar del reducido número de individuos analizados: $r=0,923$ ($p=0,001$); con CI 95% de 0,625-0,986. Por lo tanto, en pacientes con AAP con este genotipo encontramos que la SP-D sérica y el porcentaje del FEV₁ tiene, al menos, un nivel de correlación de

Pearson correspondiente al valor del límite inferior del intervalo, $r=0,625$. Al calcular la correlación entre estas dos variables en el total de individuos con alergia a los ácaros del polvo doméstico, observamos que la r para cada uno de los alelos es menor que para los pacientes con AAP. Para el genotipo $rs721917-CC$ es 0,484 ($p=0,04$) y para el $rs721917-TT$ es 0,404 ($p=0,01$).

Tabla 24. Correlación de la SP-D sérica con el porcentaje de FEV_1 en pacientes alérgicos.



AAP: Alergia y asma persistente. N: tamaño muestral. En la gráfica se muestra la correlación entre la concentración de la SP-D sérica y el porcentaje del FEV_1 , en pacientes alérgicos a los ácaros del polvo doméstico, considerando el SNP $rs721917$ ($Met^{11}Thr$), con los datos correspondiente a los datos mostrados en la parte superior de la tabla. Se representan cada uno de los genotipos ($CC \rightarrow$ azul, $CT \rightarrow$ verde, $TT \rightarrow$ amarillo) y la relación global (negro) en individuos alérgicos ($N=103$). En la parte inferior de la tabla se muestra la correlación entre el porcentaje de FEV_1 y la concentración de la SP-D en suero (medida en unidades logarítmicas) en pacientes alérgicos a ácaros con asma persistente ($N=64$) para las correlaciones realizadas con los pacientes que portaban el genotipo CC ($N=8$) y para los pacientes que portaban el haplotipo CT ($N=38$).

2.7.5 Discusión

Las colectinas pulmonares SP-A y SP-D se encuentran implicadas en la regulación del sistema inmune innato dentro del pulmón. En particular, la SP-D parece tener funciones reguladoras en la inflamación. Aunque los mecanismos moleculares subyacentes no se conocen bien todavía, se cree que la SP-D juega un papel dual, proinflamatorio y antiinflamatorio, a través de efectos definidos por su orientación cuando se une a otras moléculas (Gardai et al., 2003) y que dependen, posiblemente, de su grado de multimerización. En nuestro estudio encontramos que el alelo $rs721917-C$ (Thr^{11}) del gen SFTPD, se asocia con un menor desarrollo de asma persistente en pacientes

alérgicos a los ácaros del polvo doméstico. El SNP *rs721917*, bialélico, es un cambio no sinónimo en el aminoácido 11 de la SP-D, que puede tener en esta posición metionina o treonina (*Met¹¹Thr*). Existen varios factores que podrían explicar, al menos en parte, el efecto de este polimorfismo en el desarrollo de asma.

A través de numerosos estudios se ha mostrado que las infecciones respiratorias pueden producir asma o provocar su exacerbación (Bont et al., 2004, Friedlander y Busse, 2005, Henderson et al., 2005, Sigurs et al., 2005, Kusel et al., 2007). La patogenia del asma podría por tanto verse influenciada por la susceptibilidad a las infecciones o la capacidad de respuesta frente a los patógenos. Dado que tanto la SP-A como la SP-D participan en la neutralización de bacterias, virus, hongos y células necróticas; en la regulación de la reacción alérgica; en la resolución de la inflamación (Wright, 2005, Kishore et al., 2006); en el reconocimiento de los PAMPs, y estimulando la quimiotaxis y facilitando la fagocitosis que realizan los macrófagos alveolares, estas proteínas también podrían ser relevantes en el asma. Pero SPA y SP-D no sólo regulan la función entre células inmunes innatas, sino que también interactúan y modulan las funciones de las células que dirigen el proceso de polarización de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T con el fin de atenuar la infección y la inflamación (las células dendríticas). De este modo las SPs proporcionan un enlace entre el sistema inmune innato y el adquirido.

La influencia de las SPs en las interacciones de los macrófagos alveolares con los patógenos varía según el microorganismo. En los últimos años, se ha asociado algunas formas de asma grave con una inflamación neutrofílica de las vías aéreas adquirida vía polarización de células Th1 a Th17 (Aujla y Alcorn, 2011, Trejo Bittar et al., 2015, Oberley y Snyder, 2003). Estas células predominantes, los neutrófilos, son una gran fuente de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, que también se encuentran en mayor proporción en el asma persistente.

Por otro lado, se ha demostrado una conexión entre el reconocimiento de LPS por parte de las células dendríticas y la regulación o el desarrollo de

alergia. También se han encontrado diferencias de avidez de los dos alelos del SNP *rs721917* con respecto a la unión al LPS y al peptidoglicano, lo que también podría contribuir a la modulación del desarrollo de asma. La SP-D puede encontrarse con distintos grados de oligomerización. La SP-D en forma trimérica se relaciona con una mejor unión al LPS, al peptidoglicano y a las lipoproteínas endógenas, pero con una peor unión a los residuos de manosa y al ácido lipoteicoico. Hay que mencionar que la SP-D amniótica con la variante *rs721917-T* (*Met*¹¹) posee mayoritariamente formas multimerizadas de la SP-D, y la variante *rs721917-C* (*Thr*¹¹) tiene tanto formas triméricas como con multimerización incompleta, conservando ambas distintos patrones de entrecruzamiento entre sus puentes disulfuro en las regiones amino terminales (Leth-Larsen et al., 2005, Sorensen et al., 2009).

La SP-A y la SP-D, suprimen la proliferación de linfocitos tras la estimulación producida por *D. pteronyssinus* en los ratones no sensibilizados (sin exposición previa), atenuando así la respuesta alérgica. Sin embargo, en ratones sensibilizados se detectó un menor efecto supresor (Wang et al., 2001). Se ha estudiado, también en un modelo de ratón, el efecto de la sensibilización a ovoalbúmina en función de distintas concentraciones de LPS. A dosis muy bajas, el LPS induce tolerancia; a dosis bajas se induce una respuesta tipo Th2, y a dosis altas de LPS se induce una respuesta tipo Th1. El principal receptor del LPS es el TLR4. Sin embargo, TLR4 no parece reconocer LPS por sí solo, haciéndolo a través de proteínas accesorias. La proteína de unión a LPS (*lipopolysaccharide binding protein*, LBP) extrae el LPS de las membranas de bacterias gram negativas y lo transfiere a CD14 a través de la interacción con TLR4 y MD-2, induciendo de esta forma la señalización celular proinflamatoria. Tras haber sido inducida por alérgenos de los ácaros del polvo doméstico, la activación de macrófagos alveolares es inhibida por la SP-D porcina a través de complejos CD14/TLR4 de dichos macrófagos (Liu et al., 2005). Además, se ha descrito la implicación de la SP-D, entre otras moléculas solubles, en la exacerbación y en la resolución de la inflamación (Litvack y Palaniyar, 2010). En conjunto, todo lo anterior apoya el concepto de que la SP-D puede ser un importante modulador de la inflamación pulmonar inducida por alérgenos. Se ha demostrado que Der p 2,

uno de los principales alérgenos del *D. pteronyssinus*, y probablemente también otros alérgenos, tienen una alta homología estructural y funcional con MD-2. Der p 2 es capaz de interaccionar con TLR4, CD14 y LPS y bajar el umbral de respuesta a este último, permitiendo la respuesta a cantidades extremadamente bajas de LPS (como las que hay en el ambiente) y promoviendo una respuesta tipo Th2. Der p 2 actúa como autoadyuvante induciendo la generación de linfocitos efectores Th2. En humanos, la exposición a niveles altos de LPS protege del desarrollo de alergia pero la exposición a LPS puede exacerbar un asma preexistente.

El alelo *rs721917-T (Met¹¹)*, asociado en nuestro estudio al riesgo de desarrollo de asma persistente, también se ha asociado en población finlandesa con mayor riesgo de prematuridad en familias con múltiples partos prematuros en comparación con familias con sólo partos a término (Karjalainen et al., 2012). Además, se han identificado varias asociaciones de polimorfismos en los genes de las SPs con enfermedades comunes y multifactoriales, como el asma y la rinitis alérgica. En un estudio realizado en niños de raza negra, el alelo *rs721917-C (Thr¹¹)* se asoció con menor atopía y, potencialmente, con menor susceptibilidad a asma (Brandt et al., 2008). Otro estudio realizado en población china indica que dicho alelo de *SFTPD* (Deng et al., 2009) se asocia con mayor riesgo de desarrollo de rinitis alérgica en población china. Por el contrario, no se detectó asociación con asma de ninguno de los SNPs no sinónimos de ese gen en un estudio, más amplio que los anteriores, realizado con 322 niños alemanes con asma y 270 controles (Krueger et al., 2006).

En el presente estudio se ha detectado que el alelo *rs721917-C (Thr¹¹)* se asocia con un menor desarrollo de asma persistente en pacientes alérgicos a ácaros del polvo doméstico y también se relaciona con un menor porcentaje de FEV₁ y menores niveles de SP-D en el suero. Aunque esto puede parecer contradictorio, revisando la literatura observamos distintos matices que podrían explicar este efecto dual. En nuestro estudio hemos analizado la influencia de los genes de las SPs sobre los niveles de SP-D séricos en individuos de la PGE y en individuos con alergia a los ácaros del polvo doméstico. Se sabe que la concentración de SP-D en suero se incrementa

significativamente con la edad, el tabaquismo y en relación al sexo masculino (Sorensen et al., 2006b). Por este motivo, en este trabajo hemos incluido solamente pacientes no fumadores. Se ha detectado un aumento de la SP-D en el líquido alveolar y en el suero de pacientes con asma (Koopmans et al., 2004, Erpenbeck et al., 2006), lo que posiblemente traduce un aumento de los niveles pulmonares y un incremento de la permeabilidad bidireccional del tejido epitelial respiratorio. No obstante, aunque en nuestro estudio hemos encontrado menores niveles en suero de los esperados en pacientes alérgicos, estas diferencias pueden explicarse por el tratamiento que requieren y al que, de hecho, están sometidos la mayoría de los pacientes con asma persistente, que consiste habitualmente en un corticoide inhalado y un β -2-agonista de acción prolongada. Se sabe que este tratamiento disminuye los niveles séricos de SP-D en pacientes con EPOC tras tres meses de administración continuada (Liu et al., 2014). Por tanto, no siempre un cambio de alelo se refleja en los niveles séricos de la SP-D, lo que sugiere que las diferencias de niveles no son las que explican los efectos observados.

Los factores asociados con el aumento de la SP-D en el suero en sujetos sanos son: la edad, el índice de masa corporal y el género masculino (Sorensen et al., 2006b, Sorensen et al., 2006a, Zhao et al., 2007). Un estudio poblacional demostró una correlación entre el aumento de SP-D en suero de sujetos fumadores y la reducción de su función pulmonar, por lo que se sugiere que puede servir como un marcador clínico de daño pulmonar inducido por el humo del tabaco. En concordancia con esto, en un estudio en pacientes con EPOC, se encontró una correlación negativa de los niveles de esta proteína con los parámetros de la función pulmonar en los fumadores (Winkler et al., 2011). Este resultado, sin embargo, no pudo ser reproducido en el estudio multicéntrico de cohorte “*Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints*” (ECLIPSE) (Lomas et al., 2009, Vestbo et al., 2011), ni en un estudio de gemelos suecos (Engstrom et al., 2012), donde un grupo de los sujetos controles no eran fumadores. Tres estudios de cohortes han demostrado que el tratamiento con corticosteroides orales disminuye los niveles séricos de SP-D (Eickhoff et al., 2008, Lomas et al., 2009, Liu et al., 2014) y en uno de ellos se observó que la SP-D sérica se

relacionaba con la atenuación de los síntomas y el cambio en el porcentaje de FEV₁. En un estudio realizado en gemelos, el alelo *rs721917-C* se asoció a menores niveles de SP-D sérica (Sorensen et al., 2006b) y, en otro estudio, también se relacionó con menores niveles séricos y con el desarrollo de enfisema (Ishii et al., 2012b). Varios SNPs en el gen de la SP-D se han asociado previamente con el porcentaje de FEV₁ en la EPOC. En una cohorte de 1.719 pacientes con EPOC en el estudio ECLIPSE, ya citado, se hallaron 28 SNPs con influencia sobre la SP-D sérica, entre ellos el SNP *rs791917*. Sin embargo, el mayor efecto se observó con el alelo menos frecuente del SNP del promotor de la SP-D (*rs1885551-G*) (Foreman et al., 2011), que fue incluido en nuestro estudio por ese motivo y confirmamos dicha asociación en nuestra población. Además el SNP *rs721917* también se asoció en el estudio ECLIPSE, junto a otros SNPs, con el porcentaje de FEV₁ y, en un estudio GWAS con el riesgo de desarrollo de la EPOC (Kim et al., 2012).

La SP-A, y posiblemente también la SP-D, protegen del daño oxidativo a los fosfolípidos del surfactante (McCormack, 1998). *In vitro* se ha demostrado que la exposición de distintas variantes genéticas de SP-A al ozono provoca la producción de distintas cantidades de citocinas proinflamatorias IL-8 y TNF- α , como respuesta al estrés oxidativo (Wang et al., 2002). Esto sugiere que distintas variantes genéticas pueden influir de forma diferente sobre la regulación de la respuesta inflamatoria. No obstante, la SP-D difiere en estructura de la SP-A, y forma grandes multímeros unidos por sus regiones amino terminales. Hay dos residuos de cisteína localizados en la región hidrofóbica amino terminal de la SP-D (residuos 15 y 20 de la proteína final ya procesada) que son críticos para la oligomerización de la proteína a través de los puentes disulfuro. Con esta organización, los dominios amino terminales quedan escondidos en el centro de la proteína, lo que hace que se vea limitada la capacidad de la SP-D para activar las cascadas de señalización necesarias en la inflamación. No obstante, esta estructura más ampliamente organizada resulta eficaz en la opsonofagocitosis y en el mantenimiento de un estado antiinflamatorio a través de la unión al receptor SIRP α de la membrana del macrófago (Wang et al., 2004, Leth-Larsen et al., 2005). En un modelo de daño pulmonar en ratón, esas cisteínas están

reducidas cuando la proteína se encuentra en forma de dodecámero, lo que las hace susceptibles a la S-nitrosilación por parte del óxido nítrico (NO) tanto con los niveles endógenos como en experimentos *in vitro*. La S-nitrosilación es un mecanismo de modificación covalente y postraducciona que puede implicar consecuencias importantes en la señalización que median las SPs para el control de la inflamación pulmonar. Esta modificación es capaz de producir la disrupción de los multímeros de SP-D dando lugar a trímeros de SP-D modificados, denominados (SNO)-SP-D (Guo et al., 2008). El NO es una molécula reguladora y mediadora en muchas enfermedades, como el daño pulmonar agudo, la displasia broncopulmonar, el SDRA y el asma (Ricciardolo et al., 2004). Se trata de un radical relativamente estable que se incrementa en el aire exhalado de individuos asmáticos. Su síntesis excesiva se ha implicado en la patogénesis de la inflamación en el asma. El NO producido en los pulmones es un importante regulador de diversos eventos en el tracto respiratorio, tales como modificaciones del tono de las vías aéreas, regulación del tono vascular pulmonar, estimulación de la secreción de mucina, modulación de la depuración mucociliar a través del efecto en la frecuencia del batido ciliar y vigilancia inmunológica, incluyendo los efectos tumoricida y bactericida (Ashutosh, 2000). Los (SNO)-SP-D producen la quimioatracción de los macrófagos y la inducción de la fosforilación de p38-MAPK a través de la capacidad de señalización que, posiblemente, está mediada vía calreticulina/CD91. Por tanto, el NO es capaz de producir alteraciones a nivel de la estructura cuaternaria de la proteína promoviendo la actividad pro-inflamatoria y, en definitiva, alterando la inmunidad innata pulmonar. En nuestro estudio encontramos que la variante *rs721917-T (Met¹¹)* se asocia al desarrollo de asma persistente en pacientes alérgicos a los ácaros del polvo doméstico. La presencia de una *Thr* en el lugar de una *Met* en el dominio N-terminal de la SP-D podría implicar una ventaja antiinflamatoria ya que la *Met* contiene azufre y, por eso, es particularmente susceptible a la oxidación por parte de las especies reactivas de oxígeno. La oxidación de la *Met* resulta en la formación de una mezcla de dos diastereoisómeros de sulfóxido de metionina R y S. Estas formas de *Met* oxidada pueden ser reducidas por las enzimas metionina-sulfóxido reductasas como protección frente al estrés oxidativo, de modo que si no actúan

adecuadamente no hay una reparación de la *Met* oxidada y se puede llegar a alterar la estructura de las proteínas, lo que implicaría la pérdida de algunas de sus funciones (Kim et al., 2014).

La exposición a contaminantes atmosféricos, en especial a NO₂, tiene efectos sobre la salud respiratoria. Se ha relacionado, tanto con las visitas a los Servicios de Urgencias e ingresos hospitalarios, como con la incidencia y las exacerbaciones del asma y el absentismo escolar (OMS). Se sabe que los individuos con asma tienen tres veces más NO en las vías aéreas inferiores y en el aire exhalado. Existen evidencias definitivas de la presencia de un estado metabólico de estrés oxidante en el asma, lo cual no es sorprendente considerando la naturaleza inflamatoria del proceso. Sin embargo, se desconoce el papel que desempeñan las especies reactivas de oxígeno en la cascada de eventos inflamatorios e inmunológicos característicos del asma. En población general italiana, la exposición a NO₂ se relacionó con un incremento de 1,7 veces de la incidencia de enfermedades respiratorias agudas (Ricciardolo et al., 2004). En un grupo de niños chinos con asma, la exposición a NO₂ se relacionó con un aumento de 1,5 veces de exacerbaciones de asma o crisis de asma (Hammad et al., 2009).

Por otro lado, la expresión de dos microARNs, miR-155 y miR-21, regulan la proliferación monocítica y granulocítica y, si actúan de manera sinérgica, activan a STAT3 vía SHIP-1 logrando la expresión de muchas citocinas, quimiocinas y otros mediadores como la IL-6. Los análisis en subpoblaciones linfocitarias indicaron que dichos microARNs inducen la expansión de monocitos y granulocitos de origen mieloide. En fase tardía, el miR-21 induce, entre otros factores, IL-10 e inhibe la producción de miR-155 (Li et al., 2014). En la actualidad ya existen líneas de ratón que expresan el gen humano *SFTPD*. Recientemente se ha experimentado con un modelo de ratón transgénico para el polimorfismo rs721917 (*Met*¹¹*Thr*) y se ha sugerido que, en la respuesta aguda a la inflamación alérgica, este SNP influye en la regulación de la producción de dichos microARNs, implicados en la proliferación de células relacionadas con la inmunidad innata (Winkler et al., 2014). En un modelo de ratón al que se le indujo alergia a la ovalbúmina, el grupo que expresaba la SP-D que contenía el alelo rs721917-C (*Thr*¹¹)

aumentó la producción de miR-155 y miR-21 y, en cambio, el grupo de ratones con el alelo *rs721917-T* (*Met¹¹*) mostraron una disminución de miR-21. Estos hallazgos sugieren que los ratones que portan la variante con la *Met¹¹* tienen afectada la capacidad antiinflamatoria llevada a cabo por miR-21 en fase tardía. En nuestro estudio encontramos que los pacientes con asma persistente eran portadores con mayor frecuencia del alelo *rs721917-T* (*Met¹¹*). En conjunto, este SNP podría estar modulando la capacidad para regular la señalización antiinflamatoria. Además, los ratones que portaban *rs721917-C* (*Thr¹¹*), tras ser sensibilizados a ovoalbúmina, mostraron menores niveles de IL-5 y menos cantidad de eosinófilos. Este dato también se puede traducir como una menor respuesta inflamatoria Th2. Paralelamente se puede observar que ese alelo, *rs791917-C* (*Thr¹¹*), es más frecuente en el grupo de personas alérgicas sin asma persistente incluido en esta tesis.

En resumen, el efecto que el cambio *Met¹¹Thr* puede tener en las funciones de la proteína, como son la eliminación por opsonofagocitosis de bacterias y virus, su afinidad por alérgenos (como los de ácaros del polvo) y por el LPS y peptidoglicanos, así como en la susceptibilidad a la S-nitrosilación, pueden explicar su efecto en el desarrollo del asma y en las alteraciones de la función pulmonar.

En un principio puede parecer contradictorio el efecto dual del alelo *Met¹¹Thr* en la susceptibilidad a asma persistente en individuos alérgicos a ácaros del polvo (*rs721917-T*, *Met¹¹*, predispone a asma persistente) y en la función pulmonar (*rs721917-T*, *Met¹¹* se asocia con mejores parámetros de función pulmonar). Sin embargo, dadas las múltiples funciones de la SP-D y de su papel tanto pro como antiinflamatorio, dependiendo del estado pulmonar, un mismo alelo podría afectar de forma distinta a cada una de estas funciones y, por lo tanto, afectar también en distinto grado y en distinto sentido a la susceptibilidad al asma y la función pulmonar.

2.7.6 Conclusiones

En coherencia con los resultados obtenidos y discutidos en este segundo estudio, se han alcanzado las siguientes **conclusiones**:

Ninguno de los SNPs estudiados de los genes *SFTPA2*, *SFTPA1* y *SFTPD* se asocian individualmente a la alergia a los ácaros domésticos cuando se compararon con la PGE. Sin embargo, el haplotipo 1A y el *D1-TCCGTA* se asocian con mayor riesgo mientras el *1A⁰6A²D⁵-TCCACA* se asocia con mayor protección.

Los pacientes con cromosomas que contienen el alelo *rs721917-C* del gen *SFTPD* tienen un asma menos grave. Este SNP tiene carácter protector al comparar la PGE y los pacientes con AAP, al comparar los pacientes con APP tanto con los pacientes con ASAP, como con los pacientes con AAI. En esta última comparación el *rs2243639-C* se asocia con riesgo. Las asociaciones haplotípicas son débiles y no superan las correcciones estadísticas.

Los pacientes con cromosomas que contienen el alelo *rs721917-C* del gen *SFTPD* tienen menores valores de porcentaje de FEV₁ en aquéllos con ASA y con AAP. La asociación más significativa relaciona el alelo *rs723192-T* con menores niveles de FEV₁ en individuos con AAP, aunque el mayor impacto sobre el porcentaje de FEV₁ lo ejerce el alelo *rs1885551-G*.

Los pacientes con AAP, sometidos a tratamiento, tienen menor concentración de SP-D en el suero que los sujetos de la PGE y los pacientes con ASA. El mayor impacto sobre la disminución de la concentración sérica de SP-D en pacientes con ASA lo ejerce el alelo *rs1885551-G* del gen *SFTPD* mientras en la PGE lo hace el alelo *rs723192-T*.

Los cromosomas con el alelo *rs721917-C* tienen menores niveles de SP-D, tanto en el grupo de los pacientes con AAP como en el grupo de pacientes con ASA. La correlación entre el porcentaje de FEV₁ y la SP-D sérica es directa en los pacientes no fumadores con AAP que presentan el genotipo *rs721917-CC*.

Nuestros resultados indican que, principalmente, variantes en *SFTPD* son las que influyen en la gravedad del asma en pacientes con alergia a los ácaros domésticos.

CONCLUSIONES

Dado el impacto que poseen en nuestra sociedad las tres enfermedades incluidas en el estudio, las posibles implicaciones de esta investigación son potencialmente útiles. Se trata de enfermedades pulmonares muy prevalentes que pueden acarrear consecuencias graves para la vida del individuo que las sufre. Aportar mayor conocimiento acerca de los mecanismos implicados en estas entidades es trascendente para futuros tratamientos o métodos de prevención.

Es probable que los mecanismos que implican la función y la regulación de la SP-A y la SP-D en las enfermedades humanas se superpongan o difieran dependiendo del contexto fisiológico o trastorno asociado con cada enfermedad en particular. Esto se debe a que se producen variaciones en las interacciones de la SP-A y de la SP-D con los mismos o diferentes patógenos y/o las diversas moléculas que intervienen en la modulación de la respuesta inflamatoria.

Las variantes genéticas asociadas a la protección frente a los fenotipos específicamente estudiados en esta Tesis Doctoral tienen cabida en un área de la Biomedicina que está desarrollándose actualmente, la personalización aplicada avanzada y/o la genómica personalizada. Tras la reproducción de estos hallazgos en otras poblaciones, e investigaciones más profundas, los resultados obtenidos pueden ayudar a identificar a aquellos individuos más susceptibles a la enfermedad grave, lo que supondría una mejora en el manejo de la enfermedad.

La investigación biomédica puede no tener aplicaciones comercializables a corto plazo, pero a medio o largo plazo permite una considerable mejora en la salud y en la calidad de vida de la población y, en consecuencia, un impacto sobre la actividad económica. Los resultados de nuestros estudios pueden ayudar al diseño de ensayos clínicos dirigidos a

analizar terapias biológicas de la terapia pulmonar basada en la administración de surfactante exógeno en la infección respiratoria grave o el asma alérgico, así como a la identificación de aquellos individuos que presentan variantes genéticas asociadas como factor de riesgo y que se podrían beneficiar en el futuro de tratamientos y medidas preventivas específicas (medicina personalizada y farmacogenómica).

Uno de los principales retos en el campo de las ciencias y la salud es seguir avanzando en la traslación de resultados entre la investigación y la sanidad asistencial (investigación biosanitaria). En la evolución, el rasgo que tiene valor adaptativo permite al individuo sobrevivir y reproducirse. Esto se consideraría el éxito. La actual velocidad en el flujo de información hace que se impongan nuevas maneras de investigar, siendo esencial la integración y verificación de toda la información disponible, el éxito podría considerarse si se ha aportado una investigación que en el futuro se pueda aplicar para mejorar el manejo de la gravedad de algunas enfermedades pulmonares.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Salmi Q A, Walter J N, Colasurdo G N, Sockrider M M, Smith E O, Takahashi H, Fan L L. Serum KL-6 and surfactant proteins A and D in pediatric interstitial lung disease. *Chest* 2005; 127(1): 403-407.
- Albright F S, Orlando P, Pavia A T, Jackson G G, Cannon Albright L A. Evidence for a heritable predisposition to death due to influenza. *J Infect Dis* 2008; 197(1): 18-24.
- Alcais A, Abel L, Casanova J L. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J Clin Invest* 2009; 119(9): 2506-2514.
- Ampuero S, Luchsinger V, Tapia L, Palomino M A, Larranaga C E. SP-A1, SP-A2 and SP-D gene polymorphisms in severe acute respiratory syncytial infection in Chilean infants. *Infect Genet Evol* 2011; 11(6): 1368-1377.
- Arai Y, Obinata K, Sato Y, Hisata K, Tadokoro R, Tawa T, Kinoshita K. Clinical significance of the serum surfactant protein D and KL-6 levels in patients with measles complicated by interstitial pneumonia. *Eur J Pediatr* 2001; 160(7): 425-429.
- Arnedo-Pena A, Garcia-Marcos L, Carvajal U, I, Busquets M R, Morales Suarez-Varela M, Miner C, I, Batlles G J, Blanco Q A, Lopez-Silvarrey V A, Garcia H G, Aguinaga O, I, Gonzalez D C. [Air pollution and recent symptoms of asthma, allergic rhinitis, and atopic eczema in schoolchildren aged between 6 and 7 years]. *Arch Bronconeumol* 2009; 45(5): 224-229.
- Ashutosh K. Nitric oxide and asthma: a review. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6(1): 21-25.
- Augusto L A, Synguelakis M, Johansson J, Pedron T, Girard R, Chaby R. Interaction of pulmonary surfactant protein C with CD14 and lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2003; 71(1): 61-67.
- Aujla S J, Alcorn J F. T(H)17 cells in asthma and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1810(11): 1066-1079.
- Avery M E. Prevention of hyaline membrane disease. *Pediatrics* 1972; 50(4): 513-514.
- Avery M E, Frank N R, Gribetz I. The inflationary force produced by pulmonary vascular distention in excised lungs; the possible relation of this force to that needed to inflate the lungs at birth. *J Clin Invest* 1959; 38(3): 456-462.
- Avery O T, Macleod C M, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* 1944; 79(2): 137-158.
- Barrett J C, Fry B, Maller J, Daly M J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21(2): 263-265.
- Bateman E D, Hurd S S, Barnes P J, Bousquet J, Drazen J M, FitzGerald M, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen S E, Pizzichini E, Sullivan S D, Wenzel S E, Zar H J. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008; 31(1): 143-178.
- Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper S A, Shaw M, Uyeki T M, Zaki S R, Hayden F G, Hui D S, Kettner J D, Kumar A, Lim M, Shindo N, Penn C, Nicholson K G. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med* 2010; 362(18): 1708-1719.
- Bejvl I, Weseslindtner L, Strassl R, Jaksch P, Kundi M, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Analysis of plasma surfactant protein D levels in lung transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2013; 15(6): 645-651.
- Berg K K, Madsen H O, Garred P, Wiseth R, Gunnes S, Videm V. The additive contribution from inflammatory genetic markers on the severity of cardiovascular disease. *Scand J Immunol* 2009; 69(1): 36-42.
- Berman H M, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat T N, Weissig H, Shindyalov I N, Bourne P E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(1): 235-242.
- Bernard G R, Artigas A, Brigham K L, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall J R, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(3 Pt 1): 818-824.

- Bone R C, Balk R A, Cerra F B, Dellinger R P, Fein A M, Knaus W A, Schein R M, Sibbald W J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 1992; 101(6): 1644-1655.
- Boni M F. Vaccination and antigenic drift in influenza. Vaccine 2008; 26 Suppl 3: C8-14.
- Bont L, Steijn M, Van Aalderen W M, Brus F, Th Draaisma J M, Van Diemen-Steen Voorde R A, Pekelharing-Berghuis M, Kimpfen J L. Seasonality of long term wheezing following respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. Thorax 2004; 59(6): 512-516.
- Borron P, McIntosh J C, Korfhagen T R, Whitsett J A, Taylor J, Wright J R. Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000; 278(4): L840-L847.
- Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, Clements J, Carlson E, Gillespie A M, Epstein C, Hawgood S. Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(20): 11869-11874.
- Bousquet J, Khaltaev N F, Cruz AA F A U, Denburg J F, Fokkens WJ F A U, Togias A F, Zuberbier T F, Baena-Cagnani CE FAU - Canonica, Canonica GW FAU - van Weel, van Weel C F, Agache I F, Ait-Khaled N F, Bachert C F, Blaiss MS F A U, Bonini S FAU - Boulet, Boulet LP F A U, Bousquet PJ F A U, Camargos P F, Carlsen KH F A U, Chen Y F, Custovic A F, Dahl R F, Demoly P F, Douagui H F, Durham SR FAU - van Wijk, van Wijk RG FAU - Kalayci, Kalayci O F, Kaliner MA F A U, Kim YY F A U, Kowalski ML F A U, Kuna P F, Le LT F A U, Lemiere C F, Li J F, Lockey RF FAU - Mavale-Manuel, Mavale-Manuel S FAU - Meltzer, Meltzer EO F A U, Mohammad Y F, Mullol J F, Naclerio R F, O'Hehir RE F A U, Ohta K F, Ouedraogo S FAU - Palkonen, Palkonen S FAU - Papadopoulos, Papadopoulos N F, Passalacqua G F, Pawankar R F, Popov TA F A U, Rabe KF FAU - Rosado-Pinto, Rosado-Pinto J F, Scadding GK F A U, Simons FE F A U, Toskala E FAU - Valovirta, Valovirta E FAU - van Cauwenberge, van Cauwenberge P F, Wang DY F A U, Wickman M F, Yawn BP F A U, Yorgancioglu A F, Yusuf OM F A U, Zar H F, Annesi-Maesano I F, Bateman ED FAU - Ben Kheder, Ben Kheder A F, Boakye DA F A U, Bouchard J F, Burney P F, Busse WW FAU - Chan-Yeung, Chan-Yeung M F, Chavannes NH F A U, Chuchalin A F, Dolen WK F A U, Emuzyte R F, Grouse L F, Humbert M F, Jackson C F, Johnston SL F A U, Keith PK F A U, Kemp JP F A U, Klossek JM FAU - Larenas-Linnemann, Larenas-Linnemann D F, Lipworth B F, Malo JL F A U, Marshall GD F A U, Nasipit C F, Nekam K F, Niggemann B F, Nizankowska-Mogilnicka E FAU - Okamoto, Okamoto Y F, Orru MP F A U, Potter P F, Price D F, Stoloff SW F A U, Vandenplas O F, Viegi G F, Williams D. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). Allergy 2008;(1398-9995 (Electronic)).
- Bousquet J, Mantzouranis E, Cruz A A, Ait-Khaled N, Baena-Cagnani C E, Bleecker E R, Brightling C E, Burney P, Bush A, Busse W W, Casale T B, Chan-Yeung M, Chen R, Chowdhury B, Chung K F, Dahl R, Drazen J M, Fabbri L M, Holgate S T, Kauffmann F, Haahtela T, Khaltaev N, Kiley J P, Masjedi M R, Mohammad Y, O'Byrne P, Partridge M R, Rabe K F, Togias A, van W C, Wenzel S, Zhong N, Zuberbier T. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. J Allergy Clin Immunol 2010; 126(5): 926-938.
- Brandt E B, Mingler M K, Stevenson M D, Wang N, Khurana Hershey G K, Whitsett J A, Rothenberg M E. Surfactant protein D alters allergic lung responses in mice and human subjects. J Allergy Clin Immunol 2008; 121(5): 1140-1147.
- Bratcher P E, Weathington N M, Nick H J, Jackson P L, Snelgrove R J, Gaggar A. MMP-9 cleaves SP-D and abrogates its innate immune functions in vitro. PLoS One 2012; 7(7): e41881.
- Brauer L, Kindler C, Jager K, Sel S, Nolle B, Pleyer U, Ochs M, Paulsen F P. Detection of surfactant proteins A and D in human tear fluid and the human lacrimal system. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48(9): 3945-3953.
- Brauer L, Moschter S, Beileke S, Jager K, Garreis F, Paulsen F P. Human parotid and submandibular glands express and secrete surfactant proteins A, B, C and D. Histochem Cell Biol 2009; 132(3): 331-338.
- Brauer L, Schicht M, Stengl C, Heinemann F, Gotz W, Scholz M, Paulsen F. Detection of surfactant proteins A, B, C, and D in human gingiva and saliva. Biomed Tech (Berl) 2012; 57(1): 59-64.
- Breij E C, Batenburg J J. Surfactant protein D/anti-Fc receptor bifunctional proteins as a tool to enhance host defence. Expert Opin Biol Ther 2008; 8(4): 409-419.
- Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E, Picard C, Puel A, Abel L, Casanova J L. Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. Curr Opin Immunol 2008; 20(1): 39-48.
- Caballero-Martinez F. Alergologica 2005. Methodological aspects and sample characteristics of the study. J Invest Allergol Clin Immunol 2009; 19 Suppl 2: 2-6.

- Cates E C, Fattouh R, Johnson J R, Llop-Guevara A, Jordana M. Modeling responses to respiratory house dust mite exposure. *Contrib Microbiol* 2007; 14: 42-67.
- Cheng O Z, Palaniyar N. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front Immunol* 2013; 4: 1.
- Choi E H, Ehrmantraut M, Foster C B, Moss J, Chanock S J. Association of common haplotypes of surfactant protein A1 and A2 (SFTPA1 and SFTPA2) genes with severity of lung disease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41(3): 255-262.
- Claireaux A E. Hyaline membrane in the neonatal lung. *Lancet* 1953; 265(6789): 749-753.
- Cooley J, McDonald B, Accurso F J, Crouch E C, Remold-O'Donnell E. Patterns of neutrophil serine protease-dependent cleavage of surfactant protein D in inflammatory lung disease. *J Leukoc Biol* 2008; 83(4): 946-955.
- Crouch E, Wright J R. Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 521-554.
- Crouch E C. Collectins and pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19(2): 177-201.
- Crouch E C, Hirche T O, Shao B, Boxio R, Wartelle J, Benabid R, McDonald B, Heinecke J, Matalon S, Belaouaj A. Myeloperoxidase-dependent inactivation of surfactant protein D in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2010; 285(22): 16757-16770.
- Deb R, Shakib F, Reid K, Clark H. Major house dust mite allergens *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 and *Dermatophagoides farinae* 1 degrade and inactivate lung surfactant proteins A and D. *J Biol Chem* 2007; 282(51): 36808-36819.
- Dellinger R P, Levy M M, Carlet J M, Bion J, Parker M M, Jaeschke R, Reinhart K, Angus D C, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut J F, Gerlach H, Harvey M, Marini J J, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson B T, Townsend S, Vender J S, Zimmerman J L, Vincent J L. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med* 2008; 34(1): 17-60.
- deMello D E, Lin Z. Pulmonary alveolar proteinosis: a review. *Pediatr Pathol Mol Med* 2001; 20(5): 413-432.
- Deng Y, Chen S, Chen J, Tao Z, Kong Y, Xu Y, Xiao B, He Q. Relationship between surfactant protein A polymorphisms and allergic rhinitis in a Chinese Han population. *Mol Biol Rep* 2011; 38(3): 1475-1482.
- Deng Y Q, Tao Z Z, Kong Y G, Xiao B K, Chen S M, Xu Y, Wang Y, He Q. Association between single nucleotide polymorphisms of surfactant protein D and allergic rhinitis in Chinese patients. *Tissue Antigens* 2009; 73(6): 546-552.
- DiAngelo S, Lin Z, Wang G, Phillips S, Ramet M, Luo J, Floros J. Novel, non-radioactive, simple and multiplex PCR-cRFLP methods for genotyping human SP-A and SP-D marker alleles. *Dis Markers* 1999; 15(4): 269-281.
- Doss M, White M R, Tecle T, Gantz D, Crouch E C, Jung G, Ruchala P, Waring A J, Lehrer R I, Hartshorn K L. Interactions of alpha-, beta-, and theta-defensins with influenza A virus and surfactant protein D. *J Immunol* 2009; 182(12): 7878-7887.
- Douda D N, Jackson R, Grasemann H, Palaniyar N. Innate immune collectin surfactant protein D simultaneously binds both neutrophil extracellular traps and carbohydrate ligands and promotes bacterial trapping. *J Immunol* 2011; 187(4): 1856-1865.
- Driscoll P. Gray's Anatomy, 39th Edition. *Emerg Med J* 2006; 23(6): 492.
- Ehrenfeld P, Matus C E, Pavicic F, Toledo C, Nualart F, Gonzalez C B, Burgos R A, Bhoola K D, Figueroa C D. Kinin B1 receptor activation turns on exocytosis of matrix metalloprotease-9 and myeloperoxidase in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase family. *J Leukoc Biol* 2009; 86(5): 1179-1189.
- Eickhoff P, Valipour A, Kiss D, Schreder M, Cekici L, Geyer K, Kohansal R, Burghuber O C. Determinants of systemic vascular function in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178(12): 1211-1218.
- El Saleeby C M, Li R, Somes G W, Dahmer M K, Quasney M W, DeVincenzo J P. Surfactant protein A2 polymorphisms and disease severity in a respiratory syncytial virus-infected population. *J Pediatr* 2010; 156(3): 409-414.
- Engstrom G, Lindberg C, Gerhardsson d, V, Nihlen U, Anderson M, Svartengren M, Forsman-Semb K. Blood biomarkers and measures of pulmonary function--a study from the Swedish twin registry. *Respir Med* 2012; 106(9): 1250-1257.

- Enhoring G, Grossmann G, Robertson B. Pharyngeal deposition of surfactant in the premature rabbit fetus. *Biol Neonate* 1973; 22(1): 126-132.
- Erpenbeck V J, Schmidt R, Gunther A, Krug N, Hohlfeld J M. Surfactant protein levels in bronchoalveolar lavage after segmental allergen challenge in patients with asthma. *Allergy* 2006; 61(5): 598-604.
- Erwin E A, Custis N, Ronmark E, Wickens K, Sporik R, Woodfolk J A, Platts-Mills T A. Asthma and indoor air: contrasts in the dose response to cat and dust-mite. *Indoor Air* 2005; 15 Suppl 10: 33-39.
- Ferguson J S, Voelker D R, McCormack F X, Schlesinger L S. Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J Immunol* 1999; 163(1): 312-321.
- Fine M J, Auble T E, Yealy D M, Hanusa B H, Weissfeld L A, Singer D E, Coley C M, Marrie T J, Kapoor W N. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997; 336(4): 243-250.
- Flicek P, Amode M R, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fitzgerald S, Gil L, Giron C G, Gordon L, Hourlier T, Hunt S, Johnson N, Juettemann T, Kahari A K, Keenan S, Kulesha E, Martin F J, Maurel T, McLaren W M, Murphy D N, Nag R, Overduin B, Pignatelli M, Pritchard B, Pritchard E, Riat H S, Ruffier M, Sheppard D, Taylor K, Thormann A, Trevanion S J, Vullo A, Wilder S P, Wilson M, Zadissa A, Aken B L, Birney E, Cunningham F, Harrow J, Herrero J, Hubbard T J, Kinsella R, Muffato M, Parker A, Spudich G, Yates A, Zerbino D R, Searle S M. Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(Database issue): D749-D755.
- Floros J, Hoover R R. Genetics of the hydrophilic surfactant proteins A and D. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1408(2-3): 312-322.
- Floros J, Kala P. Surfactant proteins: molecular genetics of neonatal pulmonary diseases. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 365-384.
- Floros J, Lin H M, Garcia A, Salazar M A, Guo X, DiAngelo S, Montano M, Luo J, Pardo A, Selman M. Surfactant protein genetic marker alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population. *J Infect Dis* 2000; 182(5): 1473-1478.
- Floros J, Phelps D S. Pulmonary surfactant. In: Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997; Yaksh TL, *et al.* (eds): *Anesthesia: Biologic Foundations*.
- Floros J, Wang G. A point of view: quantitative and qualitative imbalance in disease pathogenesis; pulmonary surfactant protein A genetic variants as a model. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 129(1): 295-303.
- Floros J, Wang G, Mikerov A N. Genetic complexity of the human innate host defense molecules, surfactant protein A1 (SP-A1) and SP-A2--impact on function. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009; 19(2): 125-137.
- Foreman M G, Kong X, DeMeo D L, Pillai S G, Hersh C P, Bakke P, Gulsvik A, Lomas D A, Litonjua A A, Shapiro S D, Tal-Singer R, Silverman E K. Polymorphisms in surfactant protein-D are associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 44(3): 316-322.
- Fournier B, Andargachew R, Robin A Z, Laur O, Voelker D R, Lee W Y, Weber D, Parkos C A. Surfactant protein D (Sp-D) binds to membrane-proximal domain (D3) of signal regulatory protein alpha (SIRPalpha), a site distant from binding domain of CD47, while also binding to analogous region on signal regulatory protein beta (SIRPbeta). *J Biol Chem* 2012; 287(23): 19386-19398.
- Frazer K A, Murray S S, Schork N J, Topol E J. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 2009; 10(4): 241-251.
- Friedlander S L, Busse W W. The role of rhinovirus in asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(2): 267-273.
- Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet* 1980; 1(8159): 55-59.
- Garcia-Laorden M I, Rodriguez de C F, Sole-Violan J, Rajas O, Blanquer J, Borderias L, Aspa J, Briones M L, Saavedra P, Marcos-Ramos J A, Gonzalez-Quevedo N, Sologuren I, Herrera-Ramos E, Ferrer J M, Rello J, Rodriguez-Gallego C. Influence of genetic variability at the surfactant proteins A and D in community-acquired pneumonia: a prospective, observational, genetic study. *Crit Care* 2011; 15(1): R57.
- Garcia-Verdugo I, Wang G, Floros J, Casals C. Structural analysis and lipid-binding properties of recombinant human surfactant protein a derived from one or both genes. *Biochemistry* 2002; 41(47): 14041-14053.

- Gardai S J, Xiao Y Q, Dickinson M, Nick J A, Voelker D R, Greene K E, Henson P M. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* 2003; 115(1): 13-23.
- Gatherer D. The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *J Clin Virol* 2009; 45(3): 174-178.
- Gaynor C D, McCormack F X, Voelker D R, McGowan S E, Schlesinger L S. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol* 1995; 155(11): 5343-5351.
- Geertsma M F, Nibbering P H, Haagsman H P, Daha M R, van F R. Binding of surfactant protein A to C1q receptors mediates phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by monocytes. *Am J Physiol* 1994; 267(5 Pt 1): L578-L584.
- Gentleman R C, Carey V J, Bates D M, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini A J, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang J Y, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; 5(10): R80.
- Giannoni E, Sawa T, Allen L, Wiener-Kronish J, Hawgood S. Surfactant proteins A and D enhance pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34(6): 704-710.
- Gil M, McCormack F X, LeVine A M. Surfactant protein A modulates cell surface expression of CR3 on alveolar macrophages and enhances CR3-mediated phagocytosis. *J Biol Chem* 2009; 284(12): 7495-7504.
- Glasser S W, Burhans M S, Korfhagen T R, Na C L, Sly P D, Ross G F, Ikegami M, Whitsett J A. Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(11): 6366-6371.
- Greene K E, Wright J R, Steinberg K P, Ruzinski J T, Caldwell E, Wong W B, Hull W, Whitsett J A, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson L D, Martin T R. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(6): 1843-1850.
- Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 1999; 13(6): 1455-1476.
- Guillot L, Balloy V, McCormack F X, Golenbock D T, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2002; 168(12): 5989-5992.
- Guo C J, Atochina-Vasserman E N, Abramova E, Foley J P, Zaman A, Crouch E, Beers M F, Savani R C, Gow A J. S-nitrosylation of surfactant protein-D controls inflammatory function. *PLoS Biol* 2008; 6(11): e266.
- Gutmacher A E, Collins F S. Genomic medicine--a primer. *N Engl J Med* 2002; 347(19): 1512-1520.
- Gutmacher A E, McGuire A L, Ponder B, Stefansson K. Personalized genomic information: preparing for the future of genetic medicine. *Nat Rev Genet* 2010; 11(2): 161-165.
- Haczku A. Protective role of the lung collectins surfactant protein A and surfactant protein D in airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122(5): 861-879.
- Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart M A, Germain R N, Lambrecht B N. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 2009; 15(4): 410-416.
- Hartshorn K L, Crouch E, White M R, Colamussi M L, Kakkanatt A, Tauber B, Shepherd V, Sastry K N. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *Am J Physiol* 1998; 274(6 Pt 1): L958-L969.
- Hartshorn K L, White M R, Crouch E C. Contributions of the N- and C-terminal domains of surfactant protein d to the binding, aggregation, and phagocytic uptake of bacteria. *Infect Immun* 2002; 70(11): 6129-6139.
- Hawgood S, Ochs M, Jung A, Akiyama J, Allen L, Brown C, Edmondson J, Levitt S, Carlson E, Gillespie A M, Villar A, Epstein C J, Poulain F R. Sequential targeted deficiency of SP-A and -D leads to progressive alveolar lipoproteinosis and emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283(5): L1002-L1010.
- Hawgood S, Poulain F R. The pulmonary collectins and surfactant metabolism. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 495-519.
- Henderson J, Hilliard T N, Sherriff A, Stalker D, Al S N, Thomas H M. Hospitalization for RSV bronchiolitis before 12 months of age and subsequent asthma, atopy and wheeze: a longitudinal birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16(5): 386-392.
- Herrera-Ramos E, Lopez-Rodriguez M, Ruiz-Hernandez J J, Horcajada J P, Borderias L, Lerma E, Blanquer J, Perez-Gonzalez M C, Garcia-Laorden M I, Florido Y, Mas-Bosch V, Montero M, Ferrer J M, Sorli L, Vilaplana C, Rajas O,

- Briones M, Aspa J, Lopez-Granados E, Sole-Violan J, de Castro F R, Rodriguez-Gallego C. Surfactant protein A genetic variants associate with severe respiratory insufficiency in pandemic influenza A virus infection. *Crit Care* 2014; 18(3): R127.
- Hickling T P, Clark H, Malhotra R, Sim R B. Collectins and their role in lung immunity. *J Leukoc Biol* 2004; 75(1): 27-33.
- Hickling T P, Malhotra R, Sim R B. Human lung surfactant protein A exists in several different oligomeric states: oligomer size distribution varies between patient groups. *Mol Med* 1998; 4(4): 266-275.
- Holmskov U, Mollenhauer J, Madsen J, Vitved L, Gronlund J, Tornoe I, Kliem A, Reid K B, Poustka A, Skjodt K. Cloning of gp-340, a putative opsonin receptor for lung surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(19): 10794-10799.
- Holmskov U, Thiel S, Jensenius J C. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 547-578.
- Horby P, Nguyen N Y, Dunstan S J, Baillie J K. The role of host genetics in susceptibility to influenza: a systematic review. *PLoS One* 2012; 7(3): e33180.
- Huang W, Wang G, Phelps D S, Al-Mondhry H, Floros J. Human SP-A genetic variants and bleomycin-induced cytokine production by THP-1 cells: effect of ozone-induced SP-A oxidation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286(3): L546-L553.
- Ikegami M, Whitsett J A, Jobe A, Ross G, Fisher J, Korfhagen T. Surfactant metabolism in SP-D gene-targeted mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(3): L468-L476.
- Iraola V, Fernández-Caldas E. *Mapa Acarológico de España*. Elsevier España SL, 2009.
- Ishii H, Mukae H, Kadota J, Kaida H, Nagata T, Abe K, Matsukura S, Kohno S. High serum concentrations of surfactant protein A in usual interstitial pneumonia compared with non-specific interstitial pneumonia. *Thorax* 2003; 58(1): 52-57.
- Ishii T, Hagiwara K, Ikeda S, Arai T, Mieno M N, Kumasaka T, Muramatsu M, Sawabe M, Gemma A, Kida K. Association between genetic variations in surfactant protein d and emphysema, interstitial pneumonia, and lung cancer in a Japanese population. *COPD* 2012a; 9(4): 409-416.
- Ishii T, Hagiwara K, Kamio K, Ikeda S, Arai T, Mieno M N, Kumasaka T, Muramatsu M, Sawabe M, Gemma A, Kida K. Involvement of surfactant protein D in emphysema revealed by genetic association study. *Eur J Hum Genet* 2012b; 20(2): 230-235.
- Jack D L, Cole J, Naylor S C, Borrow R, Kaczmarek E B, Klein N J, Read R C. Genetic polymorphism of the binding domain of surfactant protein-A2 increases susceptibility to meningococcal disease. *Clin Infect Dis* 2006; 43(11): 1426-1433.
- Jakel A, Clark H, Reid K B, Sim R B. Surface-bound myeloperoxidase is a ligand for recognition of late apoptotic neutrophils by human lung surfactant proteins A and D. *Protein Cell* 2010; 1(6): 563-572.
- Janssen W J, McPhillips K A, Dickinson M G, Linderman D J, Morimoto K, Xiao Y Q, Oldham K M, Vandivier R W, Henson P M, Gardai S J. Surfactant proteins A and D suppress alveolar macrophage phagocytosis via interaction with SIRP alpha. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178(2): 158-167.
- Jobe A H. An unknown: lung growth and development after very preterm birth. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(12 Pt 1): 1529-1530.
- John R J, Rusznak C, Ramjee M, Lamont A G, Abrahamson M, Hewitt E L. Functional effects of the inhibition of the cysteine protease activity of the major house dust mite allergen Der p 1 by a novel peptide-based inhibitor. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(6): 784-793.
- Kantyka T, Pyrc K, Gruca M, Smagur J, Plaza K, Guzik K, Zeglen S, Ochman M, Potempa J. Staphylococcus aureus proteases degrade lung surfactant protein A potentially impairing innate immunity of the lung. *J Innate Immun* 2013; 5(3): 251-260.
- Karjalainen M K, Huusko J M, Tuohimaa A, Luukkonen A, Haataja R, Hallman M. A study of collectin genes in spontaneous preterm birth reveals an association with a common surfactant protein D gene polymorphism. *Pediatr Res* 2012; 71(1): 93-99.
- Karolchik D, Barber G P, Casper J, Clawson H, Cline M S, Diekhans M, Dreszer T R, Fujita P A, Guruvadoo L, Haeussler M, Harte R A, Heitner S, Hinrichs A S, Learned K, Lee B T, Li C H, Raney B J, Rhead B, Rosenbloom K

- R, Sloan C A, Speir M L, Zweig A S, Haussler D, Kuhn R M, Kent W J. The UCSC Genome Browser database: 2014 update. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(Database issue): D764-D770.
- Kent W J, Sugnet C W, Furey T S, Roskin K M, Pringle T H, Zahler A M, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002; 12(6): 996-1006.
- Keynan Y, Malik S, Fowke K R. The role of polymorphisms in host immune genes in determining the severity of respiratory illness caused by pandemic H1N1 influenza. *Public Health Genomics* 2013; 16(1-2): 9-16.
- Kim D K, Cho M H, Hersh C P, Lomas D A, Miller B E, Kong X, Bakke P, Gulsvik A, Agusti A, Wouters E, Celli B, Coxson H, Vestbo J, Macnee W, Yates J C, Rennard S, Litonjua A, Qiu W, Beaty T H, Crapo J D, Riley J H, Tal-Singer R, Silverman E K. Genome-wide association analysis of blood biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186(12): 1238-1247.
- Kim G, Weiss S J, Levine R L. Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840(2): 901-905.
- Kishore U, Greenhough T J, Waters P, Shrive A K, Ghai R, Kamran M F, Bernal A L, Reid K B, Madan T, Chakraborty T. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 2006; 43(9): 1293-1315.
- Koopmans J G, van der Zee J S, Krop E J, Lopuhaa C E, Jansen H M, Batenburg J J. Serum surfactant protein D is elevated in allergic patients. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(12): 1827-1833.
- Krueger M, Puthothu B, Gropp E, Heinze J, Braun S, Heinzmann A. Amino acid variants in Surfactant protein D are not associated with bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17(1): 77-81.
- Kruglyak L, Nickerson D A. Variation is the spice of life. *Nat Genet* 2001; 27(3): 234-236.
- Kuan S F, Rust K, Crouch E. Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides. Surfactant protein D is an *Escherichia coli*-binding protein in bronchoalveolar lavage. *J Clin Invest* 1992; 90(1): 97-106.
- Kuhl A, Melberg A, Meinel E, Nurnberg G, Nurnberg P, Kehrer-Sawatzki H, Jenne D E. Myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy 7: corroboration and narrowing of the critical region on 10q22.3. *Eur J Hum Genet* 2008; 16(3): 367-373.
- Kusel M M, de Klerk N H, Kebadze T, Vohma V, Holt P G, Johnston S L, Sly P D. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(5): 1105-1110.
- Lahti M, Lofgren J, Marttila R, Renko M, Kilaavuniemi T, Haataja R, Ramet M, Hallman M. Surfactant protein D gene polymorphism associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Res* 2002; 51(6): 696-699.
- Lambrecht B N, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med* 2012; 18(5): 684-692.
- Lange P. Persistent airway obstruction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187(1): 1-2.
- Lecaille F, Naudin C, Sage J, Joulin-Giet A, Courty A, Andrault P M, Veldhuizen R A, Possmayer F, Lalmanach G. Specific cleavage of the lung surfactant protein A by human cathepsin S may impair its antibacterial properties. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(8): 1701-1709.
- Leth-Larsen R, Garred P, Jensenius H, Meschi J, Hartshorn K, Madsen J, Tornøe I, Madsen H O, Sørensen G, Crouch E, Holmskov U. A common polymorphism in the SFTPD gene influences assembly, function, and concentration of surfactant protein D. *J Immunol* 2005; 174(3): 1532-1538.
- Leth-Larsen R, Nordenbaek C, Tornøe I, Moeller V, Schlosser A, Koch C, Teisner B, Junker P, Holmskov U. Surfactant protein D (SP-D) serum levels in patients with community-acquired pneumonia. *Clin Immunol* 2003; 108(1): 29-37.
- LeVine A M, Hartshorn K, Elliott J, Whitsett J, Korfhagen T. Absence of SP-A modulates innate and adaptive defense responses to pulmonary influenza infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(3): L563-L572.
- LeVine A M, Whitsett J A. Pulmonary collectins and innate host defense of the lung. *Microbes Infect* 2001; 3(2): 161-166.
- LeVine A M, Whitsett J A, Hartshorn K L, Crouch E C, Korfhagen T R. Surfactant protein D enhances clearance of influenza A virus from the lung in vivo. *J Immunol* 2001; 167(10): 5868-5873.

- Li G, Siddiqui J, Hendry M, Akiyama J, Edmondson J, Brown C, Allen L, Levitt S, Poulain F, Hawgood S. Surfactant protein-A--deficient mice display an exaggerated early inflammatory response to a beta-resistant strain of influenza A virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26(3): 277-282.
- Li L, Zhang J, Diao W, Wang D, Wei Y, Zhang C Y, Zen K. MicroRNA-155 and MicroRNA-21 promote the expansion of functional myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2014; 192(3): 1034-1043.
- Lin K W, Jen K Y, Suarez C J, Crouch E C, Perkins D L, Finn P W. Surfactant protein D-mediated decrease of allergen-induced inflammation is dependent upon CTLA4. *J Immunol* 2010; 184(11): 6343-6349.
- Litvack M L, Palaniyar N. Review: Soluble innate immune pattern-recognition proteins for clearing dying cells and cellular components: implications on exacerbating or resolving inflammation. *Innate Immun* 2010; 16(3): 191-200.
- Liu C F, Chen Y L, Chang W T, Shieh C C, Yu C K, Reid K B, Wang J Y. Mite allergen induces nitric oxide production in alveolar macrophage cell lines via CD14/toll-like receptor 4, and is inhibited by surfactant protein D. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(12): 1615-1624.
- Liu J, Hu F, Liang W, Wang G, Singhal P C, Ding G. Polymorphisms in the surfactant protein a gene are associated with the susceptibility to recurrent urinary tract infection in chinese women. *Tohoku J Exp Med* 2010; 221(1): 35-42.
- Liu W, Bentley C M, Floros J. Study of human SP-A, SP-B and SP-D loci: allele frequencies, linkage disequilibrium and heterozygosity in different races and ethnic groups. *BMC Genet* 2003; 4: 13.
- Liu W, Ju C R, Chen R C, Liu Z G. Role of serum and induced sputum surfactant protein D in predicting the response to treatment in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Ther Med* 2014; 8(4): 1313-1317.
- Lofgren J, Ramet M, Renko M, Marttila R, Hallman M. Association between surfactant protein A gene locus and severe respiratory syncytial virus infection in infants. *J Infect Dis* 2002; 185(3): 283-289.
- Lomas D A, Silverman E K, Edwards L D, Locantore N W, Miller B E, Horstman D H, Tal-Singer R. Serum surfactant protein D is steroid sensitive and associated with exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 2009; 34(1): 95-102.
- Luna A, Nicodemus K K. snp.plotter: an R-based SNP/haplotype association and linkage disequilibrium plotting package. *Bioinformatics* 2007; 23(6): 774-776.
- Ma T, Liu X, Liu Z. Functional polymorphisms in surfactant protein genes and chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013; 17(12): 910-917.
- MacNeill C, Umstead T M, Phelps D S, Lin Z, Floros J, Shearer D A, Weisz J. Surfactant protein A, an innate immune factor, is expressed in the vaginal mucosa and is present in vaginal lavage fluid. *Immunology* 2004; 111(1): 91-99.
- Madan T, Kishore U, Singh M, Strong P, Clark H, Hussain E M, Reid K B, Sarma P U. Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by *Aspergillus fumigatus* antigens and allergens. *J Clin Invest* 2001; 107(4): 467-475.
- Madan T, Saxena S, Murthy K J, Muralidhar K, Sarma P U. Association of polymorphisms in the collagen region of human SP-A1 and SP-A2 genes with pulmonary tuberculosis in Indian population. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(10): 1002-1008.
- Madsen J, Kliem A, Tornøe I, Skjødtt K, Koch C, Holmskov U. Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol* 2000; 164(11): 5866-5870.
- Madsen J, Tornøe I, Nielsen O, Koch C, Steinhilber W, Holmskov U. Expression and localization of lung surfactant protein A in human tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29(5): 591-597.
- Malik S, Greenwood C M, Eguale T, Kifle A, Beyene J, Habte A, Tadesse A, Gebrexabher H, Britton S, Schurr E. Variants of the SFTPA1 and SFTPA2 genes and susceptibility to tuberculosis in Ethiopia. *Hum Genet* 2006; 118(6): 752-759.
- Mandell L A, Wunderink R G, Anzueto A, Bartlett J G, Campbell G D, Dean N C, Dowell S F, File T M, Jr., Musher D M, Niederman M S, Torres A, Whitney C G. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44 Suppl 2: S27-S72.
- Mariéncheck W I, Alcorn J F, Palmer S M, Wright J R. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(4): 528-537.

- McCormack F X. Structure, processing and properties of surfactant protein A. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1408(2-3): 109-131.
- Menendez R, Torres A, Aspa J, Capelastegui A, Prat C, Rodriguez de C F. Community acquired pneumonia. New guidelines of the Spanish Society of Chest Diseases and Thoracic Surgery (SEPAR). *Arch Bronconeumol* 2010; 46(10): 543-558.
- Mikarov A N, Umstead T M, Gan X, Huang W, Guo X, Wang G, Phelps D S, Floros J. Impact of ozone exposure on the phagocytic activity of human surfactant protein A (SP-A) and SP-A variants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008a; 294(1): L121-L130.
- Mikarov A N, Umstead T M, Huang W, Liu W, Phelps D S, Floros J. SP-A1 and SP-A2 variants differentially enhance association of *Pseudomonas aeruginosa* with rat alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288(1): L150-L158.
- Mikarov A N, Wang G, Umstead T M, Zacharatos M, Thomas N J, Phelps D S, Floros J. Surfactant protein A2 (SP-A2) variants expressed in CHO cells stimulate phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* more than do SP-A1 variants. *Infect Immun* 2007; 75(3): 1403-1412.
- Mikarov A N, White M, Hartshorn K, Wang G, Floros J. Inhibition of hemagglutination activity of influenza A viruses by SP-A1 and SP-A2 variants expressed in CHO cells. *Med Microbiol Immunol* 2008b; 197(1): 9-12.
- Murakami S, Iwaki D, Mitsuzawa H, Sano H, Takahashi H, Voelker D R, Akino T, Kuroki Y. Surfactant protein A inhibits peptidoglycan-induced tumor necrosis factor- α secretion in U937 cells and alveolar macrophages by direct interaction with toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 2002; 277(9): 6830-6837.
- Nadesalingam J, Bernal A L, Dodds A W, Willis A C, Mahoney D J, Day A J, Reid K B, Palaniyar N. Identification and characterization of a novel interaction between pulmonary surfactant protein D and decorin. *J Biol Chem* 2003; 278(28): 25678-25687.
- Nadesalingam J, Reid K B, Palaniyar N. Collectin surfactant protein D binds antibodies and interlinks innate and adaptive immune systems. *FEBS Lett* 2005; 579(20): 4449-4453.
- Namgung R, Lee C, Suh J S, Park K I, Han D G. Exogenous surfactant replacement therapy of hyaline membrane disease in premature infants. *Yonsei Med J* 1989; 30(4): 355-366.
- Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009; 459(7249): 931-939.
- Noah T L, Murphy P C, Alink J J, Leigh M W, Hull W M, Stahlman M T, Whitsett J A. Bronchoalveolar lavage fluid surfactant protein-A and surfactant protein-D are inversely related to inflammation in early cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168(6): 685-691.
- Nogee L M. Genetic mechanisms of surfactant deficiency. *Biol Neonate* 2004; 85(4): 314-318.
- O'Reilly M A, Nogee L, Whitsett J A. Requirement of the collagenous domain for carbohydrate processing and secretion of a surfactant protein, SP-A. *Biochim Biophys Acta* 1988; 969(2): 176-184.
- Ober C, Yao T C. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev* 2011; 242(1): 10-30.
- Oberley R E, Snyder J M. Recombinant human SP-A1 and SP-A2 proteins have different carbohydrate-binding characteristics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284(5): L871-L881.
- Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H, Abe M, Nishimura K, Hiwada K, Kohno N. Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(3): 378-381.
- Ohya M, Nishitani C, Sano H, Yamada C, Mitsuzawa H, Shimizu T, Saito T, Smith K, Crouch E, Kuroki Y. Human pulmonary surfactant protein D binds the extracellular domains of Toll-like receptors 2 and 4 through the carbohydrate recognition domain by a mechanism different from its binding to phosphatidylinositol and lipopolysaccharide. *Biochemistry* 2006; 45(28): 8657-8664.
- Olde Nordkamp M J, van E M, Urbanus R T, Bont L, Haagsman H P, Meyaard L. Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 is a novel inhibitory receptor for surfactant protein D. *J Leukoc Biol* 2014; 96(1): 105-111.
- Ou C Y, Chen C Z, Hsiue T R, Lin S H, Wang J Y. Genetic variants of pulmonary SP-D predict disease outcome of COPD in a Chinese population. *Respirology* 2015; 20(2): 296-303.

- Paananen R, Glumoff V, Hallman M. Surfactant protein A and D expression in the porcine Eustachian tube. *FEBS Lett* 1999; 452(3): 141-144.
- Pawankar R. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. *World Allergy Organ J* 2014; 7(1): 12.
- Pawankar R, Canonica G W, Holgate S T, Lockey R F. Allergic diseases and asthma: a major global health concern. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12(1): 39-41.
- Perez-Gil J, Weaver T E. Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology (Bethesda)* 2010; 25(3): 132-141.
- Persson A, Chang D, Rust K, Moxley M, Longmore W, Crouch E. Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein. *Biochemistry* 1989; 28(15): 6361-6367.
- Pettigrew M M, Gent J F, Zhu Y, Triche E W, Belanger K D, Holford T R, Bracken M B, Leaderer B P. Association of surfactant protein A polymorphisms with otitis media in infants at risk for asthma. *BMC Med Genet* 2006; 7: 68.
- Pettigrew M M, Gent J F, Zhu Y, Triche E W, Belanger K D, Holford T R, Bracken M B, Leaderer B P. Respiratory symptoms among infants at risk for asthma: association with surfactant protein A haplotypes. *BMC Med Genet* 2007; 8: 15.
- Pison U, Obertacke U, Brand M, Seeger W, Joka T, Bruch J, Schmit-Neuerburg K P. Altered pulmonary surfactant in uncomplicated and septicemia-complicated courses of acute respiratory failure. *J Trauma* 1990; 30(1): 19-26.
- Postle A D, Heeley E L, Wilton D C. A comparison of the molecular species compositions of mammalian lung surfactant phospholipids. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 129(1): 65-73.
- Pruim R J, Welch R P, Sanna S, Teslovich T M, Chines P S, Gliedt T P, Boehnke M, Abecasis G R, Willer C J. LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics* 2010; 26(18): 2336-2337.
- Pueyo N, Ortega F J, Mercader J M, Moreno-Navarrete J M, Sabater M, Bonas S, Botas P, Delgado E, Ricart W, Martínez-Larrad M T, Serrano-Rios M, Torrents D, Fernandez-Real J M. Common genetic variants of surfactant protein-D (SP-D) are associated with type 2 diabetes. *PLoS One* 2013; 8(4): e60468.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira M A, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker P I, Daly M J, Sham P C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81(3): 559-575.
- Puthothu B, Forster J, Heinze J, Heinzmann A, Krueger M. Surfactant protein B polymorphisms are associated with severe respiratory syncytial virus infection, but not with asthma. *BMC Pulm Med* 2007; 7: 6.
- Racine J S. RStudio: A Platform-Independent IDE for R and Sweave. *J Appl Econ* 2012; 27(1): 172-1255.
- Ramet M, Lofgren J, Alho O P, Hallman M. Surfactant protein-A gene locus associated with recurrent otitis media. *J Pediatr* 2001; 138(2): 266-268.
- Read R C, Fox A, Miller K, Gray T, Jones N, Borrows R, Jones D M, Finch R G. Experimental infection of human nasal mucosal explants with *Neisseria meningitidis*. *J Med Microbiol* 1995; 42(5): 353-361.
- Ricciardolo F L, Sterk P J, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 84(3): 731-765.
- Rodriguez A, Lisboa T, Blot S, Martin-Loeches I, Sole-Violan J, De M D, Rello J. Mortality in ICU patients with bacterial community-acquired pneumonia: when antibiotics are not enough. *Intensive Care Med* 2009; 35(3): 430-438.
- Rubio F, Cooley J, Accurso F J, Remold-O'Donnell E. Linkage of neutrophil serine proteases and decreased surfactant protein-A (SP-A) levels in inflammatory lung disease. *Thorax* 2004; 59(4): 318-323.
- Rubio S, Lacaze-Masmonteil T, Chailley-Heu B, Kahn A, Bourbon J R, Ducroc R. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) is expressed by epithelial cells of small and large intestine. *J Biol Chem* 1995; 270(20): 12162-12169.
- Sanchez-Barbero F, Rivas G, Steinhilber W, Casals C. Structural and functional differences among human surfactant proteins SP-A1, SP-A2 and co-expressed SP-A1/SP-A2: role of supratrimeric oligomerization. *Biochem J* 2007; 406(3): 479-489.

- Sano H, Chiba H, Iwaki D, Sohma H, Voelker D R, Kuroki Y. Surfactant proteins A and D bind CD14 by different mechanisms. *J Biol Chem* 2000; 275(29): 22442-22451.
- Saxena S, Kumar R, Madan T, Gupta V, Muralidhar K, Sarma P U. Association of polymorphisms in pulmonary surfactant protein A1 and A2 genes with high-altitude pulmonary edema. *Chest* 2005; 128(3): 1611-1619.
- Saxena S, Madan T, Shah A, Muralidhar K, Sarma P U. Association of polymorphisms in the collagen region of SP-A2 with increased levels of total IgE antibodies and eosinophilia in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(5): 1001-1007.
- Schaub B, Westlake R M, He H, Arestides R, Haley K J, Campo M, Velasco G, Bellou A, Hawgood S, Poulain F R, Perkins D L, Finn P W. Surfactant protein D deficiency influences allergic immune responses. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(12): 1819-1826.
- Schlosser A, Thomsen T, Shipley J M, Hein P W, Brasch F, Tornøe I, Nielsen O, Skjodt K, Palaniyar N, Steinhilber W, McCormack F X, Holmskov U. Microfibril-associated protein 4 binds to surfactant protein A (SP-A) and colocalizes with SP-A in the extracellular matrix of the lung. *Scand J Immunol* 2006; 64(2): 104-116.
- Seifart C, Lin H M, Seifart U, Plagens A, DiAngelo S, von W P, Floros J. Rare SP-A alleles and the SP-A1-6A(4) allele associate with risk for lung carcinoma. *Clin Genet* 2005; 68(2): 128-136.
- Selman M, Lin H M, Montano M, Jenkins A L, Estrada A, Lin Z, Wang G, DiAngelo S L, Guo X, Umstead T M, Lang C M, Pardo A, Phelps D S, Floros J. Surfactant protein A and B genetic variants predispose to idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet* 2003; 113(6): 542-550.
- Shakoori T A, Sin D D, Bokhari S N, Ghafoor F, Shakoori A R. SP-D polymorphisms and the risk of COPD. *Dis Markers* 2012; 33(2): 91-100.
- Sigurs N, Gustafsson P M, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, Kjellman B. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(2): 137-141.
- Silveyra P, Floros J. Genetic variant associations of human SP-A and SP-D with acute and chronic lung injury. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012; 17: 407-429.
- Sin D D, Pahlavan P S, Man S F. Surfactant protein D: a lung specific biomarker in COPD? *Ther Adv Respir Dis* 2008; 2(2): 65-74.
- Sorensen G L, Hjelmberg J V, Leth-Larsen R, Schmidt V, Fenger M, Poulain F, Hawgood S, Sorensen T I, Kyvik K O, Holmskov U. Surfactant protein D of the innate immune defence is inversely associated with human obesity and SP-D deficiency infers increased body weight in mice. *Scand J Immunol* 2006a; 64(6): 633-638.
- Sorensen G L, Hjelmberg J, Kyvik K O, Fenger M, Hoj A, Bendixen C, Sorensen T I, Holmskov U. Genetic and environmental influences of surfactant protein D serum levels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006b; 290(5): L1010-L1017.
- Sorensen G L, Hoegh S V, Leth-Larsen R, Thomsen T H, Floridon C, Smith K, Kejlum K, Tornøe I, Crouch E C, Holmskov U. Multimeric and trimeric subunit SP-D are interconvertible structures with distinct ligand interaction. *Mol Immunol* 2009; 46(15): 3060-3069.
- Sorensen T I, Nielsen G G, Andersen P K, Teasdale T W. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988; 318(12): 727-732.
- Strong P, Townsend P, Mackay R, Reid K B, Clark H W. A recombinant fragment of human SP-D reduces allergic responses in mice sensitized to house dust mite allergens. *Clin Exp Immunol* 2003; 134(2): 181-187.
- Sullivan S J, Jacobson R M, Dowdle W R, Poland G A. 2009 H1N1 influenza. *Mayo Clin Proc* 2010; 85(1): 64-76.
- Tagaram H R, Wang G, Umstead T M, Mikerov A N, Thomas N J, Graff G R, Hess J C, Thomassen M J, Kavuru M S, Phelps D S, Floros J. Characterization of a human surfactant protein A1 (SP-A1) gene-specific antibody; SP-A1 content variation among individuals of varying age and pulmonary health. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(5): L1052-L1063.
- Tanaka M, Arimura Y, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Sonoda T, Nomura M, Motoya S, Imai K, Shinomura Y. Genetic variants in surfactant, pulmonary-associated protein D (SFTPD) and Japanese susceptibility to ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15(6): 918-925.
- Taut F J, Rippin G, Schenk P, Findlay G, Wurst W, Hafner D, Lewis J F, Seeger W, Gunther A, Spragg R G. A Search for subgroups of patients with ARDS who may benefit from surfactant replacement therapy: a pooled analysis of five studies with recombinant surfactant protein-C surfactant (Venticute). *Chest* 2008; 134(4): 724-732.

- Thomas N J, DiAngelo S, Hess J C, Fan R, Ball M W, Geskey J M, Willson D F, Floros J. Transmission of surfactant protein variants and haplotypes in children hospitalized with respiratory syncytial virus. *Pediatr Res* 2009; 66(1): 70-73.
- Tino M J, Wright J R. Surfactant proteins A and D specifically stimulate directed actin-based responses in alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1999; 276(1 Pt 1): L164-L174.
- Trejo Bittar H E, Yousem S A, Wenzel S E. Pathobiology of severe asthma. *Annu Rev Pathol* 2015; 10: 511-545.
- Urrutia I, Aguirre U, Sunyer J, Plana E, Muniozguren N, Martinez-Moratalla J, Payo F, Maldonado J A, Anto J M. [Changes in the prevalence of asthma in the Spanish cohort of the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS-II)]. *Arch Bronconeumol* 2007; 43(8): 425-430.
- van de Graaf E A, Jansen H M, Lutter R, Alberts C, Kobesen J, de Vries I J, Out T A. Surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluid. *J Lab Clin Med* 1992; 120(2): 252-263.
- Vandivier R W, Ogden C A, Fadok V A, Hoffmann P R, Brown K K, Botto M, Walport M J, Fisher J H, Henson P M, Greene K E. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol* 2002; 169(7): 3978-3986.
- Vasta G R. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(6): 424-438.
- Vestbo J, Edwards L D, Scanlon P D, Yates J C, Agustí A, Bakke P, Calverley P M, Celli B, Coxson H O, Crim C, Lomas D A, Macnee W, Miller B E, Silverman E K, Tal-Singer R, Wouters E, Rennard S I. Changes in forced expiratory volume in 1 second over time in COPD. *N Engl J Med* 2011; 365(13): 1184-1192.
- Wang G, Bates-Kenney S R, Tao J Q, Phelps D S, Floros J. Differences in biochemical properties and in biological function between human SP-A1 and SP-A2 variants, and the impact of ozone-induced oxidation. *Biochemistry* 2004; 43(14): 4227-4239.
- Wang G, Guo X, DiAngelo S, Thomas N J, Floros J. Humanized SFTPA1 and SFTPA2 transgenic mice reveal functional divergence of SP-A1 and SP-A2: formation of tubular myelin in vivo requires both gene products. *J Biol Chem* 2010; 285(16): 11998-12010.
- Wang G, Guo X, Floros J. Human SP-A 3'-UTR variants mediate differential gene expression in basal levels and in response to dexamethasone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284(5): L738-L748.
- Wang G, Guo X, Floros J. Differences in the translation efficiency and mRNA stability mediated by 5'-UTR splice variants of human SP-A1 and SP-A2 genes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289(3): L497-L508.
- Wang G, Myers C, Mikerov A, Floros J. Effect of cysteine 85 on biochemical properties and biological function of human surfactant protein A variants. *Biochemistry* 2007; 46(28): 8425-8435.
- Wang G, Phelps D S, Umstead T M, Floros J. Human SP-A protein variants derived from one or both genes stimulate TNF-alpha production in the THP-1 cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278(5): L946-L954.
- Wang G, Umstead T M, Phelps D S, Al-Mondhry H, Floros J. The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein a variants to stimulate cytokine production. *Environ Health Perspect* 2002; 110(1): 79-84.
- Wang J Y, Shieh C C, You P F, Lei H Y, Reid K B. Inhibitory effect of pulmonary surfactant proteins A and D on allergen-induced lymphocyte proliferation and histamine release in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(2): 510-518.
- Wang J Y, Shieh C C, Yu C K, Lei H Y. Allergen-induced bronchial inflammation is associated with decreased levels of surfactant proteins A and D in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(4): 652-662.
- Wang J Y, Yeh T F, Lin Y C, Miyamura K, Holmskov U, Reid K B. Measurement of pulmonary status and surfactant protein levels during dexamethasone treatment of neonatal respiratory distress syndrome. *Thorax* 1996; 51(9): 907-913.
- Watson J D, Crick F H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171(4356): 737-738.
- Weikert L F, Edwards K, Chroneos Z C, Hager C, Hoffman L, Shepherd V L. SP-A enhances uptake of bacillus Calmette-Guerin by macrophages through a specific SP-A receptor. *Am J Physiol* 1997; 272(5 Pt 1): L989-L995.
- Wenzel S E. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006; 368(9537): 804-813.
- Wenzel S E. Complex phenotypes in asthma: current definitions. *Pulm Pharmacol Ther* 2013; 26(6): 710-715.

- Whitsett J A. Review: The intersection of surfactant homeostasis and innate host defense of the lung: lessons from newborn infants. *Innate Immun* 2010; 16(3): 138-142.
- Whitsett J A, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 2015; 16(1): 27-35.
- Winkler C, Atochina-Vasserman E N, Holz O, Beers M F, Erpenbeck V J, Krug N, Roepcke S, Lauer G, Elmlinger M, Hohlfeld J M. Comprehensive characterisation of pulmonary and serum surfactant protein D in COPD. *Respir Res* 2011; 12: 29.
- Winkler C, Bahlmann O, Viereck J, Knudsen L, Wedekind D, Hoymann H G, Madsen J, Thum T, Hohlfeld J M, Ochs M. Impact of a Met(11)Thr single nucleotide polymorphism of surfactant protein D on allergic airway inflammation in a murine asthma model. *Exp Lung Res* 2014; 40(4): 154-163.
- Wright J R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(1): 58-68.
- Wu Y P, Liu Z H, Wei R, Pan S D, Mao N Y, Chen B, Han J J, Zhang F S, Holmskov U, Xia Z L, de Groot P G, Reid K B, Xu W B, Sorensen G L. Elevated plasma surfactant protein D (SP-D) levels and a direct correlation with anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus-specific IgG antibody in SARS patients. *Scand J Immunol* 2009; 69(6): 508-515.
- Yamada C, Sano H, Shimizu T, Mitsuzawa H, Nishitani C, Himi T, Kuroki Y. Surfactant protein A directly interacts with TLR4 and MD-2 and regulates inflammatory cellular response. Importance of supratrimeric oligomerization. *J Biol Chem* 2006; 281(31): 21771-21780.
- Yang H Y, Li H, Wang Y G, Xu C Y, Zhao Y L, Ma X G, Li X W, Chen H. Correlation analysis between single nucleotide polymorphisms of pulmonary surfactant protein A gene and pulmonary tuberculosis in the Han population in China. *Int J Infect Dis* 2014; 26: 31-36.
- Zhao X M, Wu Y P, Wei R, Cai H X, Tornøe I, Han J J, Wang Y, de Groot P G, Holmskov U, Xia Z L, Sorensen G L. Plasma surfactant protein D levels and the relation to body mass index in a chinese population. *Scand J Immunol* 2007; 66(1): 71-76.
- Zlotogora J. Penetrance and expressivity in the molecular age. *Genet Med* 2003; 5(5): 347-352.

WEBS

http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/en/.

www.who.int/csr/disease/swineflu/en/

www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5819a1.htm

www.stat.washington.edu/stephens/phase.html

<http://broad.mit.edu/haploview/haploview>

<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/MACH/index.html>

<http://www.hapmap.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>

<http://www.rcsb.org/pdb/>

<http://genome.ucsc.edu>

<http://www.lifetechnologies.com>

<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>

<http://www.ginasthma.com>

<https://rkward.kde.org>

ANEXOS

FICHA RECOGIDA DATOS CLÍNICOS / EPIDEMIOLÓGICOS PARA EL ESTUDIO DE NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

NOMBRE Y APELLIDOS:			
Nº Hª Cª:		Extranjero SI NO <i>(si es Sí, no es válido para el estudio)</i>	
PROCEDENCIA:		FECHA INGRESO:	

ANTECEDENTES:

Tabaco (paq./año): _____ Alcohol (gr/día): _____ Otras drogas: _____

EPOC: SI NO Asma: SI NO Bronquiectasia: SI NO Neoplasias: SI NO

Cardiopatía isquémica: SI NO Otros cardiológico: _____ Diabetes: SI NO

Enfermedad renal: SI NO HD: SI NO

Enfermedad hepática: SI NO Enfermedad neurológica: SI NO

Sospecha aspiración: SI NO Alt. Deglutorias: SI NO VIH: SI NO

ATB previos: SI NO ¿Cuál? _____ ¿Cuánto tiempo? _____

Corticoides crónicos: SI NO Otros inmunosupresores: SI NO ¿Cuál? _____

Enfermedad autoinmune: SI NO ¿Cuál? _____ Esplenectomía: SI NO

Neumonías previas: SI NO TBC: SI NO Infecciones previas: SI NO

Hospitalización previa: SI NO Motivo: _____

Distress: _____ Duración fiebre: _____

Vacunación neumococo previa: SI NO DESC

EXAMEN FÍSICO:

FR >30 rpm: _____ FC: _____ TA: _____ Temp.: _____ Derrame pleural: SI NO

Sodio: _____ Glucosa: _____ Hto.: _____ BUN: _____ PaO₂ o SaHb: _____

Lactato al diagnóstico: _____ mmol/L % Reducción lactato con tratamiento: _____

COMPLICACIONES:

Shock: SI NO CID: SI NO I. Renal: SI NO I. Resp.: SI NO

Met. Sépticas: SI NO Bacteremia: SI NO Otros: SI NO

SDRA: SI NO FMO: SI NO Ingreso UMI: SI NO

V.M.: SI NO (Invasiva: SI NO) Muerte: SI NO Fecha fallecimiento: _____

FINE: _____ APACHE II: _____

Mortalidad relacionada: SI NO Días hospital: _____

Mortalidad APACHE: _____ Días UMI: _____ ATB/ATS: SI NO

Microbiología: _____

FICHA RECOGIDA DATOS CLÍNICOS / EPIDEMIOLÓGICOS PARA EL ESTUDIO DE GRIPE A POR AIV H1N1 2009

NOMBRE:	FECHA DE NACIMIENTO:
Nº Hª Cª:	ORIGEN ÉTNICO (PAÍS):
PROCEDENCIA: Comunitaria ☐ Residencia o Institucion ☐ Adquisición hospitalaria ☐	
Personal sanitario ☐	
FECHA INGRESO: _____	FECHA ALTA _____ EXITUS ☐ NO Ingreso ☐
Fecha de aislamiento de H1N1: _____ Exudado faringeo ☐ BAS/LBA ☐	

ANTECEDENTES:

Tabaco (paq./año): _____ Alcohol (gr/día): _____ Otras drogas: _____

DOMICILIO URBANO ☐ DOMICILIO RURAL ☐ EMPLEO: _____

EMBARAZADA: ☐ CONTACTO CON PACIENTES AFECTOS/SOSPECHOSOS ☐

VIAJE A ZONA DE RIESGO EPIDEMIOLÓGICO ☐

HTA ☐ DIABETES ☐ HIPERLIPEMIA ☐

CARDIOPATÍA ISQUÉMICA ☐ VALVULOPATÍA ☐ INSUF CARDÍACA ☐ ARRITMIA ☐

EPOC ☐ ASMA ☐ BRONQUIECTASIAS ☐ OTRA NEUMOPATÍA ☐ CORTIC INHALAD ☐

ENF RENAL CRÓNICA ☐ HEMODIALISIS ☐ ENFERMEDAD NEUROLÓGICA ☐ Tipo _____

HEPATOPATÍA CRÓNICA ☐ CIRROSIS ☐ (Enólica ☐ Virica ☐ Otras ☐)

TRASPLANTE ☐ (Tipo _____)

ENF INFLAMATORIA INTESTINAL ☐ ÚLCUS ☐ HIPER/HIPOTIROIDISMO ☐

NEOPLASIA SÓLIDA ☐ MTX ☐ NEOPLASIA HEMATOLÓGICA ☐ QUIMIOTERAPIA ☐

VIH ☐ ESPLENECTOMIA ☐ CORTICOIDES SISTÉMICOS ☐

OTROS INMUNOSUPRESORES ☐ (Tipo _____) ENF AUTOINMUNE ☐ (Tipo _____)

ÍNDICE DE COMORBILIDAD DE CHARLSON (Crudo y ajustado por edad): _____

NEUMONIAS PREVIAS ☐ TBC ☐ INFEC. RESPIRATORIAS DE REPETICIÓN (>3/AÑO) ☐

Hospitalización previa: SI NO Motivo: _____

VACUNACIÓN ANTINEUMOCÓCICA ☐ VACUNACIÓN VIRUS H1N1 2009 ☐

VACUNACIÓN GRIPE ESTACIONAL 2009 ☐ VACUNACIÓN GRIPE AÑOS ANTERIORES ☐

DATOS CLÍNICOS:

PESO ____ KG TALLA ____ CM IMC ____

TA: ____ FC: ____ FR: ____ Temp: ____ SaO₂ ____

SINTOMAS:

TOS ☐ ODINOFAJIA ☐ RINORREA ☐ CEFALEA ☐ MIALGIAS ☐ CONJUNTIVITIS ☐

EXPECTORACIÓN BLANQUECINA ☐ PURULENTA ☐ DISNEA ☐ ASTENIA ☐

NAÚSEAS/VÓMITOS ☐ DIARREA ☐ ESCALOFRÍOS ☐

TRATAMIENTO CON ANTIVIRALES ☐ TIEMPO DESDE SINTOMAS HASTA TRATAMIENTO ____ días

DURACIÓN DEL TRATAMIENTO CON ANTIVIRALES ____ días TIPO/DOSIS _____

TRATAMIENTO AMBULATORIO CON ANTIBIÓTICOS ☐ TIPO _____ DÍAS _____

TIEMPO DE DURACIÓN DE LA FIEBRE/SINTOMAS _____ DÍAS

TIEMPO HASTA NECESIDAD DE INGRESO HOSPITALARIO _____ DÍAS

COMPLICACIONES / ESTANCIA HOSPITALARIA:

Hemoglobina_____	Leucocitos_____	Neutrófilos_____	Neutrófilos %_____
Linfocitos_____	Linfocitos %_____	Plaquetas_____	Indice de Quick_____
Glucosa_____	Urea_____	Cr_____	Albúmina_____
VSG_____	PCR_____	Procalcitonina_____	Ferritina_____
Láctico_____	Na_____	K_____	Bb Tot_____
AST_____	ALT_____	GGT_____	FA_____
LDH_____	CK_____	Colesterol_____	

INSUFICIENCIA RESPIRATORIA AGUDA: SI NO

pH_____ paO2_____ pCO2_____ HCO3_____

TRASTORNOS DEL NIVEL DE CONCIENCIA ☐INFILTRADOS EN RXTX UNILOBARES ☐ MULTILOBARES/BILAT ☐ DERRAME PLEURAL ☐

NEUMONÍA BACTERIANA SECUNDARIA : SI NO

FINE:_____ APACHE II:_____ SOFA Score_____ CURB65_____

DETERIORO DE FUNCION RENAL ☐ NECESIDAD DE DEPURACION EXTRERRENAL ☐SHOCK ☐ SDRA ☐ FRACASO MULTIORG ☐INGRESO EN UMI ☐ VMNI ☐ IOT ☐ DIAS DESDE INGRESO HOSP HASTA UMI _____

DIAS DE ESTANCIA EN UMI _____ DIAS DE IOT _____

NECESIDAD DE VASOPRESORES ☐ (Tipo_____)TRATAMIENTO CON ESTEROIDES ☐

Microbiología: (Especificar gérmenes aislados y fuente de aislamiento, sin contar con H1N1)

TRATAMIENTOS ANTIBIOTICOS CONCOMITANTES (INDICAR TIPO Y DURACION)

FICHA RECOGIDA DATOS CLÍNICOS / EPIDEMIOLÓGICOS PARA EL ESTUDIO ALERGIA/ASMA

NOMBRE:	F. NAC:	Nº Hª Cª:
ESP/ CAUCASICO;; ♂ // ♀	FECHA ESTUDIO: MARZO/ABRIL/MAYO 2011	Fecha 1º estudio:
otros _____		
TRATAMIENTO (1º visita):	A-H1 CO s/n A-H1 s/n B2AAC B2AAL ITE Teofilinas	Colirios-AH
CO inh DB+B2AAL CO inh DA+B2AAL Antileucot.	CO inh DB CO inh DA CO.inhal	CO.inhal
CO inh DM+B2AAL CO inh DM		
OMALIZUMAB		
TRATAMIENTO (Última visita):		
	sin cambios ☐	modificado ☐
A-H1 CO s/n A-H1 s/n B2AAC B2AAL ITE Teofilinas Colirios-AH		
CO inh DB+B2AAL CO inh DA+B2AAL Antileucot. CO inh DB CO inh DA CO.inhal		
CO inh DM+B2AAL CO inh DM		
OMALIZUMAB		
CONJUNTIVITIS: NO ☐ SI ☐		
RINITIS: NO ☐ SI ☐ INTERMITENTE ☐ PERSISTENTE ☐ . //		
LEVE ☐ MODERADO ☐ GRAVE ☐		
ASMA: NO ☐ SI ☐ INTERMITENTE ☐ PERSISTENTE ☐ . //		
LEVE ☐ MODERADO ☐ GRAVE ☐		
POLIPOSIS: NO ☐ SI ☐		
SINUSITIS CRÓNICA.: NO ☐ SI ☐		
INTOLERANCIA A AINES NO ☐ SI ☐		D. ATÓP.: NO ☐ SI ☐
OTROS EPIS. DE ANAFILAXIA: NO ☐ SI ☐		BRONQUITIS CRÓNICA.: NO ☐ SI ☐
ANAFILAXIA POR HARINAS: NO ☐ SI ☐		
ALERGIA A ALIMENTOS NO ☐ SI ☐ VEGETALES ☐ MARISCOS ☐ OTROS ☐		
(.....)		
TABAQUISMO NO ☐ SI ☐ Cigarrillos día: _____; Fumador pasivo: NO ☐ SI ☐		

PARÁMETROS BIOLÓGICOS Y ESTUDIOS FUNCIONALES:

Leuco: _____ Neut _____; Linfo _____; Monoci: _____; Eosinof _____ Basofi _____
x10³/uL

Neut _____% Linfo _____% Mon: _____%; Eos _____% Basofi _____% Hb: _____; Cito exud
nasal: _____%

A1A. : _____ mg/dL IgG _____; IgA _____; IgM _____

Genética Alpha 1-AT (M/S/Z): Negativo S/Z Portador: SS SZ MS MZ /// ZZ

EFR: Normal ☐; Restricción leve ☐; mod ☐; grave ☐ Obstrucción leve ☐; mod ☐; grave ☐

FVC: _____%; FEV1: _____%; I. Tiffeneau: _____%;

NIOXX: _____

Test de Broncodilatación NO ☐ SI ☐ (+) ☐ (-) ☐ // Metacolina: NO ☐ SI ☐ (+) ☐
(-) ☐

IgE específicas y pruebas cuaneas en prick: en KU/L

IgE.T.....Dp: _____; Df _____; A.sir: _____ Lepi d.: _____; Tyr p.: _____; E.may: _____;; B.Tro: _____; Olea
eur: _____; Loli per: _____; Art vulg.: _____; Plumas.: _____; D.perro: _____; D.gato: _____; D.cone: _____; D.cucar:
_____; D.cab: _____; Látex: _____

Prick (+) frente ácaros del polvo doméstico No ☐ SI ☐. ¿Cuáles?

Prick (+) frente ácaros del depósito No ☐ SI ☐. ¿Cuáles?

Prick (+) frente a hongos No ☐ SI ☐. ¿Cuáles?

Prick (+) frente a pólenes No ☐ SI ☐. ¿Cuáles?

Prick (+) frente a látex No ☐ SI ☐. ¿Cuáles?

Prick (+) frente epitelios animales No ☐ SI ☐. ¿Cuáles?

Prick (+) frente alimentos No ☐ SI ☐. ¿Cuáles?

CELIAQUÍA: NO ☐; SI ☐; DESC ☐;

NEUMONÍA PREVIA: NO ☐; SI ☐; DESC ☐; Cuantas.....

INFECC. RESPIRATORIAS DE REPETICION (>3/AÑO): ; NO ☐ SI ☐ NO CONOCIDO ☐

Infecciones relevantes (tipo, frecuencia): _____

Otras enfermedades.....

PUBLICACIONES

RESEARCH

Open Access

Influence of genetic variability at the surfactant proteins A and D in community-acquired pneumonia: a prospective, observational, genetic study

M Isabel García-Laorden¹, Felipe Rodríguez de Castro^{2,3}, Jordi Solé-Violán⁴, Olga Rajas⁵, José Blanquer⁶, Luis Borderías⁷, Javier Aspa⁵, M Luisa Briones⁸, Pedro Saavedra⁹, J Alberto Marcos-Ramos¹⁰, Nereida González-Quevedo¹, Ithaisa Sologuren¹, Estefanía Herrera-Ramos¹, José M Ferrer⁴, Jordi Rello¹¹, Carlos Rodríguez-Gallego^{1,3*}

Abstract

Introduction: Genetic variability of the pulmonary surfactant proteins A and D may affect clearance of microorganisms and the extent of the inflammatory response. The genes of these collectins (*SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD*) are located in a cluster at 10q21-24. The objective of this study was to evaluate the existence of linkage disequilibrium (LD) among these genes, and the association of variability at these genes with susceptibility and outcome of community-acquired pneumonia (CAP). We also studied the effect of genetic variability on SP-D serum levels.

Methods: Seven non-synonymous polymorphisms of *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD* were analyzed. For susceptibility, 682 CAP patients and 769 controls were studied in a case-control study. Severity and outcome were evaluated in a prospective study. Haplotypes were inferred and LD was characterized. SP-D serum levels were measured in healthy controls.

Results: The *SFTPD aa11-C* allele was significantly associated with lower SP-D serum levels, in a dose-dependent manner. We observed the existence of LD among the studied genes. Haplotypes *SFTPA1 6A²* ($P = 0.0009$, odds ratio (OR) = 0.78), *SFTPA2 1A⁰* ($P = 0.002$, OR = 0.79), *SFTPA1-SFTPA2 6A²-1A⁰* ($P = 0.0005$, OR = 0.77), and *SFTPD-SFTPA1-SFTPA2 C-6A²-1A⁰* ($P = 0.00001$, OR = 0.62) were underrepresented in patients, whereas haplotypes *SFTPA2 1A¹⁰* ($P = 0.00007$, OR = 6.58) and *SFTPA1-SFTPA2 6A³-1A* ($P = 0.0007$, OR = 3.92) were overrepresented. Similar results were observed in CAP due to pneumococcus, though no significant differences were now observed after Bonferroni corrections. *1A¹⁰* and *6A-1A* were associated with higher 28-day and 90-day mortality, and with multi-organ dysfunction syndrome (MODS) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) respectively. *SFTPD aa11-C* allele was associated with development of MODS and ARDS.

Conclusions: Our study indicates that missense single nucleotide polymorphisms and haplotypes of *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD* are associated with susceptibility to CAP, and that several haplotypes also influence severity and outcome of CAP.

Introduction

Community-acquired pneumonia (CAP) is the most common infectious disease requiring hospitalization in developed countries. Several microorganisms may be causative agents of CAP, and *Streptococcus pneumoniae* is the most common cause [1]. Inherited genetic

variants of components of the human immune system influence the susceptibility to and the severity of infectious diseases. In humans, primary immunodeficiencies (PID) affecting opsonization of bacteria and NF- κ B-mediated activation have been shown to predispose to invasive infections by respiratory bacteria, particularly *S. pneumoniae* [2]. Conventional PID are mendelian disorders, but genetic variants at other genes involved in opsonophagocytosis, with a lower penetrance, may also

* Correspondence: jroldgal@gobiernodecanarias.org

¹Department of Immunology, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Barranco de la Ballena s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35010, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

influence susceptibility and severity of these infectious diseases with a complex pattern of inheritance [3].

In the lung, under normal conditions, microorganisms at first encounter components of the innate immune response, particularly alveolar macrophages, dendritic cells and the lung collectins, the surfactant protein (SP)-A1, -A2 and -D. SP-A1, -A2 and -D belong to the collectin subgroup of the C-type lectin superfamily, and contain both collagen-like and carbohydrate-binding recognition domains (CRDs) [4]. Upon binding to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), SP-A and SP-D enhance the opsonophagocytosis of common respiratory pathogens by macrophages [5,6]. Mice rendered SP-A or SP-D deficient exhibit increased susceptibility to several bacteria and viruses after intratracheal challenge [7-9]. SP-A1, -A2 and -D also play a pivotal role in the regulation of inflammatory responses [4,10,11] and clearance of apoptotic cells [4,12,13]. In mice, SP-A and SP-D have been shown to be non-redundant in the immune defense *in vivo* [9].

The human SP-A locus consists of two similar genes, *SFTPA1* and *SFTPA2*, located on chromosome 10q21-24, within a cluster that includes the SP-D gene (*SFTPD*) [11]. The nucleotide sequences of human *SFTPA1* and *SFTPA2* differ little (96.0 to 99.6%) [14]. Single nucleotide polymorphisms (SNP) at the *SFTPA1* codons 19, 50, 62, 133 and 219, and at the *SFTPA2* codons 9, 91, 140 and 223 have been used to define the SP-A haplotypes, which are conventionally denoted as 6Aⁿ for the *SFTPA1* gene and 1Aⁿ for the *SFTPA2* gene (see Table E1 in Additional File 1) [15]. Variability at the *SFTPD* gene has been also reported. Particularly, the presence of the variant amino acid (aa)-11 (*M11T*) has been shown to lead to low SP-D levels [16].

In the present study, we assessed the potential association of missense polymorphisms of the *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD* genes as well as the resulting haplotypes, with the susceptibility to and the severity and outcome of CAP in adults. In addition, we evaluated the existence of linkage disequilibrium (LD) among these genes, and the effect of genetic variability on SP-D serum levels.

Materials and methods

Patients and controls

We studied 682 patients and 769 controls, all of them Caucasoid Spanish adult individuals from five hospitals in Spain. Foreigners and individuals with ancestors other than Spanish were previously excluded in the selection process. The diagnosis of CAP was assumed in the presence of acute onset of signs and symptoms suggesting lower respiratory tract infection and radiographic evidence of a new pulmonary infiltrate that had

no other known cause. A detailed description of the exclusion criteria and clinical definitions are shown in Methods in Additional File 1 [17-19]. The control group was composed of healthy unrelated blood donors from the same hospitals as patients.

For susceptibility, a case-control study was performed. Severity and outcome were evaluated in a prospective study of CAP patients. Demographic and clinical characteristics of CAP patients included in the study are shown in Table E2 in Additional File 1.

Measurement of SP-D serum levels

In order to analyze the effect of the *SFTPD aa11* on SP-D levels in our population, protein levels were measured in serum samples from individuals in the control group by means of a Surfactant Protein D ELISA kit (Antibodyshop[®], Gentofte, Denmark).

Genotyping

Four haplotypes of SP-A1 (6A, 6A², 6A³ and 6A⁴) and six of SP-A2 (1A, 1A⁰, 1A¹, 1A², 1A³ and 1A⁵) are found frequently (>1%) in the general population [15]. On the basis of the differences in non-synonymous SNPs (*SFTPA1*-aa19, -aa50, -aa219, *SFTPA2*-aa9, -aa91, -aa223) the most frequent conventional haplotypes of these genes, except 1A and 1A⁵, can be unambiguously identified (see Table E1 in Additional File 1). However, this method does not allow for the differentiation of some of these haplotypes from those rare haplotypes (frequency equal or lower than 1%) identified with the SNPs indicated in Table E1 in Additional File 1. For comparative purposes, in our study each haplotype was denoted by the name of the most frequent haplotype for a given combination of non-synonymous SNPs. Genomic DNA was isolated from whole blood according to standard phenol-chloroform procedure or with the Magnapure DNA Isolation Kit (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). Genotyping of polymorphisms in *SFTPA1* (aa19, aa50, aa219), *SFTPA2* (aa9, aa91, aa223) and *SFTPD* (aa11) genes was carried out using minor modifications of previously reported procedures [15,20]. The accuracy of genotyping was confirmed by direct sequencing in an ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sequencer.

Haplotypes for each individual were inferred using PHASE statistical software (version 2.1) [21]. The haplotype of *SFTPA1*, *SFTPA2* or the haplotype encompassing *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD* was ambiguous or could not be assigned in 12 individuals, who were excluded from the study. The order used for the haplotypes nomenclature is *SFTPD-SFTPA1-SFTPA2*. Linkage disequilibrium (LD) was measured by means of Arlequin (version 3.11) [22] and Haploview [23] softwares in the control group. In addition, pairwise LD between haplotypes of *SFTPA1* and

SFTPA2 as well as with the *SFTPD* SNP was characterized using Arlequin 3.11. The existence of LD was considered if $D' > 0.4$.

Informed consent was obtained from the patients or their relatives. The protocol was approved by the local ethics committee of the five hospitals. All steps were performed in complete accordance to the Helsinki declaration.

Statistical analysis

Bivariate and multivariate statistical analyses were performed using SPSS (version 15.0) (SPSS, Inc, Chicago, Ill, USA) and R package [24]. A detailed description of the statistical methods is shown in Methods in Additional File 1.

Results

Susceptibility to CAP related to *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD* gene variants

Seven non-synonymous SNPs were genotyped across the region containing the *SFTPD*, *SFTPA1* and *SFTPA2* genes (Table 1). None of the SNPs showed a significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium in controls. Several major alleles were overrepresented in controls compared with patients, but only *SFTPA1* *aa50-G*, *SFTPA2* *aa9-A* and *aa91-G* remained significant after Bonferroni correction for multiple comparisons. A dominant effect of *SFTPA2* *aa9-A*, and a recessive effect of *SFTPA1* *aa50-G* and *aa219-C* as well as *SFTPA2* *aa223-C* were associated with a lower risk of CAP (see Table 1).

Table 1 Comparison of SNPs from *SFTPD*, *SFTPA1* and *SFTPA2* between patients with CAP and controls

	Controls (N = 769)	CAP (N = 682)	Alleles comparison		Genotypes comparison [†]	
			P*	OR (95% CI)	P*	OR (95% CI)
<i>SFTPD</i> aa11 rs721917				T vs C		Dominant
T/T	269 (35.0)	272 (39.9)			0.681	0.95 (0.73 to 1.1.23)
T/C	361 (46.9)	281 (41.2)	0.266	1.09 (0.94to 1.27)		Recessive
C/C	139 (18.1)	129 (18.9)			0.054	1.23 (1.00 to 1.53)
<i>SFTPA1</i> aa19 rs1059047				T vs C		Dominant
T/T	680 (88.4)	582 (85.3)			0.193 [‡]	0.22 (0.00 to 2.24)
T/C	88 (11.4)	96 (14.1)	0.056	0.75 (0.56 to 1.02)		Recessive
C/C	1 (0.001)	4 (0.006)			0.081	0.76 (0.56 to 1.04)
<i>SFTPA1</i> aa50 rs1136450				G vs C		Dominant
G/G	320 (41.6)	232 (34.0)			0.060	0.77 (0.59 to 1.01)
G/C	330 (42.9)	319 (46.8)	0.002	0.79 (0.68 to 0.92)		Recessive
C/C	119 (15.5)	131 (19.2)			0.003	0.72 (0.58 to 0.90)
<i>SFTPA1</i> aa219 rs4253527				C vs T		Dominant
C/C	620 (80.6)	508 (74.5)			0.710	1.24 (0.39 to 3.94)
C/T	142 (18.5)	169 (24.8)	0.012	0.75 (0.59 to 0.95)		Recessive
T/T	7 (0.9)	5 (0.7)			0.005	0.70 (0.55 to 0.90)
<i>SFTPA2</i> aa9 rs1059046				A vs C		Dominant
A/A	323 (42.0)	245 (35.9)			0.010	0.68 (0.51 to 0.91)
A/C	349 (45.4)	318 (46.6)	0.003	0.79 (0.68 to 0.92)		Recessive
C/C	97 (12.6)	119 (17.4)			0.018	0.77 (0.63 to 0.96)
<i>SFTPA2</i> aa91 rs17886395				G vs C		Dominant
G/G	623 (81.0)	501 (73.5)			0.110	0.58 (0.29 to 1.14)
G/C	133 (17.3)	158 (23.2)	0.0002	0.66 (0.52 to 0.82)		Recessive
C/C	13 (1.7)	23 (3.4)			0.001	0.65 (0.51 to 0.83)
<i>SFTPA2</i> aa223 rs1965708				C vs A		Dominant
C/C	503 (65.4)	419 (61.4)			0.151	0.66 (0.38 to 1.17)
C/A	244 (31.7)	234 (34.3)	0.071	0.85 (0.70 to 1.02)		Recessive
A/A	22 (2.9)	29 (4.3)			0.117	0.84 (0.68 to 1.04)

Frequency values are the number of individuals (%). SNPs: Single nucleotide polymorphisms; CAP: Community-acquired pneumonia.

*Uncorrected P-value for the bivariate comparison of alleles.

[†]Uncorrected P-value for the bivariate comparison of genotypes. For the dominant allele effect, individuals homozygous for the more frequent allele or those heterozygous for both alleles were defined as 1, and individuals homozygous for the minor allele were defined as 0. For the recessive allele effect, individuals homozygous for the more frequent allele were defined as 1, with all others defined as 0.

[‡]P-value by Fischer exact test.

When haplotypes were inferred, seven different haplotypes were found for *SFTPA1* and eight for *SFTPA2* (see Table 2). All haplotypes except $6A^5$, $6A^{15}$, $1A^{10}$ and $1A^{13}$ had frequencies higher than 1% in our population. The most frequent haplotype for *SFTPA1* and *SFTPA2* were respectively TGC and AGC , which correspond mainly with the $6A^2$ and $1A^0$ haplotypes respectively. The frequencies of both haplotypes were significantly lower in patients compared to controls ($P = 0.0009$, OR = 0.78; 95% confidence interval (CI) 0.67 to 0.91, for

SFTPA1 $6A^2$. $P = 0.002$, OR = 0.79; 95% CI 0.68 to 0.92, for *SFTPA2* $1A^0$), even when Bonferroni correction was applied. Several haplotypes were overrepresented in patients compared with controls, but only $1A^{10}$ ($P = 0.00007$, OR = 6.58; 95% CI 2.24 to 26.22) remained significant after Bonferroni correction. For the observed odd-ratios, the power of the tests with a significance level of 1% were 84.16%, 79.09% and 94.04% for the haplotypes $6A^2$, $1A^0$ and $1A^{10}$ respectively. In addition, dominant and recessive models showed a significant

Table 2 Comparison of haplotypes of *SFTPA1* and *SFTPA2* between patients with CAP and controls

Haplotype *	Controls N = 1,538	CAP N = 1,364	$P^{\dagger}$ OR (95% CI)	Haplotype effect	$P^{\ddagger}$ OR (95% CI)
<i>SFTPA1</i>					
6A (CCC)	75 (4.9)	90 (6.6)	0.047 1.38 (0.99-1.92)	Dominant	0.058 1.37 (0.99-1.91)
				Recessive	0.347 [§] 3.39 (0.27-178.36)
$6A^2$ (TGC)	934 (60.7)	745 (54.0)	0.0009 0.78 (0.67-0.91)	Dominant	0.172 0.83 (0.64-1.08)
				Recessive	0.0002 0.66 (0.53-0.82)
$6A^3$ (TCC)	362 (23.5)	343 (25.1)	n.s.	Dominant	0.004 1.37 (1.11-1.69)
				Recessive	0.146 1.35 (0.90-2.18)
$6A^4$ (TCT)	128 (8.3)	141 (10.3)	0.062 1.27 (0.98-1.65)	Dominant	0.068 1.28 (0.98-1.68)
				Recessive	0.726 [§] 1.66 (0.32-10.76)
$6A^5$ (CCT)	4 (0.3)	7 (0.5)	n.s.	Dominant	0.107 2.56 (0.78-8.34)
				Recessive	n.a.
$6A^{12}$ (TGT)	26 (1.7)	29 (2.1)	n.s.	Dominant	0.315 1.32 (0.77-2.28)
				Recessive	n.a.
$6A^{15}$ (CGC)	9 (0.6)	9 (0.7)	n.s.	Dominant	0.996 1.00 (0.39-2.61)
				Recessive	n.a.
<i>SFTPA2</i>					
1A (CCC)	134 (8.7)	147 (10.8)	n.s.	Dominant	0.050 1.31 (1.00-1.71)
				Recessive	0.80 1.13 (0.45-2.86)
$1A^0$ (AGC)	911 (59.2)	729 (53.4)	0.002 0.79 (0.68-0.92)	Dominant	0.004 0.68 (0.52-0.88)
				Recessive	0.025 0.78 (0.62-0.97)
$1A^1$ (CGA)	219 (14.2)	222 (16.3)	n.s.	Dominant	0.544 1.14 (0.91-1.44)
				Recessive	0.076 1.91 (0.925-3.93)
$1A^2$ (CGC)	188 (12.2)	164 (12.0)	n.s.	Dominant	0.806 0.97 (0.76-1.24)
				Recessive	0.863 1.06 (0.53-2.12)
$1A^3$ (AGA)	61 (4.0)	46 (3.4)	n.s.	Dominant	0.557 0.89 (0.59-1.33)
				Recessive	n.a.
$1A^7$ (ACC)	21 (1.4)	32 (2.3)	0.049 1.74 (0.96-3.18)	Dominant	0.031 1.88 (1.05-3.36)
				Recessive	1.00 [§] 0.56 (0.01-10.84)
$1A^{10}$ (CCA)	4 (0.3)	23 (1.7)	0.00007 6.58 (2.24-26.22)	Dominant	0.00006 6.68 (2.30-19.40)
				Recessive	n.a.
$1A^{13}$ (ACA)	0	1 (0.1)	n.s.	Dominant	n.a.
				Recessive	n.a.

Frequency values are the number of chromosomes (%). CAP, Community-acquired pneumonia; n.s., non-significant; n.a., not assessable.

*Haplotypes for *SFTPA1* and *SFTPA2*, resulting from the different combinations of the three SNPs (Single nucleotide polymorphisms) studied at each gene, are denoted using the conventional nomenclature [15].

[†]Uncorrected P -value for the bivariate comparison of haplotypes.

[‡]Uncorrected P -value for the bivariate comparison of genotypes. For the dominant haplotype effect, individuals homozygous or heterozygous for the allele of interest were defined as 1, and individuals without the haplotype were defined as 0. For the recessive haplotype effect, individuals homozygous for the haplotype of interest were defined as 1, with all others defined as 0.

[§] P -value by Fischer exact test.

dominant effect on CAP susceptibility for haplotypes $6A^3$, $1A^0$, $1A^7$ and $1A^{10}$ and a recessive effect for haplotype $6A^2$ (see Table 2).

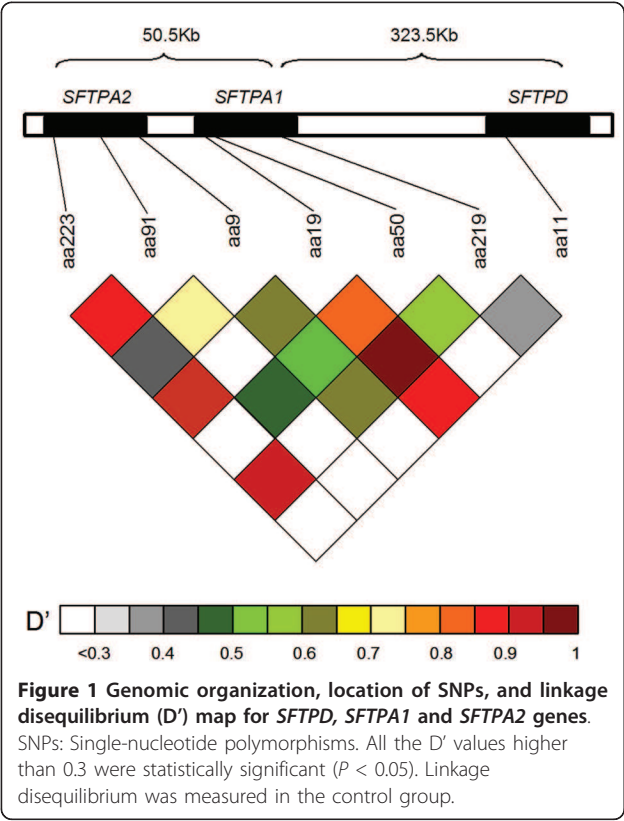
Linkage disequilibrium of *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD* genes

Pairwise LD (D') measured by means of Arlequin confirmed the existence of LD among several SNPs at *SFTPA1* and *SFTPA2*, whereas *SFTPD aa11* was only observed in LD with *SFTPA1 aa19* (see Figure 1). A similar pattern of LD was observed when D' was measured by means of the Haploview software (data not shown). *SFTPA1* and *SFTPA2* were previously found to be in LD [25,26]. The value of LD measured as r^2 was very low for every pair of SNPs (data not shown), and none of the studied SNPs could be used as haplotype-tagging SNP to infer the observed haplotypes.

When pairwise LD was measured among haplotypes instead among SNPs, *SFTPA1* was found to be in LD with *SFTPD aa11*, but only a marginal LD was found between *SFTPA2 1A* and *SFTPD aa11* (see Table E3 in Additional File 1).

Susceptibility to CAP related to haplotypes encompassing *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD*

When haplotypes encompassing both *SFTPA* genes were studied, we observed 39 of the 64 expected haplotypes,



and only 14 haplotypes had frequencies higher than 1% (data not shown). The most common *SFTPA1-SFTPA2* haplotype, $6A^2-1A^0$, was underrepresented in patients ($P = 0.0005$, OR = 0.77; 95% CI 0.66 to 0.90), whereas $6A^3-1A$ was overrepresented ($P = 0.0007$, OR = 3.92; 95% CI 1.63 to 10.80) (see Table 3). Both differences remained significant after Bonferroni correction. For the observed odd-ratios, the powers of the tests with a significance level of 1% were 87.76% and 84.04% for the haplotypes $6A^2-1A^0$ and $6A^3-1A$ respectively. On the other hand, dominant and recessive logistic regression models showed a significant dominant effect on CAP susceptibility for haplotypes $6A^3-1A$ and $6A-1A^1$ and a recessive effect for haplotype $6A^2-1A^0$ (see Table 3). We also intended to analyze whether phased variants encompassing the three genes were involved in susceptibility to CAP. Only 68 of the 128 expected haplotypes were observed, and 16 of them had a frequency over 1%. Chromosomes containing $C-6A^2-1A^0$ were decreased in patients when compared with controls ($P = 0.00001$, OR = 0.62; 95% CI 0.50 to 0.77), a difference that remained significant after Bonferroni correction. $C-6A^2-1A^0$ was also significantly associated with protection against CAP in a dominant model (see Table 3).

A similar pattern of haplotype distribution was observed when individual as well as two- and three-gene based haplotypes were compared between pneumococcal CAP patients and healthy controls (see Table E4 in Additional File 1), though no significant differences were now observed after Bonferroni corrections.

Outcome and severity of CAP patients related to genetic variants at *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD* genes

When fatal outcome was analyzed, patients who died within the first 28 days showed a higher frequency of haplotypes $6A^{12}$, $1A^{10}$ and $6A-1A$, and a lower frequency of the major *SFTPA1aa19-T* and *aa219-C* alleles and of haplotypes $6A^3$ and $6A^3-1A^1$ (see Table 4). Similar results were observed when 90-day mortality was analyzed (see Table 4). For the observed odd-ratios, the power of the tests with a significance level of 5% was 82.64% when the protective effect of $6A^3-1A^1$ on 28-day mortality was evaluated, and 81.45% and 80.79% concerning the effect of $6A^3$ and $6A^3-1A^1$ on 90-day mortality respectively. Kaplan-Meier analysis (Figure 2) and log-rank test (Table 4) also showed significantly different survival for the above mentioned alleles and haplotypes. Cox Regression for 28-day survival, adjusted for age, gender, hospital of origin and co-morbidities, was significant for haplotypes $6A^{12}$ and $6A-1A$, and it remained significant for haplotypes $6A^3$ and $6A-1A$ when 90-day survival analysis was performed (see Table 4). We also analyzed Cox Regression adjusted for hospital of origin, PSI and pathogen causative of the pneumonia, and we found similar results: for 28-day

Table 3 Comparison of relevant haplotypes encompassing *SFTPD*, *SFTPA1* and *SFTPA2* between CAP patients and controls

Haplotype*	Controls	CAP	P [†] OR (95% CI)	Haplotype effect	P [‡] OR (95% CI)
SFTPA1-SFTPA2					
6A ² -1A ⁰ (TGCAGC)	N = 1538 802 (52.1)	N = 1,364 623 (45.7)	0.0005 0.77 (0.66-0.90)	Dominant	0.028 0.77 (0.61-0.97)
				Recessive	0.0005 0.65 (0.51-0.83)
6A ³ -1A (TCCCCC)	7 (0.5)	24 (1.8)	0.0007 3.92 (1.63-10.80)	Dominant	0.001 3.97 (1.70-9.27)
				Recessive	n.a.
6A-1A ¹ (CCCCGA)	2 (0.1)	9 (0.7)	0.020 5.10 (1.05-48.57)	Dominant	0.020 5.13 (1.10-23.82)
				Recessive	n.a.
SFTPD-SFTPA1-SFTPA2					
C-6A ² -1A ⁰ (CTGCAGC)	N = 1,538 261 (17.0)	N = 1,364 153 (11.2)	0.00001 0.62 (0.50-0.77)	Dominant	0.0001 0.63 (0.49-0.80)
				Recessive	0.003 0.38 (0.19-0.73)
C-6A ³ -1A (CTCCCCC)	3 (0.2)	14 (1.0)	0.003 5.31 (1.48-28.84)	Dominant	0.003 5.35 (1.53-18.70)
				Recessive	n.a.
C-6A ⁴ -1A ² (CTCTTGC)	15 (1.0)	31 (2.3)	0.005 2.36 (1.23-4.73)	Dominant	0.003 2.57 (1.35-4.87)
				Recessive	n.a.
T-6A ³ -1A ¹ (TCCCCGA)	54 (3.5)	74 (5.4)	0.012 1.58 (1.09-2.30)	Dominant	0.010 1.62 (1.12-2.34)
				Recessive	1.00 1.13 [§] (0.01-88.64)
T-6A ³ -1A ² (TTCCTGC)	52 (3.4)	28 (2.1)	0.029 0.60 (0.36-0.97)	Dominant	0.019 0.57 (0.35-0.92)
				Recessive	n.a.

Frequency values are the number of chromosomes (%). CAP, Community-acquired pneumonia; n.a., not assessable.

*Haplotypes for *SFTPA1* and *SFTPA2*, resulting from the different combinations of the three SNPs studied at each gene, are denoted using the conventional nomenclature [15].

†Uncorrected *P*-value for the bivariate comparison of haplotypes.

‡Uncorrected *P*-value for the bivariate comparison of genotypes. For the dominant haplotype effect, individuals homozygous or heterozygous for the haplotype of interest were defined as 1, and individuals without the haplotype were defined as 0. For the recessive haplotype effect, individuals homozygous for the haplotype of interest were defined as 1, with all others defined as 0.

§*P*-value by Fischer exact test.

survival it remained significant for haplotype 6A-1A ($P = 0.029$, OR = 2.45; 95% CI 1.10 to 5.46), although for 6A¹² haplotype it was not significant ($P = 0.072$); for 90-day survival it was significant for both 6A³ ($P = 0.038$, OR = 0.52; 95% CI 0.28 to 0.96) and 6A-1A ($P = 0.045$, OR = 2.12; 95% CI 1.02 to 4.44) haplotypes. No effect of the *SFTPD aa11* SNP was observed. Due to the high number of observed haplotypes, and because of the limited sample size in the patient groups when they were stratified on the basis of severity and outcome, the haplotypes including *SFTPA1*, A2 and D were not studied.

The relevance of these genetic variants in the severity of CAP was also evaluated by analyzing predisposition to acute respiratory distress syndrome (ARDS) and to multi-organ dysfunction syndrome (MODS) (see Tables 5 and 6). The *SFTPD aa11-C* allele was significantly overrepresented in patients with MODS or ARDS. Haplotypes 6A and 6A-1A, were also associated with the development of ARDS, and *SFTPA2* 1A and 1A¹⁰ were associated with the development of MODS. For the observed odd-ratios, the power of the association of 1A with predisposition to

MODS was 89.29%. However, the number of individuals included in the analysis of outcome was relatively small and the power of the tests with a significance level of 1% was lower than 80%. These associations remained significant in multivariate analysis adjusted for age, gender, hospital of origin and co-morbidities, as well as for hospital of origin, PSI and causative microorganism (see Tables 5 and 6). By contrast, 6A³-1A¹ was associated with protection against MODS, although this difference was not significant in the multivariate analysis.

Association of genetic variants at *SFTPD* with serum levels of SP-D

In order to study whether variants at the pulmonary collectins were associated with differences of serum levels of SP-D, this protein was measured in serum from healthy controls with known genotypes. The *SFTPD aa11-C* SNP associated with lower SP-D serum levels (905.10 ± 68.38 ng/ml for T/T genotype, 711.04 ± 52.02 ng/ml for T/C, and 577.91 ± 96.14 ng/ml for C/C; ANOVA $P = 0.017$) (see Figure 3).

Table 4 Outcome of CAP patients related to haplotypes of *SFTPA1* and *SFTPA2*

Variant*	28 days					90 days				
	Mortality		Survival			Mortality		Survival		
	Yes	No	$P^{\dagger}$ OR (95% CI)	$P^{\ddagger}$ LR χ^2	$P^{\S}$ HR (95% CI)	Yes	No	$P^{\dagger}$ OR (95% CI)	$P^{\ddagger}$ LR χ^2	$P^{\S}$ HR (95% CI)
SNPs										
<i>SFTPA1</i> <i>aa19-T</i> allele	58 (85.3)	1202 (92.7)	0.024 0.45 (0.22 to 1.03)	0.021 5.31	0.071 0.52 (0.25 to 1.06)	81 (88.0)	1179 (92.7)	0.105 0.58 (0.29 to 1.25)	0.091 2.85	0.256 0.68 (0.35 to 1.36)
<i>SFTPA1</i> <i>aa219-C</i> allele	52 (76.5)	1133 (87.4)	0.009 0.47 (0.26 to 0.90)	0.009 6.75	0.085 0.57 (0.30 to 1.08)	72 (78.3)	1113 (87.5)	0.011 0.51 (0.30 to 0.92)	0.011 6.49	0.230 0.70 (0.39 to 1.25)
Haplotypes										
<i>SFTPA1</i>										
$6A^3$	10 (14.7)	333 (25.7)	0.042 0.50 (0.22 to 1.00)	0.043 4.10	0.058 0.48 (0.23-1.02)	14 (15.2)	329 (25.9)	0.023 0.51 (0.27-0.93)	0.024 5.10	0.033 0.51 (0.28-0.95)
$6A^{12}$	5 (7.4)	24 (1.9)	0.012 4.21 (1.21-11.74)	0.002 9.45	0.017 4.17 (1.29-13.46)	5 (5.4)	24 (1.9)	0.041 2.99 (0.87-8.25)	0.019 5.48	0.053 3.14 (0.98-10.03)
<i>SFTPA2</i>										
$1A^{10}$	4 (5.9)	19 (1.5)	0.024 4.20 (1.01-13.13)	0.005 7.92	0.401 1.85 (0.44-7.79)	5 (5.4)	18 (1.4)	0.016 4.00 (1.13-11.52)	0.003 8.93	0.275 1.92 (0.59-6.23)
<i>SFTPA1-SFTPA2</i>										
$6A^3-1A^1$	3 (4.4)	163 (12.6)	0.045 0.32 (0.06-1.00)	0.047 3.94	0.063 0.26 (0.06-1.08)	5 (5.4)	161 (12.7)	0.041 0.40 (0.12-0.98)	0.043 4.40	0.055 0.373 (0.14-1.02)
$6A-1A$	7 (10.3)	51 (3.9)	0.022 2.80 (1.03-6.55)	0.008 6.93	0.024 2.66 (1.14- 6.30)	8 (8.7)	50 (3.9)	0.053 2.33 (0.92-5.16)	0.021 5.31	0.045 2.23 (1.02- 4.89)

Frequency values are the number of chromosomes (%). Only relevant haplotypes are shown. SNPs: Single nucleotide polymorphisms; CAP: Community-acquired pneumonia.

*Haplotypes for *SFTPA1* and *SFTPA2*, resulting from the different combinations of the three SNPs studied at each gene, are denoted using the conventional nomenclature [15].

[†]P value for the bivariate comparison.

[‡]P value for log-rank (LR) χ^2 test for survival rates related to haplotypes.

[§]P value for Cox proportional hazard ratio for multivariate analysis, including the variables age, gender, hospital of origin and co-morbidities.

^{||}P value by Fischer exact test.

Discussion

This study is unique in reporting a genetic association between non-synonymous SNPs at *SFTPD*, *SFTPA1* and *SFTPA2*, as well as of haplotypes encompassing these genes, with the susceptibility, severity and outcome of CAP.

The major alleles of *SFTPA1* *aa50-G*, *aa219-C* as well as *SFTPA2* *aa9-A* and *aa91-G* or genotypes carrying these alleles were associated with protection against CAP. The frequencies of the different SNPs and haplotypes of

SFTPA1, *SFTPA2* and *SFTPD* observed in our study were similar to those previously reported in European populations [25]. *SFTPA1* and *SFTPA2* were reported to be in strong LD [26,27], and several haplotypes of these loci tend to segregate together, being $6A^2-1A^0$ the major haplotype [27]. A protective role against CAP was associated with $6A^2$, $1A^0$ and $6A^2-1A^0$ in our survey but only the rare $1A^{10}$ and $6A^3-1A$ haplotypes were significantly associated with susceptibility to CAP. Similar results were observed in susceptibility to pneumococcal CAP. Several SNPs and

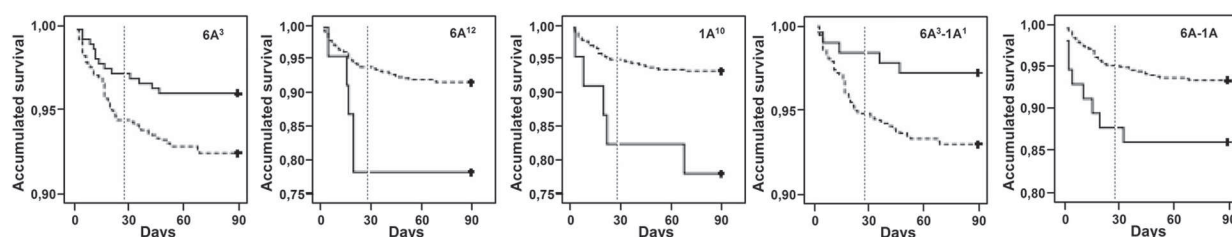


Figure 2 Kaplan-Meier estimation of survival at 28 and 90 days in the 682 CAP patients. CAP, community-acquired pneumonia. Solid curves represent the haplotypes under study, being dotted curves the rest of haplotypes. The vertical dotted line is depicted at 28 days. Significance levels for each comparison are shown in Table 4.

Table 5 Predisposition to MODS related to *SFTPD* alleles and to *SFTPD*, *SFTPA1* and *SFTPA2* haplotypes in patients with CAP

Allele or haplotype*		MODS	No MODS	$P^{\dagger}$ OR (95% CI)	$P^{\ddagger}$ OR (95% CI)	$P^{\S}$ OR (95% CI)
<i>SFTPD</i>		N = 178	N = 1,186			
	C	85 (47.8)	454 (38.4)	0.016 1.47 (1.06-2.05)	0.002 1.68 (1.20-2.35)	0.043 1.46 (1.01-2.10)
<i>SFTPA1</i>		N = 178	N = 1,186			
	6A	14 (7.9)	76 (6.4)	0.465 1.25 (0.64-2.29)	-	-
<i>SFTPA2</i>		N = 178	N = 1,186			
	1A	32 (18.0)	115 (9.7)	0.0009 2.04 (1.28-3.17)	0.0004 2.29 (1.45-3.62)	0.002 2.21 (1.34-3.65)
	1A ¹⁰	8 (4.5)	15 (1.3)	0.006 3.67 (1.33-9.38)	0.033 2.70 (1.08-6.76)	0.033 2.98 (1.09-8.10)
<i>SFTPA1-SFTPA2</i>		N = 178	N = 1,186			
	6A-1A	12 (6.7)	46 (3.9)	0.078 1.79 (0.85-3.52)	-	-
	6A ³ -1A ¹	13 (7.3)	153 (12.9)	0.033 0.53 (0.27-0.97)	0.115 0.62 (0.34-1.13)	0.097 0.58 (0.31-1.10)

For allelic and haplotypic frequencies values are the number of chromosomes (%). Only relevant haplotypes are shown. CAP: Community Acquired Pneumonia; MODS: Multi-organ Dysfunction Syndrome.

*Haplotypes for *SFTPA1* and *SFTPA2*, resulting from the different combinations of the three SNPs (Single nucleotide polymorphisms) studied at each gene, are denoted using the conventional nomenclature [15].

[†]P-value for the bivariate comparison.

[‡]P-value for multivariate analysis, including the variables age, gender, hospital of origin and co-morbidities. For those bivariate comparisons that resulted in non-significant differences, multivariate analysis were not calculated.

[§]P-value for multivariate analysis, including the variables hospital of origin, PSI (Pneumonia Severity Index) and pathogen.

^{||}P-value by Fischer exact test.

Table 6 Predisposition to ARDS related to *SFTPD* alleles and to *SFTPD*, *SFTPA1* and *SFTPA2* haplotypes in patients with CAP

Allele or haplotype *		ARDS	No ARDS	$P^{\dagger}$ OR (95% CI)	$P^{\ddagger}$ OR (95% CI)	$P^{\S}$ OR (95% CI)
<i>SFTPD</i>		N = 52	N = 1,312			
	C	29 (55.8)	510 (38.9)	0.015 1.98 (1.09-3.63)	0.032 1.92 (1.06-3.48)	0.050 1.79 (1.00-3.20)
<i>SFTPA1</i>		N = 52	N = 1,312			
	6A	8 (15.4)	82 (6.3)	0.018 2.73 (1.07-6.11)	0.004 3.89 (1.56-9.72)	0.022 2.64 (1.15-6.08)
<i>SFTPA2</i>		N = 52	N = 1,312			
	1A	7 (13.5)	140 (10.7)	0.524 1.30 (0.49-2.98)	-	-
	1A ¹⁰	1 (1.9)	22 (1.7)	0.594 1.15 (0.03-7.40)	-	-
<i>SFTPA1-SFTPA2</i>		N = 52	N = 1,312			
	6A-1A	7 (13.5)	51 (3.9)	0.005 [§] 3.85 (1.39-9.15)	0.0006 5.83(2.12-16.04)	0.012 3.16 (1.28-7.80)
	6A ³ -1A ¹	5 (9.6)	161 (12.3)	0.566 0.76 (0.23-1.94)	-	-

For allelic and haplotypic frequencies values are the number of chromosomes (%). Only relevant haplotypes are shown. CAP: Community Acquired Pneumonia; ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome.

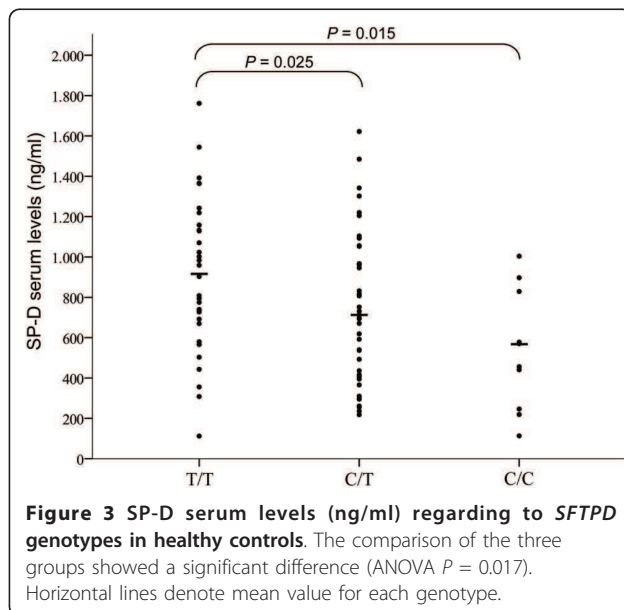
*Haplotypes for *SFTPA1* and *SFTPA2*, resulting from the different combinations of the three SNPs (Single nucleotide polymorphisms) studied at each gene, are denoted using the conventional nomenclature [15].

[†]P value for the bivariate comparison.

[‡]P value for multivariate analysis, including the variables age, gender, hospital of origin and co-morbidities. For those bivariate comparisons that resulted in non-significant differences, multivariate analysis were not calculated.

[§]P value for multivariate analysis, including the variables hospital of origin, PSI (Pneumonia Severity Index) and pathogen.

^{||}Pvalue by Fischer exact test.



haplotypes were also associated with a higher severity and poor outcome; MODS, ARDS, and mortality were selected because they represent the more severe clinical phenotypes. Particularly, $1A^{10}$ and $6A-1A$ were overrepresented among patients who died at 28 or 90 days, and they also predisposed to MODS and ARDS respectively. Likewise, $6A$ was associated with ARDS, and $1A$ was associated with MODS. By contrast, $6A^3$ and $6A^3-1A^1$ were underrepresented in patients who died. The *SFTPD aa11-C* allele was associated with the development of MODS and ARDS, but no significant effects on mortality were observed. In spite that the power of the test for some associations with outcome and severity were higher than 80% for the observed OR with a significance level of 5%, the number of individuals included in the analysis of outcome was relatively small. Consequently, associations with outcome should be interpreted with caution.

Only a few studies have addressed the role of the genetic variability at *SFTPA1*, and *SFTPA2* in infectious diseases [28-31]. In bacterial infections, homozygosity for the $1A^1$ haplotype was reported to be associated with meningococcal disease [30]. Noteworthy, $6A^2-1A^0$ was protective against acute otitis media (AOM) in children [32]. Haplotypes $6A^2$ and $1A^0$ may also be involved in protection against respiratory syncytial virus (RSV) disease [29,33]. Considering the high difference in the frequencies with the corresponding alternative alleles and haplotypes, it is tempting to speculate that $6A^2$, $1A^0$ and $6A^2-1A^0$ could have been maintained at high frequencies partly by their protective effect against respiratory infections. The $6A$ and $6A-1A$ haplotypes were found to be associated with an increased risk of wheeze and persistent cough, presumably triggered by respiratory infections or environmental

contaminants, among infants at risk for asthma [27]. Regarding SP-D, the *SFTPD aa11-T* allele was associated with severe RSV bronchiolitis [34], whereas the *SFTPD aa11-C* variant was associated with tuberculosis [30].

In sharp contrast to the potentially proinflammatory effects after PAMP recognition by collectins, mice deficient in SP-A or SP-D develop enhanced inflammatory pulmonary responses [35-37]. SP-A and SP-D play a dual role in the inflammatory response. They interact with pathogens via their CRD, and are recognized by calreticulin/CD91 on phagocytes through the N-terminal collagen domain, promoting phagocytosis and proinflammatory responses [10,13]. By contrast, binding of the CRD to signal inhibitory regulatory protein α (SIRP α) on alveolar macrophages suppresses NF- κ B activation and inflammation, allowing the lung to remain in a quiescent state during periods of health [10]. A similar dual effect is observed in the promotion or inhibition of apoptosis [12]. SP-A and SP-D can also inhibit inflammation by blocking, through the CRD, Toll-like receptors 2 and 4 [38,39]. In agreement with previous results [16], we have observed that the *SFTPD aa11-C* allele associates with significantly lower SP-D serum levels than the *aa11-T* allele, and this effect was dose-dependent. The *aa11-C/T* SNP, located in the N-terminal domain, influences oligomerization of SP-D and explains a significant part of the heritability of serum SP-D levels [16,40]. Serum from *aa11-C* homozygotes lack the highest molecular weight (m.w.) forms of the protein, which binds preferentially to complex microorganisms whereas the low m.w. SP-D preferentially binds LPS [16].

As a consequence of intracellular oligomerization, monomeric SP-A subunits fold into trimers, and supratrimeric assembly leads to high-order oligomers [41,42]. The degree of supratrimeric oligomerization is important for the host defense function [14,41,43-45]. SP-A1 and SP-A2 differ in only four amino acids (residues 66, 73, 81 and 85) located in the collagen domain [46]. In most functions examined, recombinant human (rh) SP-A2 shows higher biological activity than SP-A1 [14,41,47-50].

The significance and the nature of functional differences between variants at SP-A1 and SP-A2 are poorly understood [14,49,50]. Variants *aa50* (SP-A1) and *aa91* (SP-A2) are located in the collagen region. These changes may affect the oligomerization pattern and binding to receptors such as calreticulin/CD91 or the functional activity of the protein. Likewise, the variants *aa219* (SP-A1) and *aa223* (SP-A2) are located in the CRD, and might directly influence the binding properties to microorganisms or to surface receptors such as SIRP α or TLR4. Residue 9, and frequently residue 19, is located in the signal peptide, and it is not known whether these variants may affect the function of the protein

[14,44]. Alternatively all the missense variants could be in LD with SNPs in regulatory regions that might affect translation and RNA stability [51,52].

Native SP-A is thought to consist of hetero-oligomers of SP-A1 and SP-A2, and properties of co-expressed SP-A1/SP-A2 are between those of SP-A1 and SP-A2 [41,46]. However, the extent of oligomerization of SP-A, as well as the SP-A1/SP-A2 ratio, may be altered in various diseases and can vary among individuals [53,54]. The combination of both gene products may be important for reaching a fully native conformation [41]. In fact, it was recently shown that both SP-A1 and SP-A2 are necessary for the formation of pulmonary tubular myelin [55]. Therefore, the effect of a given haplotype may be largely influenced by haplotypes at the other gene. Our results suggest that the $6A^2$ to $1A^0$ haplotype is more protective against CAP than both $6A^2$ and $1A^0$.

It was previously reported that the *SFTPD aa11* SNP is in LD with *SFTPA1* and *SFTPA2* [25]. A protective effect of the $6A^2$ to $1A^0$ haplotype was even higher when this haplotype co-segregates with the *SFTPD aa11-C* allele. Likewise, one haplotype containing $6A^2$ - $1A^0$ and the *G* allele of the *SFTPD aa160* SNP could be protective against severe RSV disease [29]. Haplotypes at *SFTPA1* are in LD with *SFTPD aa11* in our population, but only a marginal LD between *SFTPA2* and *SFTPD aa11* was observed. In addition, no LD between $6A^2$ to $1A^0$ and *SFTPD aa11* was found in controls ($D' = 0.09$) or CAP patients ($D' = 0.024$) in our study. These findings suggest that the protective effect of the co-segregation of *SFTPD aa11-C* with $6A^2$ to $1A^0$ on CAP susceptibility may rather reflect genetic interactions. Alternatively, the *SFTPD aa11* SNP may be a marker of other SNPs in LD with *SFTPA1* and *SFTPA2*. The gene of another collecting, the mannose-binding lectin (MBL), is located at 10q11.2-q21. We have previously observed that MBL deficiency predisposes to higher severity and poor outcome in CAP [56], and LD of the SP genes with *MBL2* cannot be ruled out.

Despite modern antibiotics, CAP remains a common cause of death, and the search for new therapeutic approaches has been redirected into non-antibiotic therapies [57]. SP-A levels are reduced in several pulmonary diseases [58-60]. SP-D may also be reduced in some patients with ARDS [59]. In *Sftpa*^{-/-} and *Sftpd*^{-/-} mice, intratracheally administered SP-A or SP-D can restore microbial clearance and inflammation [8,35]. Exogenous surfactant preparation containing the hydrophobic SP-B and -C are nowadays widely used for replacement therapies in infantile RDS. In addition, intratracheal instillation of recombinant SP-C reduced mortality in patients with severe ARDS due to pneumonia or aspiration [61]. Some of the genetic variants analyzed in our survey, such as $1A^{10}$, although rare, may

have a high impact on susceptibility, severity and outcome of CAP. Validation of our results in other populations, and a better knowledge of the functional and clinical significance of the genetic variability at *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD* could be relevant for future investigations in the use of these collectins in the treatment of respiratory infectious diseases.

Conclusions

The surfactant proteins A1, A2 and D are key components of innate immune response and the anti-inflammatory status in the lung. Genetic variability at the genes of these collectins influences susceptibility and outcome of community-acquired pneumonia. These results could be relevant for future investigations in the use of these collectins in the treatment of respiratory infectious diseases.

Key messages

- The *SFTPA1* and *SFTPA2* haplotypes $6A^2$, $1A^0$ and $6A^2$ to $1A^0$, and the *SFTPD-SFTPA1-SFTPA2* haplotype *C-6A² to 1A⁰* are associated with a protective role against the development of Community-acquired pneumonia (CAP).
- $1A^{10}$ and $6A^3$ to $1A$ haplotypes are associated with increased susceptibility to CAP.
- Haplotypes $6A$ and $6A$ to $1A$ are associated with development of ARDS, while $1A$ and $1A^{10}$ are associated with MODS in patients with CAP.
- The variant *SFTPD aa11-C* leads to decreased SP-D serum levels, and predisposes to development of MODS and ARDS in patients with CAP.
- Haplotypes $6A^{12}$, $1A^{10}$ and $6A$ to $1A$ are overrepresented among patients who died at 28 or 90 days. By contrast, $6A^3$ and $6A^3$ to $1A^1$ are protective against 28-day and 90-day mortality.

Additional material

Additional file 1: Further description of methods, definitions and statistical analysis, and Tables E1-E4. The file contains additional information on exclusion criteria and definitions of PSI, ARDS and MODS. The statistical tests used are described. The additional file also includes four tables. Table E1 defines the resulting haplotypes from SNPs combination in *SFTPA1* and *SFTPA2* genes. Table E2 presents demographic and clinical characteristics of CAP patients. Table E3 shows the pairwise linkage disequilibrium measure for surfactant proteins A1, A2 and D alleles. Table E4 compares haplotypes of *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD* between patients with pneumococcal CAP and controls.

Abbreviations

AOM: acute otitis media; ARDS: acute respiratory distress syndrome; CAP: community-acquired pneumonia; CRD: carbohydrate-binding recognition domain; LD: linkage disequilibrium; MBL: mannose-binding lectin; MODS: multi-organ dysfunction syndrome; PAMP: pathogen-associated molecular pattern; PID: primary immunodeficiency; RSV: respiratory syncytial virus; SIRP:

signal inhibitory regulatory protein; SNP: single nucleotide polymorphism; SP: surfactant protein; TLR: toll-like receptor.

Acknowledgements

We are grateful to the patients and their families for their trust, as well as to the healthy volunteers. We also thank Ignacio Martin-Loeches, Ana Dominguez, Yanira Florido and Consuelo Ivañez for their invaluable help, and P. Mangiaracina for his assistance with the final editing of the English manuscript. The present study was supported by grants from "Fondo de Investigaciones Sanitarias", Ministerio de Sanidad (FIS 02/1620, 04/1190 and 06/1031) with the funding of European Regional Development Fund-European Social Fund (FEDER-FSE); "Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica" (SEPAR); RedRespira-ISCIII-RTIC-03/11; FUNCIS, Gobierno de Canarias (04/09); NGQ was supported by FUNCIS (INREDCAN 5/06), MIGL by FUNCIS (Proyecto Biorregion 2006) and EHR by a grant from Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Author details

¹Department of Immunology, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Barranco de la Ballena s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35010, Spain. ²Department of Respiratory Diseases, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Barranco de la Ballena s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35010, Spain. ³Department of Medical and Surgical Sciences, School of Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, Avenida Marítima del Sur s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35016, Spain. ⁴Intensive Care Unit, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Barranco de la Ballena s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35010, Spain. ⁵Department of Respiratory Diseases, Hospital Universitario de la Princesa, Diego de León 62, Madrid, 28005, Spain. ⁶Intensive Care Unit, Hospital Clínico y Universitario de Valencia, Avenida Blasco Ibáñez 17, Valencia, 46010, Spain. ⁷Department of Respiratory Diseases, Hospital San Jorge, Avenida Martínez de Velasco 36, Huesca, 22004, Spain. ⁸Department of Respiratory Diseases, Hospital Clínico y Universitario de Valencia, Avenida Blasco Ibáñez 17, Valencia, 46010, Spain. ⁹Department of Mathematics, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de Tafira, Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Spain. ¹⁰Intensive Care Unit, Hospital Dr. José Molina Orosa, Carretera Arrecife-Tinajo km 1.300, Lanzarote, 35550, Spain. ¹¹Hospital Vall d'Hebron - Universitat Autònoma de Barcelona. CIBERES. Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Passeig de la Vall d'Hebron 119-129, Barcelona, 08035, Spain.

Authors' contributions

MIGL did the genotyping and protein measurements, analyzed and interpreted the data, and contributed to the writing of the manuscript. FRC and JSV were responsible for the clinical evaluations of patients, samples and data collection, collaborated in designing the study, as well as contributed to the interpretation of data and the writing of the manuscript. OR, JB, LB, JA, MLB, JAMR, JMF and JR were also responsible for clinical evaluation of patients, samples and data collection. PS participated in the statistical analysis. NGQ, IS and EHR did genotyping. CRG conceived the study, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 21 September 2010 Revised: 20 December 2010

Accepted: 10 February 2011 Published: 10 February 2011

References

- Mandell LA, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM Jr, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG: **Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults.** *Clin Infect Dis* 2007, **44**:S27-72.
- Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E, Picard C, Puel A, Abel L, Casanova JL: **Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases.** *Curr Opin Immunol* 2008, **20**:39-48.
- Alcaïs A, Abel L, Casanova JL: **Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm.** *J Clin Invest* 2009, **119**:2506-2514.
- Wright JR: **Immunoregulatory functions of surfactant proteins.** *Nat Rev Immunol* 2005, **5**:58-68.
- Geertsma MF, Nibbering PH, Haagsman HP, Daha MR, van Furth R: **Binding of surfactant protein A to C1q receptors mediates phagocytosis of Staphylococcus aureus by monocytes.** *Am J Physiol* 1994, **267**:L578-L584.
- Haczku A: **Protective role of the lung collectins surfactant protein A and surfactant protein D in airway inflammation.** *J Allergy Clin Immunol* 2008, **122**:861-879.
- LeVine AM, Whitsett JA: **Pulmonary collectins and innate host defense of the lung.** *Microbes Infect* 2001, **3**:161-166.
- LeVine AM, Whitsett JA, Hartshorn KL, Crouch EC, Korfhagen TR: **Surfactant protein D enhances clearance of influenza A virus from the lung in vivo.** *J Immunol* 2001, **167**:5868-5873.
- Giannoni E, Sawa T, Allen L, Wiener-Kronish J, Hawgood S: **Surfactant proteins A and D enhance pulmonary clearance of Pseudomonas aeruginosa.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006, **34**:704-710.
- Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, Henson PM: **By binding SIRPa or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation.** *Cell* 2003, **155**:13-23.
- Sorensen GL, Husby S, Holmskov U: **Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease.** *Immunobiology* 2007, **212**:381-416.
- Janssen WJ, McPhillips KA, Dickinson MG, Linderman DJ, Morimoto K, Xiao YQ, Oldham KM, Vandivier RW, Henson PM, Gardai SJ: **Surfactant proteins A and D suppress alveolar macrophage phagocytosis via interaction with SIRPa.** *Am J Respir Crit Care Med* 2008, **178**:158-167.
- Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, Botto M, Henson PM, Greene KE: **Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex.** *J Immunol* 2002, **169**:3978-3986.
- Wang G, Bates-Kennedy SR, Tao JQ, Phelps DS, Floros J: **Differences in biochemical properties and in biological function between human SP-A1 and SP-A2 variants, and the impact of ozone-induced oxidation.** *Biochemistry* 2004, **43**:4227-4239.
- DiAngelo S, Lin Z, Wang G, Phillips S, Ramet M, Luo J, Floros J: **Novel, non-radioactive, simple and multiplex PCR-cRFLP methods for genotyping human SP-A and SP-D marker alleles.** *Dis Markers* 1999, **15**:269-281.
- Leth-Larsen R, Garred P, Jensenius H, Meschi J, Hartshorn K, Madsen J, Sørensen G, Crouch E, Holmskov U: **A common polymorphism in the SFTPD gene influences assembly, function, and concentration of surfactant protein D.** *J Immunol* 2005, **174**:1532-1538.
- Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, Coley CM, Marrie TJ, Kapoor WN: **A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia.** *N Engl J Med* 1997, **336**:243-250.
- Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R: **The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **149**:818-824.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.** *Chest* 1992, **101**:1644-1655.
- Pantelidis P, Lagan AL, Davies JC, Welsh KJ, du Bois RM: **A single round PCR method for genotyping human surfactant protein (SP)-A1, SP-A2 and SP-D gene alleles.** *Tissue Antigens* 2003, **61**:317-321.
- PHASE statistical software. [http://www.stat.washington.edu/stephens/phase.html].
- Excoffier L, Laval G, Schneider S: **Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis.** *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005, **1**:47-50.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: **Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps.** *Bioinformatics* 2005, **21**:263-265.
- The R Project for Statistical Computing. [http://www.R-project.org].
- Liu W, Bentley CM, Floros J: **Study of human SP-A, SP-B and SP-D loci: allele frequencies, linkage disequilibrium and heterozygosity in different races and ethnic groups.** *BMC Genet* 2003, **4**:13.
- Floros J, DiAngelo S, Koptides M, Karinch AM, Rogan PK, Nielsen H, Spragg RG, Watterberg K, Deiter G: **Human SP-A locus: allele frequencies**

- and linkage disequilibrium between the two surfactant protein A genes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, **15**:489-498.
27. Pettigrew MM, Gent JF, Zhu Y, Triche EW, Belanger KD, Holford TR, Bracken MB, Leaderer BP: Respiratory symptoms among infants at risk for asthma: association with surfactant protein A haplotypes. *BMC Med Genet* 2007, **8**:15-27.
 28. Löfgren J, Råmet M, Renko M, Marttila R, Hallman M: Association between surfactant protein A gene locus and severe respiratory syncytial virus infection in infants. *J Infect Dis* 2002, **185**:283-289.
 29. Thomas NJ, DiAngelo S, Hess JC, Fan R, Ball MW, Geskey JM, Willson DF, Floros J: Transmission of surfactant protein variants and haplotypes in children hospitalized with respiratory syncytial virus. *Pediatr Res* 2009, **66**:70-73.
 30. Floros J, Lin HM, García A, Salazar MA, Guo X, DiAngelo S, Montaña M, Luo J, Pardo A, Selman M: Surfactant protein genetic marker alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population. *J Infect Dis* 2000, **182**:1473-1478.
 31. Jack DL, Cole J, Naylor SC, Borrow R, Kaczmarek EB, Klein NJ, Read RC: Genetic polymorphism of the binding domain of surfactant protein-A2 increases susceptibility to meningococcal disease. *Clin Infect Dis* 2006, **43**:1426-1433.
 32. Råmet M, Löfgren J, Alho OP, Hallman M: Surfactant protein-A gene locus associated with recurrent otitis media. *J Pediatr* 2001, **138**:266-268.
 33. El Saleeby CM, Li R, Somes GW, Dahmer MK, Quasney MW, DeVincenzo JP: Surfactant protein A2 polymorphisms and disease severity in a respiratory syncytial virus-infected population. *J Pediatr* 2010, **156**:409-414.
 34. Lahti M, Löfgren J, Marttila R, Renko M, Kluuvuniemi T, Haataja R, Ramet M, Hallman M: Surfactant protein D gene polymorphism associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Res* 2002, **51**:696-699.
 35. Borron P, McIntosh JC, Korfhagen TR, Whitsett JA, Taylor J, Wright JR: Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production *in vivo*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **278**:L840-L847.
 36. Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, Clements J, Carlson E, Gillespie AM, Epstein C, Hawgood S: Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:11869-11874.
 37. Hawgood S, Ochs M, Jung A, Akiyama J, Allen L, Brown C, Edmondson J, Levitt S, Carlson E, Gillespie AM, Villar A, Epstein CJ, Poulain FR: Sequential targeted deficiency of SP-A and -D leads to progressive alveolar lipoproteinosis and emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, **283**:L1002-L1010.
 38. Murakami S, Iwaki D, Mitsuzawa H, Sano H, Takahashi H, Voelker DR, Akino T, Kuroki Y: Surfactant protein A inhibits peptidoglycan-induced tumor necrosis factor- α secretion in U937 cells and alveolar macrophages by direct interaction with toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 2002, **277**:6830-6837.
 39. Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M: Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2002, **168**:5989-5992.
 40. Sørensen GL, Hjelmborg JB, Kyvik KO, Fenger M, Høj A, Bendixen C, Sørensen TI, Holmskov U: Genetic and environmental influences of surfactant protein D serum levels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006, **290**:L1010-L1017.
 41. Sánchez-Barbero F, Rivas G, Steinhilber W, Casals C: Structural and functional differences among human surfactant proteins SP-A1, SP-A2 and co-expressed SP-A1/SP-A2: role of supratrimeric oligomerization. *Biochem J* 2007, **406**:479-489.
 42. Voss T, Eistetter H, Schafer KP, Engel J: Macromolecular organization of natural and recombinant lung surfactant protein SP 28-36. Structural homology with the complement factor C1q. *J Mol Biol* 1988, **201**:219-227.
 43. Sánchez-Barbero F, Strassner J, García-Cañero R, Steinhilber W, Casals C: Role of the degree of oligomerization in the structure and function of human surfactant protein A. *J Biol Chem* 2005, **280**:7659-7670.
 44. Wang G, Myers C, Mikerov A, Floros J: Effect of cysteine 85 on biochemical properties and biological function of human surfactant protein A variants. *Biochemistry* 2007, **46**:8425-8435.
 45. Yamada C, Sano H, Shimizu T, Mitsuzawa H, Nishitani C, Himi T, Kuroki Y: Surfactant protein A directly interacts with TLR4 and MD-2 and regulates inflammatory cellular response. Importance of supratrimeric oligomerization. *J Biol Chem* 2006, **281**:21771-21780.
 46. Floros J, Hoover RR: Genetics of the hydrophilic surfactant proteins A and D. *Biochim Biophys Acta* 1998, **1408**:312-322.
 47. García-Verdugo I, Wang G, Floros J, Casals C: Structural analysis and lipid-binding properties of recombinant human surfactant protein a derived from one or both genes. *Biochemistry* 2002, **41**:14041-14053.
 48. Oberley RE, Snyder JM: Recombinant human SP-A1 and SP-A2 proteins have different carbohydrate-binding characteristics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, **284**:L871-L881.
 49. Wang G, Phelps DS, Umstead TM, Floros J: Human SP-A protein variants derived from one or both genes stimulate TNF- α production in the THP-1 cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **278**:L946-L954.
 50. Mikerov AN, Wang G, Umstead TM, Zacharatos M, Thomas NJ, Phelps DS, Floros J: Surfactant protein A2 (SP-A2) variants expressed in CHO cells stimulate phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* more than do SP-A1 variants. *Infect Immun* 2007, **75**:1403-1412.
 51. Wang G, Guo X, Floros J: Differences in the translation efficiency and mRNA stability mediated by 5'-UTR splice variants of human SP-A1 and SP-A2 genes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, **289**:L497-L508.
 52. Wang G, Guo X, Floros J: Human SP-A 3'-UTR variants mediate differential gene expression in basal levels and in response to dexamethasone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, **284**:L738-L748.
 53. Tagaram HR, Wang G, Umstead TM, Mikerov AN, Thomas NJ, Graff GR, Hess JC, Thomassen MJ, Kavuru MS, Phelps DS, Floros J: Characterization of a human surfactant protein A1 (SP-A1) gene-specific antibody: SP-A1 content variation among individuals of varying age and pulmonary health. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, **292**:L1052-L1063.
 54. Hickling TP, Malhotra R, Sim RB: Human lung surfactant protein A exists in several different oligomeric states: oligomer size distribution varies between patient groups. *Mol Med* 1998, **4**:266-275.
 55. Wang G, Guo X, DiAngelo S, Thomas NJ, Floros J: Humanized SFTPA1 and SFTPA2 transgenic mice reveal functional divergence of SP-A1 and SP-A2: Formation of tubular myelin *in vivo* requires both gene products. *J Biol Chem* 2010, **285**:11998-12010.
 56. García-Laorden MI, Sole-Violan J, Rodríguez de Castro F, Aspa J, Briones ML, García-Saavedra A, Rajas O, Blanquer J, Caballero-Hidalgo A, Marcos-Ramos JA, Hernandez-Lopez J, Rodriguez-Gallego C: Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. *J Allergy Clin Immunol* 2008, **122**:368-374.
 57. Rodríguez A, Lisboa T, Blot S, Martin-Loeches I, Solé-Violan J, De Mendoza D, Rello J, Community-Acquired Pneumonia Intensive Care Units (CAPUCI) Study Investigators: Mortality in ICU patients with bacterial community-acquired pneumonia: when antibiotics are not enough. *Intensive Care Med* 2009, **35**:430-438.
 58. Pison U, Obertacke U, Brand M, Seeger W, Joka T, Bruch J, Schmit-Neuerburg KP: Altered pulmonary surfactant in uncomplicated and septicemia-complicated courses of acute respiratory failure. *J Trauma* 1990, **30**:19-26.
 59. Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, Hull W, Whitsett JA, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD, Martin TR: Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **160**:1843-1850.
 60. Noah TL, Murphy PC, Alink JJ, Leigh MW, Hull WM, Stahlman MT, Whitsett JA: Bronchoalveolar lavage fluid surfactant protein-A and surfactant protein-D are inversely related to inflammation in early cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **168**:685-691.
 61. Taut FJ, Rippin G, Schenk P, Findlay G, Wurst W, Häfner D, Lewis JF, Seeger W, Günther A: A Search for subgroups of patients with ARDS who may benefit from surfactant replacement therapy: a pooled analysis of five studies with recombinant surfactant protein-C surfactant (Venticute). *Chest* 2008, **134**:724-732.

doi:10.1186/cc10030

Cite this article as: García-Laorden *et al.*: Influence of genetic variability at the surfactant proteins A and D in community-acquired pneumonia: a prospective, observational, genetic study. *Critical Care* 2011 **15**:R57.

RESEARCH

Open Access

Surfactant protein A genetic variants associate with severe respiratory insufficiency in pandemic influenza A virus infection

Estefanía Herrera-Ramos^{1,2}, Marta López-Rodríguez¹, José Juan Ruíz-Hernández³, Juan Pablo Horcajada^{4,5}, Luis Borderías⁶, Elisabeth Lerma⁴, José Blanquer⁷, María Carmen Pérez-González⁸, María Isabel García-Laorden^{1,9}, Yanira Florido^{1,2}, Virginia Mas-Bosch¹⁰, Milagro Montero⁴, José María Ferrer¹¹, Luisa Sorlí⁴, Carlos Vilaplana¹⁰, Olga Rajas¹², Marisa Briones¹³, Javier Aspa¹², Eduardo López-Granados¹⁴, Jordi Solé-Violán¹¹, Felipe Rodríguez de Castro^{2,15} and Carlos Rodríguez-Gallego^{1,2*}

Abstract

Introduction: Inherited variability in host immune responses influences susceptibility and outcome of Influenza A virus (IAV) infection, but these factors remain largely unknown. Components of the innate immune response may be crucial in the first days of the infection. The collectins surfactant protein (SP)-A1, -A2, and -D and mannose-binding lectin (MBL) neutralize IAV infectivity, although only SP-A2 can establish an efficient neutralization of poorly glycosylated pandemic IAV strains.

Methods: We studied the role of polymorphic variants at the genes of MBL (*MBL2*), SP-A1 (*SFTPA1*), SP-A2 (*SFTPA2*), and SP-D (*SFTPD*) in 93 patients with H1N1 pandemic 2009 (H1N1pdm) infection.

Results: Multivariate analysis showed that two frequent *SFTPA2* missense alleles (rs1965708-C and rs1059046-A) and the *SFTPA2* haplotype *1A*⁰ were associated with a need for mechanical ventilation, acute respiratory failure, and acute respiratory distress syndrome. The *SFTPA2* haplotype *1A*¹ was a protective variant. Kaplan-Meier analysis and Cox regression also showed that diplotypes not containing the *1A*¹ haplotype were associated with a significantly shorter time to ICU admission in hospitalized patients. In addition, rs1965708-C ($P = 0.0007$), rs1059046-A ($P = 0.0007$), and haplotype *1A*⁰ ($P = 0.0004$) were associated, in a dose-dependent fashion, with lower PaO₂/FiO₂ ratio, whereas haplotype *1A*¹ was associated with a higher PaO₂/FiO₂ ratio ($P = 0.001$).

Conclusions: Our data suggest an effect of genetic variants of *SFTPA2* on the severity of H1N1pdm infection and could pave the way for a potential treatment with haplotype-specific (*1A*¹) SP-A2 for future IAV pandemics.

Introduction

Influenza A virus (IAV) infection is usually a mild and self-limited condition. Likewise, infection with the H1N1 pandemic 2009 (H1N1pdm) IAV often results in an uncomplicated flu, but, in a small subset of patients, it may rapidly evolve to primary viral pneumonia, acute respiratory failure (ARF), and acute respiratory distress

syndrome (ARDS) [1]. Inherited and acquired variability in host immune responses may influence susceptibility and outcome of IAV infection, although these factors remain largely unknown [2-4].

Before exposure to H1N1pdm IAV, most individuals, particularly those born after 1957, lack serum antibodies capable of neutralizing the virus [1]. Adaptive immune responses, which are needed for ultimate viral clearance, take several days to develop. Therefore, components of the innate immunity that are able to neutralize IAV infection with minor inflammation may be crucial for host defense in the first few days after infection. Different soluble pattern-recognition molecules of the innate immunity

* Correspondence: jrodgal@gobiernodecanarias.org

¹Department of Immunology, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria 35010, Spain

²Department of Medical and Surgical Sciences, School of Medicine, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria 35016, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

can neutralize IAV infection. Several secreted human C-type lectins of the collectin family, the serum mannose-binding lectin (MBL), the pulmonary surfactant proteins (SP) –A1, –A2, and –D, and collectin 11 (CL-11, alias collectin kidney 1, CL-K1) may neutralize IAV infectivity *in vitro* [5-8]. Among these collectins, the SPs have been shown to exert an important role against IAV infection in animal models: mice lacking SP-A or SP-D have increased susceptibility to IAV infection, and their role seem to depend on IAV strains, particularly pandemic versus seasonal strains [9-14]. In addition, variability at the collectin genes, *MBL2* (Ensembl: ENSG00000165471), *SFTPA1* (Ensembl: ENSG00000122852), *SFTPA2* (Ensembl: ENSG00000185303), and *SFTPD* (Ensembl: ENSG00000133661) have been found to be associated with susceptibility to and/or severity of several bacterial and viral infectious diseases [6,15].

It hence follows that these collectins are firm candidates to explain, at least in part, the role of host genetic variability in the defense against IAV infection. The human SP-A locus consists of two similar genes, *SFTPA1* and *SFTPA2*, localized within a cluster (10q21-24) that includes the SP-D gene (*SFTPD*) [16]. *MBL2* was reported not to be in physical linkage with the genes of these SPs [17], but linkage disequilibrium of *MBL2* with *SFTPA1* and *SFTPA2* has been shown; and LD among variants at these genes could influence the results of genetic-association studies [6,18,19].

In the present study, we assessed the role of variants at the *SFTPA1*, *SFTPA2*, and *SFTPD* genes in H1N1pdm IAV infection in humans. Variants at the neighbor collectin gene *MBL2* were also analyzed.

Materials and methods

H1N1pdm-infected patients

We recruited 124 patients with H1N1pdm infection between July 2009 and November 2011. Thirty-one individuals with ancestors other than Spanish were excluded. Of 93 unrelated white Spanish patients, 70 were hospitalized at five tertiary Spanish hospitals, and 23 were attended at primary care centers (Figure 1). Data and samples from all ambulatory patients and from 30% of hospitalized individuals were retrospectively obtained; in the remaining patients, data were obtained prospectively. All patients were treated with oseltamivir, and only one patient had been previously vaccinated against H1N1pdm.

Diabetes, previous lung disease, solid-organ transplantation, immunosuppression, body mass index (BMI) ≥ 30 , human immunodeficiency virus (HIV) infection, and pregnancy were considered risk factors. Sepsis, septic shock, and multiorgan dysfunction syndrome (MODS) were defined by using the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine criteria [20]. ARF and ARDS were diagnosed according to the American European Consensus Conference Definition [21]. Functional parameters of gas exchange were calculated on the basis of the ratio of oxygen arterial pressure to oxygen inspiratory fraction ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$). In hospitalized patients without arterial blood gas analysis ($n = 18$), ARF was established when hemoglobin oxygen saturation, breathing room air, was lower than 90%. In patients with intensive care unit (ICU) admission, severity of illness was evaluated with the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score, taking the worst reading of the first 24 hours in the ICU.

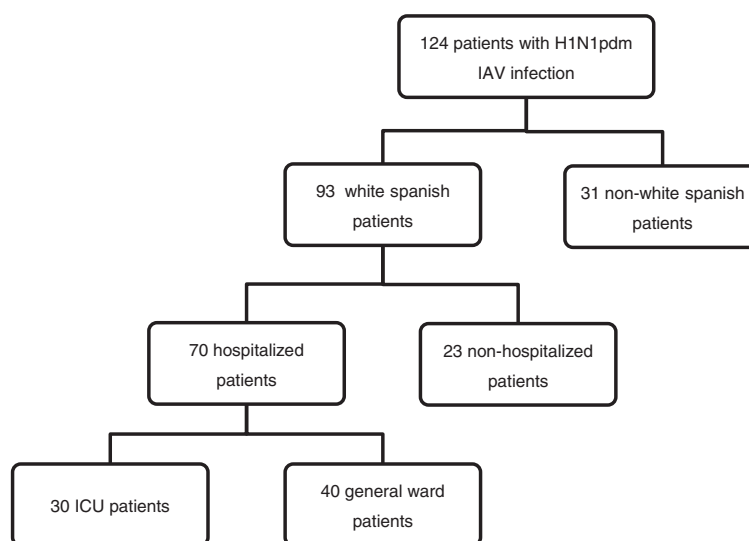


Figure 1 Selection process for patients with H1N1pdm 2009 infection. Infection by H1N1pdm was confirmed in all the 124 patients.

All steps were performed in complete accordance to the Helsinki declaration. The protocol was approved by Clinical Research Ethics Committees (CEIC) of hospitals involved (CEIC Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canaria; CEIC Hospital San Jorge, Huesca and CEIC Hospital Clínico y Universitario de Valencia, Valencia). Informed consent was obtained of all patients included.

Detection of H1N1pdm by real-time polymerase chain reaction

Influenza A H1N1 virus in the 124 patients was detected in nasopharyngeal swabs by using the Real-Time ready Influenza A (H1N1) Detection Set (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to manufacturer's protocol.

General Spanish-population subjects

The general population group consisted of white unrelated Spanish healthy volunteers (blood and bone marrow donors as well as hospital staff) from four tertiary Spanish hospitals. The control group was analyzed for *MBL2* ($n = 1,736$) and *SFTPA1* and *SFTPA2* ($n = 769$) polymorphisms in previous studies [18,19]. For the nine *SFTPD* variants under study, 963 individuals from the general population group recruited at the same hospitals were analyzed in this study. The protocol was approved by Clinical Research Ethics Committees (CEIC) of hospitals involved (CEIC Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canaria; CEIC Hospital de la Princesa, Madrid; CEIC Hospital San Jorge, Huesca and CEIC Hospital Clínico y Universitario de Valencia, Valencia). Informed consent was obtained of the general-population individuals included. No data about whether individuals from the general Spanish population group were or were not infected with H1N1pdm were available. Foreigners and individuals with ancestors other than Spanish were previously excluded.

Selection of single-nucleotide polymorphisms

Deficient and low MBL serum levels are mainly due to the presence of three common point mutations in the exon 1 of the *MBL2* gene: alleles *B* (rs1800450), *C* (rs1800451), and *D* (rs5030737) are termed *O* alleles, *A* being the wild-type. Serum MBL levels are very low or absent in individuals homozygous for *O* alleles. In addition, the presence of the promoter allele *X* (rs7096206) has an important down-regulating effect, and individuals with *XA/O* also have very low MBL serum levels. *O/O* together with *XA/O* genotypes are considered MBL-deficient genotypes, which are common in most populations.

The human SP-A locus consists of two similar genes, *SFTPA1* and *SFTPA2*, located on chromosome 10q22.3,

within a cluster that includes the SP-D gene (*SFTPD*). In addition, a certain degree of linkage disequilibrium (LD) exists among SP genes and the *MBL* gene (10q21-24) [18,19]. On the basis of the existence of several SNPs, SP-A haplotypes are conventionally denoted as 6Aⁿ for the *SFTPA1* gene (V19A, rs1059047; L50V, rs1136450; R219W, rs4253527) and 1Aⁿ for the *SFTPA2* gene (T9N, rs1059046; A91P, rs17886395; Q223K, rs1965708) [22]. These missense single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at *SFTPA1* and *SFTPA2* were analyzed in our study. The most frequent conventional haplotypes of these genes, except 1A and 1A⁵, can be unambiguously identified.

For the analysis of *SFTPD*, genotypic data of individuals of European ancestry (CEU) from the International HapMap Project [23] were used to select LD tagging SNPs. Pairwise LD-tagging was achieved with Haploview v. 4.2 [24] for SNPs with a minimum minor allele frequency of 0.05 and r^2 of 0.8. As result, three intronic SNPs (rs10887199, rs7078012, and rs723192) and one synonymous SNP (rs6413520) were selected. Three missense SNPs were also analyzed: rs3088308 (S290T), rs2243639 (T180A), and rs721917 (M31T). Additionally, we studied an SNP in the *SFTPD* promoter region (rs1885551) that was recently reported to have a profound impact on serum SP-D levels [25] and an intronic SNP (rs17886286) associated with susceptibility to invasive pneumococcal disease [26].

DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was extracted from 400 μ l of peripheral blood by using iPrep PureLink gDNA Blood kit in the iPrep Purification Instrument (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Extracted DNA integrity was checked by NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). In total, 19 polymorphisms at *MBL2*, *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD* were studied.

MBL2, *SFTPA1*, *SFTPA2*, and *SFTPD* rs721917 SNPs were analyzed by means of PCR-RFLP and PCR-SSP techniques, as previously described [18,19]. The other eight SNPs of *SFTPD* were determined by predesigned Taqman SNP genotyping assays (Assays IDs: C_26726209_10, C_26726205_10, C_31530298_10, C_63652102_10, C_29213175_10, C_1362981_20, C_630297_10, and C_12124527_20), according to the manufacturer's protocol, with commercially available reagents by means of ViiA[™]7 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Data analysis

The Hardy-Weinberg equilibrium was analyzed with Haploview v. 4.2. Haplotypes were estimated *in silico* with PHASE v. 2.1.1 under 1,000 permutations. Statistical analyses were performed by using SPSS 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). The comparison of all genotype

distributions based on susceptibility and severity was performed by using the χ^2 test or Fisher Exact test when needed, and odds ratios with 95% confidence intervals were calculated. The relation between severity in hospitalized patients and genotypes was evaluated by binary logistic regression models: age, gender, risk factors, and secondary infection (either bacteremia or secondary bacterial pneumonia) were included as independent variables.

Comparison of the PaO₂/FiO₂ ratio according to genetic variants was performed by a using linear regression model adjusted by age, gender, risk factors, and secondary infection (either bacteremia or secondary bacterial pneumonia).

To assess the need for ICU admission, a multivariate analysis was performed, including the aforementioned variables, by conditional logistic regression stratified by hospital of origin.

Log-rank (LR) χ^2 tests were calculated to compare ICU admission according to the distribution of genetic variants. Cox proportional hazard ratios adjusted for the independent variables age, gender, risk factors, development of secondary bacterial infection (pneumonia or bacteremia), and hospital of origin were also performed.

Results

Demographic and clinical characteristics of patients are shown in Table 1. The genotype distribution of SNPs did not differ significantly under conditions of Hardy-Weinberg equilibrium in all of the groups studied (data not shown). Frequencies of the genetic variants under analysis were not found to be significantly different between H1N1pdm-infected patients and the general population (Table 2).

When severity of infection was evaluated in hospitalized patients (n = 70) (Table 3), we observed that two missense variants at *SFTPA2* (rs1965708-C and rs1059046-A) were significantly associated with the need for mechanical ventilation (MV) and with development of ARF and ARDS. Most of these associations remained significant after multivariate analysis adjusted for age, gender, risk factors, and secondary infection (either bacteremia or secondary bacterial pneumonia). The alleles rs1965708-C and rs1059046-A were overrepresented in patients requiring MV ($P = 0.003$; OR, 2.43; and $P = 0.016$; OR, 3.71, respectively), and in those who developed ARF ($P = 0.006$; OR, 4.09; and $P = 0.005$; OR, 3.70, respectively) or ARDS ($P = 0.006$; OR, 17.68; and $P = 0.016$; OR, 3.71, respectively). The variant rs1965708-C was also associated with septic shock ($P = 0.007$; OR, 17.16). The *SFTPA1* allele rs1136450-G was also associated, although to a lower extent, with the development of ARF ($P = 0.038$; OR, 2.64) and the use of MV ($P = 0.040$; OR, 2.55); these associations may be secondary to the existence of LD between *SFTPA1* and *SFTPA2* variants (Figure 2).

Table 1 Demographic and clinical characteristics of H1N1pdm-infected patients

Characteristics	Subjects	
Age (years)	43.5 ± 18.0 ^a	
Gender (male)	52	(55.9)
Hospital admission		
No	23	(24.7)
Yes	70	(75.3)
PVP		
No	40	(43.0)
Yes	53	(57.0)
ICU admission		
No	63	(67.7)
Yes	30	(32.3)
ARF		
No	45	(48.4)
Yes	48	(51.6)
Shock		
No	77	(82.8)
Yes	16	(17.2)
ARDS		
No	77	(82.8)
Yes	16	(17.2)
MODS		
No	87	(93.5)
Yes	6	(6.5)
MV		
No	69	(74.2)
Yes	24	(25.8)
Hospital mortality		
No	89	(95.7)
Yes	4	(4.3)
Risk factor		
No	32	(34.4)
Yes	61	(65.6)
Secondary bacterial infection ^b		
No	80	(86.0)
Yes	13	(14.0)

ARDS, acute respiratory distress syndrome; ARF, acute respiratory failure; ICU, intensive care unit; MODS, multiorgan dysfunction syndrome; MV, mechanical ventilation; PVP, Primary viral pneumonia.

^aData are presented as mean ± SD or number of individuals (%). ^bTen patients had secondary bacterial pneumonia, and seven patients had bacteremia (four of them with secondary bacterial pneumonia).

When haplotypes, based on combinations of missense SNP, were analyzed (Table 4), the *SFTPA2* haplotype 1A⁰ was found to be associated with the need for MV and with the development of ARF and ARDS in hospitalized patients. These differences were found to be independent of age,

Table 2 Distribution of genotype frequencies of collectin genes in general Spanish population and H1N1pdm-infected patients

Variants	Genotypes	General Spanish population <i>n</i> = 1736	H1N1pdm-infected patients <i>n</i> = 93
MBL2^a			
rs1800451 (G57E)			
rs1800450 (G54D)	AA/AO/OO	1,032 (59.4)/615(35.4)/89 (5.1)	54 (58.1)/36 (38.7)/3 (3.2)
rs5030737 (R52C)			
rs7096206 (Prom)			
MBL deficiency	AA + YAO/XAO + OO	1,475 (85.0)/261 (15.0)	77 (82.8)/16 (17.2)
SFTPA2			
rs1965708 (Q223K)	AA/CA/CC	22 (2.9)/244 (31.7)/503 (65.4)	4 (4.3)/33 (35.5)/56 (60.2)
rs17886395 (A91P)	GG/GC/CC	623 (81.0)/134 (17.4)/12 (1.6)	72 (77.4)/19 (20.4)/2(2.2)
rs1059046 (T9N)	CC/AC/AA	97 (12.6)/349 (45.4)/323 (42.0)	14 (15.1)/48 (51.6)/31 (33.3)
SFTPA1			
rs1059047 (V19A)	TT/TC/CC	680 (88.4)/88 (11.4)/1 (0.1)	82 (88.2)/10 (10.8)/1 (1.1)
rs1136450 (L50V)	CC/GC/GG	117 (15.2)/334 (43.4)/318 (41.4)	12 (12.9)/48 (51.6)/33 (35.5)
rs4253527 (R219W)	CC/CT/TT	620 (80.6)/142 (18.5)/7 (0.9)	76 (81.7)/16 (17.2)/1 (1.1)
SFTPD			
rs3088308 (S290T)	AA/AT/TT	829 (86.1)/129 (13.4)/5 (0.5)	77 (82.8)/14 (15.1)/2 (2.1)
rs2243639 (T180A)	TT/TC/CC	373 (38.7)/449 (46.6)/141 (14.6)	42 (45.2)/42 (45.2)/9 (9.6)
rs10887199 (Intr)	TT/TC/CC	759 (78.8)/189 (19.6)/15 (1.6)	71 (76.3)/20 (21.5)/2 (2.2)
rs17886286 (Intr)	CC/CG/G	828 (86.0)/126 (13.1)/9 (0.9)	79 (85.0)/13 (14.0)/1 (1.0)
rs7078012 (Intr)	CC/CT/TT	629 (65.3)/292 (30.3)/42 (4.4)	52 (55.)/38 (40.9)/3(3.2)
rs6413520 (S45S)	AA/AG/GG	824 (85.6)/134 (13.9)/5 (0.5)	82 (88.2)/11 (11.8)/0 (0.0)
rs721917 (M31T)	TT/TC/CC	356 (37.0)/438 (45.5)/169 (17.5)	36 (38.7)/38 (40.9)/19 (20.4)
rs723192 (Intr)	CC/CT/TT	757 (78.6)/195 (20.3)/11 (1.1)	70 (75.3)/21 (22.6)/2 (2.1)
rs1885551 (Prom)	AA/AG/GG	766 (79.5)/182 (18.9)/15 (1.6)	72 (77.4)/19 (20.4)/2 (2.2)

^aO/O together with XA/O genotypes are considered MBL-deficient genotypes. Intr, intronic region; Prom, promoter region. SNPs were added on the basis of chromosome position.

gender, risk factors, and secondary infection (either bacteremia or secondary bacterial pneumonia) in multivariate analysis: $P = 0.003$ (data in Table 4), OR 3.73; $P = 0.022$; OR, 2.81; and $P = 0.016$; OR, 3.41, for the need for MV, ARF, and ARDS comparisons, respectively. By contrast, the *SFTPA2* haplotype $1A^1$ was found to be protective in a dominant model against the requirement for MV and the development of ARF and ARDS in the multivariate analysis ($P = 0.015$; OR, 0.16; $P = 0.005$; OR, 0.21; and $P = 0.021$; OR, 0.12).

As an additional measurement of severity, we analyzed the need for ICU admission in hospitalized patients. The variants rs1965708-*C* and rs1059046-*A* were associated with a higher rate of ICU admission, although only rs1965708-*C* remained significant after conditional logistic regression adjustment for the previously mentioned variables and stratified by hospital of origin ($P = 0.031$; OR, 2.43) (Table 3). The same analysis remained significant at *SFTPA2* haplotype $1A^1$ in a dominant model ($P = 0.029$;

OR, 0.32) (Table 4). It is noteworthy that Kaplan-Meier analysis and the log-rank test showed that the variants rs1965708-*C* and rs1059046-*A* were associated with a significantly shorter time to ICU admission in hospitalized patients (Figure 3). The same analysis also showed that ICU admission was less frequently required among patients with the haplotype $1A^1$, and this difference was readily detected in the first days after hospitalization. The effect of these variants at the time of ICU admission remained significant in Cox regression.

We finally evaluated the influence of genetic variants of *SFTPA1* and *SFTPA2* on respiratory gas exchange in 52 hospitalized patients. *SFTPA2* alleles (rs1965708-*C* and rs1059046-*A*) and haplotypes ($1A^0$) predisposing to increased severity were found to be associated with significantly lower PaO₂/FiO₂ ratios, independent of age, gender, risk factors, secondary bacterial pneumonia, and bacteremia (Figure 4). Interestingly, the effect of these alleles or haplotypes was found to be dependent on the

Table 3 Severity of H1N1pdm infection in hospitalized patients regarding missense single-nucleotide polymorphisms of *SFTPA2* and *SFTPA1*

					Statistical significance			
					<i>P</i> ^a	<i>P</i> ^b	<i>P</i> ^a	<i>P</i> ^b
					OR (95% CI)	OR (95% CI)	OR (95% CI)	OR (95% CI)
Polymorphism	Genotype frequencies				Genotype comparisons		Allele comparisons	
rs1965708 (Q223K)	CC	CA	AA	CC vs CA + AA		C vs A		
ARF	48	33 (0.69)	15 (0.31)	0 (0.00)	0.027	0.018	0.006	0.006
No ARF	22	9 (0.41)	10 (0.46)	3 (0.14)	3.18 (1.12-9.01)	5.40 (1.34-21.71)	3.09 (1.35-7.04)	4.09 (1.5-11.13)
ARDS	16	14 (0.88)	2 (0.13)	0 (0.00)	0.018 ^c	0.017	0.014	0.006
No ARDS	54	28 (0.52)	23 (0.43)	3 (0.06)	6.45 (1.35-31.25)	7.81 (1.45-42.05)	5.51 (1.24-24.51)	17.68 (2.25-138.57)
Shock	16	14 (0.88)	2 (0.13)	0 (0.00)	0.018 ^c	0.018	0.014	0.007
No shock	54	28 (0.52)	23 (0.43)	3 (0.06)	6.45 (1.35-31.25)	7.64 (1.41-41.44)	5.51 (1.24-24.51)	17.16 (2.17-135.70)
MV	24	20 (0.83)	4 (0.17)	0 (0.00)	0.004	0.007	0.004	0.003
No MV	46	22 (0.48)	21 (0.46)	3 (0.07)	5.46 (1.61-18.47)	18.60 (2.23-155.24)	4.57 (1.49-13.97)	12.78 (2.39-68.42)
ICU ^e	30	23 (0.77)	7 (0.23)	0 (0.00)	0.014	0.019	0.010	0.031
No ICU ^e	40	19 (0.48)	18 (0.45)	3 (0.08)	3.64 (1.27-10.42)	2.98 (1.19-7.46)	3.25 (1.29-8.16)	2.43 (1.09-5.45)
rs1059046 (T9N)	AA	AC	CC	AA vs AC + CC		A vs C		
ARF	48	20 (0.42)	24 (0.50)	4 (0.08)	0.020	0.011	0.017	0.005
No ARF	22	3 (0.14)	14 (0.64)	5 (0.23)	4.52 (1.18-17.24)	8.02 (1.61-39.98)	2.40 (1.16-4.98)	3.70 (1.48-9.30)
ARDS	16	9 (0.56)	6 (0.38)	1 (0.06)	0.023	0.014	-	0.016
No ARDS	54	14 (0.26)	32 (0.59)	8 (0.15)	3.68 (1.15-11.77)	5.47 (1.42-21.13)	-	3.71 (1.28-10.72)
MV	24	11 (0.46)	12 (0.50)	1 (0.04)	-	0.039	-	0.016
No MV	46	12 (0.26)	26 (0.57)	8 (0.17)	-	3.59 (1.07-12.10)	-	2.97 (1.22-7.19)
ICU ^e	30	14 (0.47)	14 (0.47)	2 (0.07)	0.033	-	0.036	-
No ICU ^e	40	9 (0.23)	24 (0.60)	7 (0.18)	3.01 (1.07-8.48)	-	2.11 (1.04-4.27)	-
rs1136450 (L50V)	GG	GC	CC	CC vs GC + GG		G vs C		
ARF	48	21 (0.44)	25 (0.52)	2 (0.04)	0.028 ^c	0.019	0.024	0.038
No ARF	22	5 (0.23)	12 (0.55)	5 (0.23)	6.77 (1.20-38.22)	19.80 (1.64-238.70)	2.31 (1.11-4.81)	2.60 (1.05-6.42)
MV	24	11 (0.46)	13 (0.54)	0 (0.00)	0.044	-	-	0.040
No MV	46	15 (0.33)	24 (0.52)	7 (0.15)	1.62 (1.33-1.96)	-	-	2.55 (1.04-6.22)

^a P value for the bivariate comparison calculated with the χ^2 test. ^b P value for the multivariate analysis calculated with binary logistic regression, including the variables age, gender, risk factors, secondary bacterial pneumonia, and bacteremia. ^c P value by Fisher Exact test. ^d P value for the multivariate analysis calculated with binary logistic regression, including the variables age, gender, risk factors, and secondary bacterial pneumonia (bacteremia variable was excluded because it shows a co-linear relation with the variable mechanical ventilation). ^ePatients who required (ICU) or did not require (No ICU) ICU admission, P value for the multivariate analysis calculated with conditional logistic regression stratified by hospital of origin, including the co variables age, gender, risk factors, secondary bacterial pneumonia, and bacteremia. Only those comparisons with $P < 0.05$ and significant odds ratios were included. OR (95% CI), Odds ratio (95% confidence interval); ARF, acute respiratory failure; ARDS, acute respiratory distress syndrome; MV, mechanical ventilation; ICU, intensive care unit.

number of alleles present in a genotype or diplotype: $P = 0.0007$, $P = 0.0007$ and $P = 0.0004$ for rs1965708-C, rs1059046-A, and $1A^0$ respectively. The $1A^1$ haplotype, which was associated with lesser severity, was also associated with higher $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratios ($P = 0.0007$), and this effect was also found to be dose-dependent in a linear regression model adjusted for the same independent variables ($P = 0.0014$) (Figure 4).

Discussion

Glycosylation of hemagglutinins may be an important mechanism by which IAV can evade recognition by

antibodies in an immune population. By contrast, glycosylation of hemagglutinins is important in determining sensitivity of IAV to recognition by collectins [7,27]. SP-D and MBL bind to mannose-rich glycans on the hemagglutinins and neuraminidase glycoproteins of IAV, agglutinating viral particles and inhibiting infectivity and neuraminidase activity [7]. Among the known human collectins, SP-D has the strongest *in vitro* capability of aggregating and neutralizing activity of IAV [7,12,27]. Hemagglutinins from all available strains of pandemic influenza viruses show significantly lower glycosylation sites compared with seasonal strains; and pandemic viruses, particularly H1N1pdm, were found

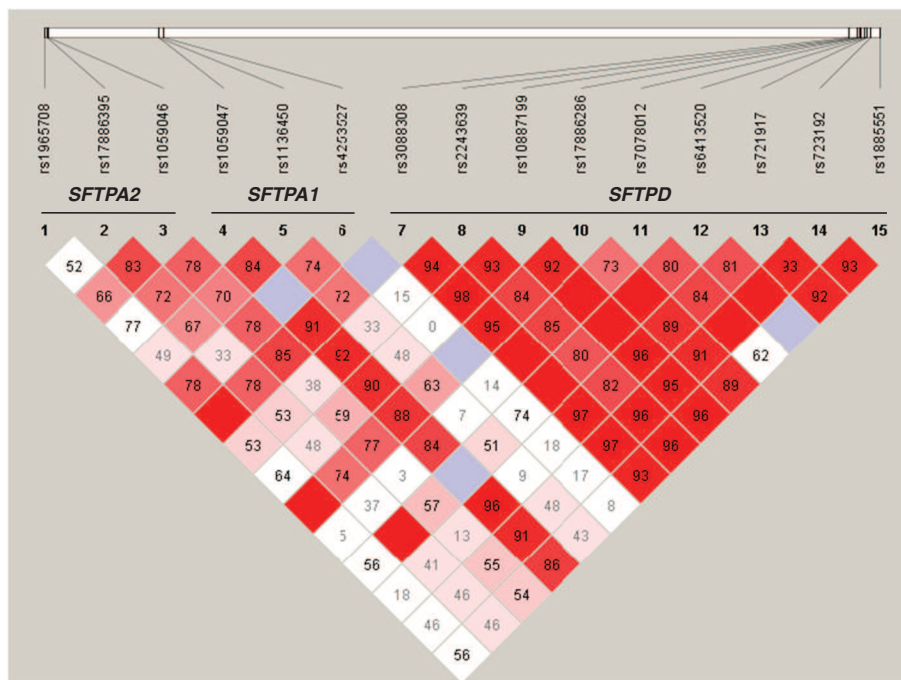


Figure 2 Linkage disequilibrium (D') among genetic polymorphisms of surfactant proteins in general Spanish population ($N = 687$). LD plots for pair wise D' between markers and D' values are indicated in percentages within squares in the LD plot. Strong LD is indicated by dark gray/red, whereas light gray/pink and white indicate uninformative and low confidence values, respectively.

to be resistant to the antiviral activities of SP-D, MBL, and the pentraxin PTX3 [7,13,27]. We have not observed any association with severity when deficient-, low-, or high-MBL producer genotypes and *SFTPD* SNPs or haplotypes were compared (data not shown). Interestingly, SP-A binding to hemagglutinins and SP-A-dependent IAV neutralization *in vitro* are not influenced by the extent of hemagglutinins glycosylation. SP-A is slightly more effective than SP-D at neutralizing nonglycosylated IAV strains, and it neutralizes IAV strains resistant to SP-D [12].

Accordingly, our results point toward a role of *SFTPA2* SNPs and haplotypes, particularly haplotypes IA^0 and IA^1 , in the severity of H1N1pdm infection. The rationale for such an association seems to be the involvement of *SFTPA2* variants in gas-exchange parameters, which, in the case of pulmonary IAV infection, is largely dependent on IAV-induced lung inflammation.

Besides its role in IAV neutralization, the hydrophilic SP-A and -D have been shown to have an antiinflammatory function. Binding of the carbohydrate-binding recognition domains (CRDs) to signal-inhibitory regulatory protein α (SIRP α) on alveolar macrophages suppresses NF- κ B activation and inflammation, allowing the healthy lung to remain in a quiescent state. SP-A and SP-D can also inhibit inflammation, through the CRD, blocking Toll-like receptors 2 and 4. Pulmonary clearance of IAV

was reduced, and pulmonary inflammation and severity were increased in *Sftpa* $^{-/-}$ mice compared with wild-type mice [10,11]. SP-A was also found to disturb the host inflammatory response to IAV infection in mouse models without directly influencing viral growth and spread, and even without demonstrable viral binding, at least when the virus was resistant to neutralization by SP-D [9]. Insufficient amounts of surfactant, particularly SP-A, have been observed in prematurely born infants with respiratory distress syndrome (pRDS). The haplotype IA^0 or *SFTPA1*-*SFTPA2* haplotypes containing IA^0 have been repeatedly associated with the development of pRDS, whereas SP haplotypes containing IA^1 were found to be protective against that condition [5,15]. These findings parallel those observed in our study, suggesting that IA^0 and IA^1 might influence the inflammatory response and the severity of H1N1pdm infection without binding to IAV.

Human SP-A1 and -A2 have similar *in vitro* hemagglutination-inhibition activity of IAV strains exhibiting non- or poorly glycosylated hemagglutinins heads [14]. However, in all functional assays, SP-A2 is more active than SP-A1 [5,15]. So it is not surprising that among all the genetic variants of collectins analyzed in our study, only a few alleles and haplotypes of *SFTPA2* were associated with H1N1pdm severity in hospitalized patients. Furthermore,

Table 4 Severity of H1N1pdm infection in hospitalized patients regarding haplotypes of *SFTPA2*

Haplotype					Statistical significance			
					P^a	P^b	P^a	P^b
					OR (95% CI)	OR (95% CI)	OR (95% CI)	OR (95% CI)
		Diplotype frequencies			Diplotype comparisons		Haplotype comparisons	
<i>1A⁰</i> (AGC)		<i>1A⁰/1A⁰</i>	<i>1A⁰/rest</i>	<i>Rest/rest</i>	<i>1A⁰/1A⁰</i> vs <i>1A⁰/rest</i> + <i>rest/rest</i>		<i>1A⁰</i> vs <i>rest</i>	
ARF	48	16 (0.33)	27 (0.56)	5 (0.10)	0.031	0.045	0.023	0.022
No ARF	22	2 (0.09)	14 (0.64)	6 (0.27)	5.00 (1.04-24.10)	6.38 (1.04-38.97)	2.30 (1.11-4.76)	2.81 (1.16-6.77)
ARDS	16	8 (0.50)	7 (0.44)	1 (0.06)	0.020 ^c	0.013	0.029	0.016
No ARDS	54	10 (0.19)	34 (0.63)	10 (0.19)	4.40 (1.33-14.56)	5.44 (1.43-20.77)	2.56 (1.08-6.02)	3.41 (1.26-9.22)
MV	24	11 (0.46)	12 (0.50)	1 (0.04)	0.005	0.004	0.007	0.003
No MV	46	7 (0.15)	29 (0.63)	10 (0.22)	4.72 (1.51-14.69)	7.03 (1.83-26.95)	2.78 (1.31-5.83)	3.73 (1.55-9.00)
<i>1A¹</i> (CGA)		<i>1A¹/1A¹</i>	<i>1A¹/rest</i>	<i>rest/rest</i>	<i>1A¹/1A¹</i> + <i>1A¹/rest</i> vs <i>rest/rest</i>		<i>1A¹</i> vs <i>rest</i>	
ARF	48	0 (0.00)	11 (0.23)	37 (0.77)	0.009	0.0017	0.004	0.005
No ARF	22	2 (0.09)	10 (0.46)	10 (0.46)	0.25 (0.08-0.73)	0.08 (0.02-0.39)	0.23 (0.11-0.68)	0.21 (0.07-0.62)
ARDS	16	0 (0.00)	2 (0.12)	14 (0.88)	-	0.040	-	0.021
No ARDS	54	2 (0.04)	19 (0.35)	33 (0.61)	-	0.16 (0.03- 0.92)	-	0.12 (0.02-0.73)
MV	24	0 (0.00)	4 (0.17)	20 (0.83)	0.037	0.019	0.034	0.015
No MV	46	2 (0.04)	17 (0.37)	27 (0.59)	0.28 (0.08-0.97)	0.08 (0.01-0.66)	0.31 (0.1-0.96)	0.16 (0.04-0.70)
ICU ^e	30	0 (0.00)	4 (0.13)	26 (0.87)	0.003	0.015	0.003	0.029
No ICU ^e	40	2 (0.05)	17 (0.43)	21 (0.53)	0.17 (0.05-0.58)	0.25 (0.08-0.76)	0.20 (0.07-0.62)	0.32 (0.11-0.89)

Only those comparisons with $P < 0.05$ and significant odds ratio were included. OR (95% CI), odds ratio (95% confidence interval); ARF, acute respiratory failure; ARDS, acute respiratory distress syndrome; MV, mechanical ventilation; ICU, intensive care unit.

^a P value for the bivariate comparison calculated with the χ^2 test. ^b++ value for the multivariate analysis calculated with binary logistic regression, including the variables age, gender, risk factors, secondary bacterial pneumonia, and bacteremia. ^c P value by Fisher Exact test. ^d P value for the multivariate analysis calculated with binary logistic regression, including the variables age, gender, risk factors, and secondary bacterial pneumonia (bacteremia variable was excluded because it shows a co-linear relation with the variable mechanical ventilation). ^ePatients who required (ICU) or did not require (No ICU) ICU admission, P value for the multivariate analysis calculated with conditional logistic regression stratified by hospital of origin, including the covariables age, gender, risk factors, secondary bacterial pneumonia, and bacteremia. Conventional haplotypes at *SFTPA2* were identified on the basis of combinations of the polymorphism rs1059046 (T9N), rs17886395 (A91P), and rs1965708 (Q223K). "Rest" refers to the other haplotypes for each comparison.

the effect of the *SFTPA2* variants on the need for ICU admission was detected in the first few days of hospitalization, as would be expected for components of the innate immunity involved in inflammation and defense against IAV infection.

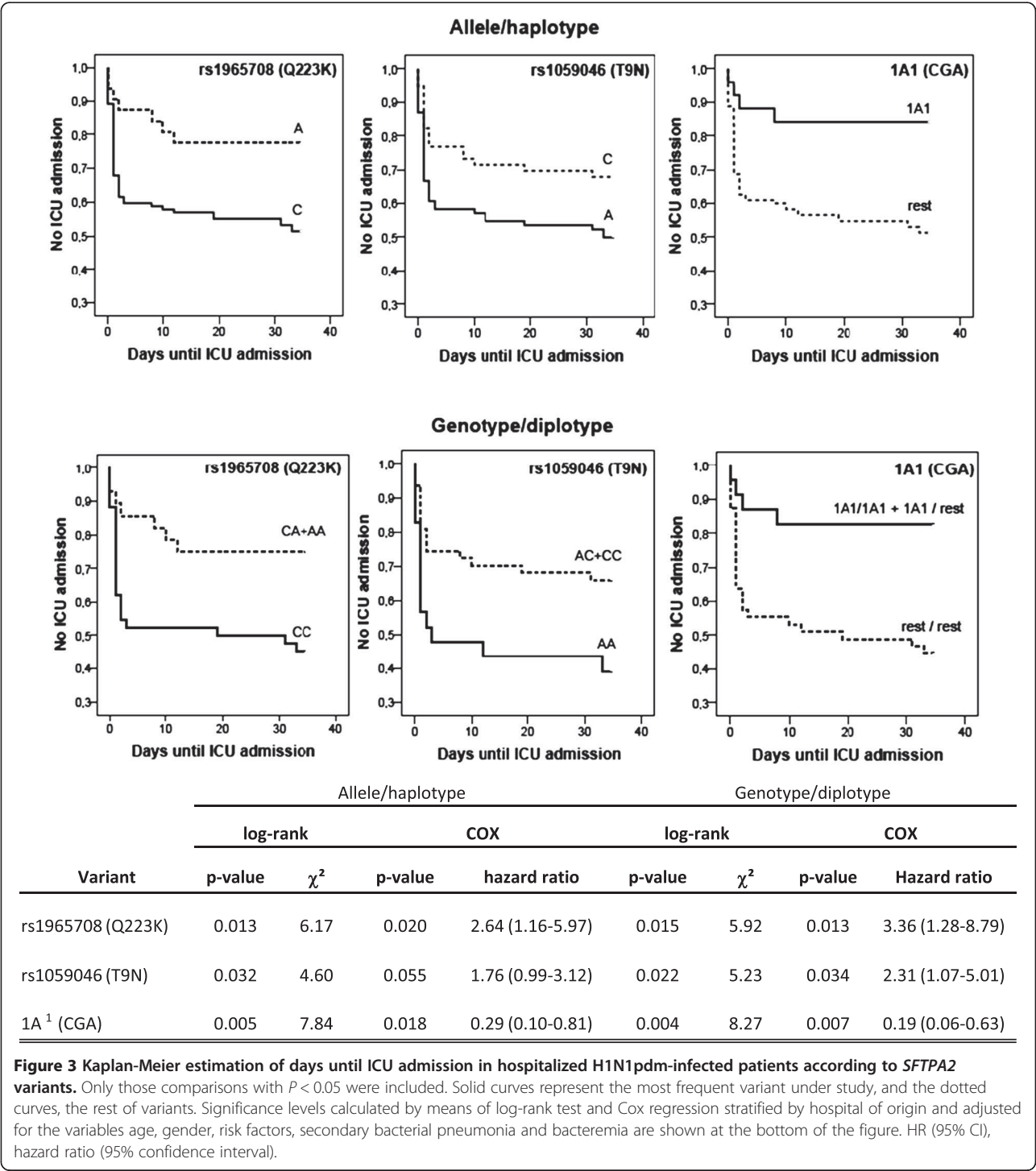
The significance of the functional differences between variants at *SFTPA1* and *SFTPA2* is poorly understood [5,15]. The variant rs1965708 produces an amino-acid change at residue 223 (Q223K), located in the CRD of SP-A2, and might directly influence the binding properties to either IAV or the antiinflammatory receptor SIRP α . Residue 9 (rs1059046, T9N) is located in the signal peptide, and it is unknown whether this variant may affect the protein. It is, however, worth noting that haplotypes *1A⁰* and *1A¹* differ precisely at residues 9 and 223. A role of SNPs at regulatory regions in haplotypes *1A⁰* and *1A¹* in translation and/or RNA stability of *SFTPA2* cannot be ruled out [5,15]. Interestingly, SP-A2 *1A¹* variants were shown to have a lower activity for enhancement of TNF- α in macrophage-derived THP-1 cells than other variants, such as *1A* and *1A⁰*, particularly

after oxidative stress [28,29]. These data suggest that the protective effect of the SP-A2 *1A¹* variant in the severity of H1N1pdm infection could be due to its lower proinflammatory activity.

Irrespective of the causal SNP(s), our data suggest that the haplotype *1A⁰* of *SFTPA2* is associated with a higher severity after H1N1pdm infection, whereas the *SFTPA2* haplotype *1A¹* was associated with a dominant protective effect against severe forms of H1N1pdm infection.

We acknowledge several limitations of our study. First, the overrepresentation of hospitalized patients, could bias us to analyze susceptibility to H1N1pdm infection. In addition, our control group could be considered a representative sample from the Spanish population rather than a representation of non-H1N1pdm-infected individuals.

Second, our study is underpowered to detect the role of some variants on severity of H1N1pdm infection. Nevertheless, considering odds ratios and a significance level of 5%, the power of the associations of rs1965708-C with the development of ARDS and septic shock was



84%, and more than 88% for the need for MV. In the haplotype analysis, statistical power was 88.56% for the effect of the haplotype 1A¹ on ICU admission (90.62% for the effect in a dominant model). No correction for multiple comparisons was performed in these comparisons, but, as expected by *in vivo* and *in vitro* studies among the human collectins, only SP-A would be expected to influence H1N1pdm infectivity, and significant associations were repeatedly observed with several clinical phenotypes. Furthermore, the observed associations were found to be independent of age, gender, risk factors predisposing to severe H1N1 infection, and development

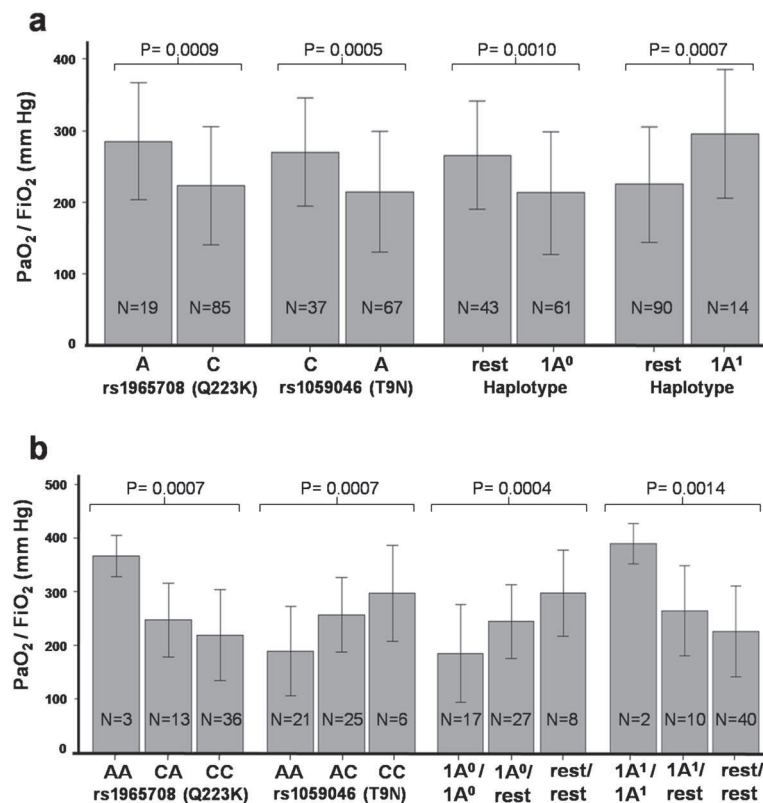


Figure 4 Ratio of oxygen arterial pressure to oxygen inspiratory fraction ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) with regard to *SFTPA2* genetic variants. $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ with regard to alleles and haplotypes (a) as well as genotypes and diplotypes (b) of *SFTPA2* in hospitalized patients with H1N1 pandemic 2009 influenza A virus infection. Each bar represents the mean $\pm$ SD. P values were calculated with a regression lineal model, including the variables age, gender, risk factors, secondary bacterial pneumonia, and bacteremia.

of either secondary bacterial pneumonia or bacteremia. Variants of *SFTPA2* were clearly associated with functional parameters of gas exchange, underscoring their role in the severity of H1N1pdm-induced lung injury.

Third, criteria for ICU admission may vary between different centers. To avoid these differences, multivariate and Cox regression analysis to evaluate the need for ICU admission were stratified by hospital of origin.

Conclusion

Our study suggests that variants at *SFTPA2* influence the severity of H1N1pdm infection in hospitalized patients. The potential of collectins as therapeutic agents for the treatment of IAV-mediated disease is now being explored [7,30]. In *Sftpa*^{-/-} and *Sftpd*^{-/-} mice, intratracheally administered SP-A or SP-D can restore microbial clearance and inflammation [5], and exogenous surfactant preparations containing the hydrophobic SP-B and -C are widely used for replacement therapies in pRDS. The data from our study, together with a better knowledge of the functional significance of the genetic

variability at *SFTPA2* on IAV-associated disease, could pave the way for a potential treatment with haplotype-specific (1A¹) SP-A2 for patients with the most severe forms of the disease in future IAV pandemics.

Key messages

- Genetic variation in the *SFTPA2* gene influences the outcome of patients infected with the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus.
- Data from our study may help to identify patients at higher risk of severe pandemic (nonglycosylated) IAV infection, who may eventually benefit from more-personalized and targeted therapies.

Abbreviations

ARDS: Acute respiratory distress syndrome; ARF: acute respiratory failure; BMI: body mass index; CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica (Clinical Research Ethics Committee); CRD: carbohydrate recognition domain; FiO₂: fraction of inspired oxygen; H1N1pdm: virus influenza A H1N1 pandemic; HIV: human immunodeficiency virus; HR: hazard ratio; IAV: influenza A virus; ICU: intensive care unit; MBL: mannose-binding lectin; MODS: multiorgan dysfunction syndrome; MV: mechanical ventilation; NF-κB: nuclear factor kappa B; OR: odds ratio; PaO₂: partial pressure of oxygen;

pRDS: respiratory distress syndrome in prematurely born infant; PVP: primary viral pneumonia; SaO₂: arterial oxygen saturation; SIRPα: signal inhibitory regulatory protein α; SNP: single-nucleotide polymorphism; SP: surfactant protein.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

EHR: acquisition, analysis, and interpretation of molecular genetic data, and statistical analysis and collaboration in the writing of the manuscript. MLR: acquisition, analysis, and interpretation of molecular genetic data and critical review of the manuscript. JJRH: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and critical review of the manuscript. JPH: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and critical review of the manuscript. LB: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and critical review of the manuscript. EL: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and critical review of the manuscript. JB: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and critical review of the manuscript. MCPG: acquisition, analysis, and interpretation of H1N1pdm infection data and critical review of the manuscript. MIGL: molecular genetic data acquisition, analysis, and interpretation and critical review of the manuscript. YF: molecular genetic data acquisition and critical review of the manuscript. VMB: acquisition, analysis, and interpretation of H1N1pdm infection data and critical review of the manuscript. MM: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and critical review of the manuscript. JMF: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and critical review of the manuscript. LS: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and critical review of the manuscript. CV: acquisition, analysis, and interpretation of H1N1pdm infection data and critical review of the manuscript. OR: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and critical review of the manuscript. MB: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and critical review of the manuscript. JA: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and critical review of the manuscript. ELG: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and critical review of the manuscript. JSV: acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and collaboration in the writing of the manuscript. FRC: financial support, acquisition, analysis, and interpretation of clinical data and collaboration in the writing of the manuscript. CRG: coordination, conception and design, financial support, and manuscript writing. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Authors' information

Jordi Solé-Violán and Felipe Rodríguez de Castro should be regarded as co-second last senior authors.

Acknowledgements

We are grateful to the patients and their families for their trust, as well as to the healthy volunteers. We also thank Miguel Ángel García-Bello for statistical assistance, Nereida González-Quevedo for technical features, and Consuelo Ivañez for their invaluable help. We appreciate the attention given by local Ethics Committee of involved hospitals: CEIC Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, CEIC Hospital del Mar de Investigaciones Médicas, CEIC Hospital San Jorge, Hospital Clínico y CEIC Universitario de Valencia, and CEIC Hospital de la Princesa.

This work was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Economía y Competitividad [PI 02/1620, 04/1190, 06/1031, 10/01718, and 12/01565] with the funding of European Regional Development Fund-European Social Fund (FEDER-FSE); RedRespira-ISCIII-RTIC-03/11; Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR); E.H.R. and Y.F. by a grant from Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, and M.L.R., by a grant from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad [FI 11/00593]. The sponsors of the study had no role in designing the study, collecting, analyzing, and interpreting the data, or writing the manuscript.

Author details

¹Department of Immunology, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria 35010, Spain. ²Department of Medical and Surgical Sciences, School of Medicine, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria 35016, Spain. ³Department of Internal Medicine, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las

Palmas de Gran Canaria 35010, Spain. ⁴Department of Infectious Diseases, Hospital Universitari del Mar, Barcelona 08003, Spain. ⁵Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM), CIBERES, Barcelona 08003, Spain. ⁶Department of Respiratory Diseases, Hospital San Jorge, Huesca 22004, Spain. ⁷Intensive Care Unit, Hospital Clínico y Universitario de Valencia, Valencia 46010, Spain. ⁸Department of Microbiology, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria 35010, Spain. ⁹Center for Experimental and Molecular Medicine, Academic Medical Center, Amsterdam 1105 AZ, The Netherlands. ¹⁰Laboratori de Referència de Catalunya, Prat de Llobregat, Barcelona 08820, Spain. ¹¹Intensive Care Unit, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, CIBERES, Las Palmas de Gran Canaria 35010, Spain. ¹²Department of Respiratory Diseases, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid 28005, Spain. ¹³Department of Respiratory Diseases, Hospital Clínico y Universitario de Valencia, Valencia 46010, Spain. ¹⁴Department of Immunology, Hospital La Paz, Madrid 28046, Spain. ¹⁵Department of Respiratory Diseases, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria 35010, Spain.

Received: 8 November 2013 Accepted: 4 June 2014

Published: 20 June 2014

References

- Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, Uyeki TM, Zaki SR, Hayden FG, Hui DS, Kettner JD, Kumar A, Lim M, Shindo N, Penn C, Nicholson KG: **Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection.** *N Engl J Med* 2010, **362**:1708–1719.
- Horby P, Nguyen NY, Dunstan SJ, Baillie JK: **The role of host genetics in susceptibility to influenza: a systematic review.** *PLoS One* 2012, **7**:e33180.
- Albright FS, Orlando P, Pavia AT, Jackson GG, Cannon Albright LA: **Evidence for a heritable predisposition to death due to influenza.** *J Infect Dis* 2008, **197**:18–24.
- Keynan Y, Malik S, Fowke KR: **The role of polymorphisms in host immune genes in determining the severity of respiratory illness caused by pandemic H1N1 influenza.** *Public Health Genomics* 2013, **16**:9–16.
- Wright JR: **Immunoregulatory functions of surfactant proteins.** *Nat Rev Immunol* 2005, **5**:58–68.
- Eisen DP: **Mannose-binding lectin deficiency and respiratory tract infection.** *J Innate Immun* 2010, **2**:114–122.
- Ng WC, Tate MD, Brooks AG, Reading PC: **Soluble host defense lectins in innate immunity to influenza virus.** *J Biomed Biotechnol* 2012, **2012**:732191.
- Selman L, Hansen S: **Structure and function of collectin liver 1 (CL-L1) and collectin 11 (CL-11, CL-K1).** *Immunobiology* 2012, **217**:851–863.
- Hawgood S, Brown C, Edmondson J, Stumbaugh A, Allen L, Goerke J, Clark H, Poulain F: **Pulmonary collectins modulate strain-specific influenza A virus infection and host responses.** *J Virol* 2004, **78**:8565–8572.
- LeVine AM, Hartshorn K, Elliott J, Whitsett J, Korfhausen T: **Absence of SP-A modulates innate and adaptive defense responses to pulmonary influenza infection.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, **282**:L563–L572.
- Li G, Siddiqui J, Hendry M, Akiyama J, Edmondson J, Brown C, Allen L, Levitt S, Poulain F, Hawgood S: **Surfactant protein-A-deficient mice display an exaggerated early inflammatory response to a beta-resistant strain of influenza A virus.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, **26**:277–282.
- Hartshorn KL, White MR, Shepherd V, Reid K, Jensenius JC, Crouch EC: **Mechanisms of anti-influenza activity of surfactant proteins A and D: comparison with serum collectins.** *Am J Physiol* 1997, **273**:L1156–L1166.
- Job ER, Deng YM, Tate MD, Bottazzi B, Crouch EC, Dean MM, Mantovani A, Brooks AG, Reading PC: **Pandemic H1N1 influenza A viruses are resistant to the antiviral activities of innate immune proteins of the collectin and pentraxin superfamilies.** *J Immunol* 2010, **185**:4284–4291.
- Mikero AN, White M, Hartshorn K, Wang G, Floros J: **Inhibition of hemagglutination activity of influenza A viruses by SP-A1 and SP-A2 variants expressed in CHO cells.** *Med Microbiol Immunol* 2008, **197**:9–12.
- Silveyra P, Floros J: **Genetic variant associations of human SP-A and SP-D with acute and chronic lung injury.** *Front Biosci* 2012, **17**:407–429.
- Haczku A: **Protective role of the lung collectins surfactant protein A and surfactant protein D in airway inflammation.** *J Allergy Clin Immunol* 2008, **122**:861–879.
- Hoover RR, Floros J: **Organization of the human SP-A and SP-D loci at 10q22-q23: physical and radiation hybrid mapping reveal gene order and orientation.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **18**:353–362.

18. Garcia-Laorden MI, de Rodriguez CF, Sole-Violan J, Rajas O, Blanquer J, Borderias L, Aspa J, Briones ML, Saavedra P, Marcos-Ramos JA, González-Quevedo N, Sologuren I, Herrera-Ramos E, Ferrer JM, Rello J, Rodríguez-Gallego C: **Influence of genetic variability at the surfactant proteins A and D in community-acquired pneumonia: a prospective, observational, genetic study.** *Crit Care* 2011, **15**:R57.
19. Garcia-Laorden MI, de Rodriguez CF, Sole-Violan J, Payeras A, Briones ML, Borderias L, Aspa J, Blanquer J, Rajas O, Marcos-Ramos JA, Herrera-Ramos E, García-Bello MA, Noda J, Ferrer JM, Rello J, Rodríguez-Gallego C: **The role of mannose-binding lectin in pneumococcal infection.** *Eur Respir J* 2013, **41**:131–139.
20. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis: The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee, American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.** *Chest* 1992, **101**:1644–1655.
21. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R, The American-European Consensus Conference on ARDS: **Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **149**:818–824.
22. DiAngelo S, Lin Z, Wang G, Phillips S, Ramet M, Luo J, Floros J: **Novel, non-radioactive, simple and multiplex PCR-cRFLP methods for genotyping human SP-A and SP-D marker alleles.** *Dis Markers* 1999, **15**:269–281.
23. The International HapMap Consortium: **A haplotype map of the human genome.** *Nature* 2005, **437**:1299–1320.
24. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: **Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps.** *Bioinformatics* 2005, **21**:263–265.
25. Foreman MG, Kong X, DeMeo DL, Pillai SG, Hersh CP, Bakke P, Gulsvik A, Lomas DA, Litonjua AA, Shapiro SD, Tal-Singer R, Silverman EK: **Polymorphisms in surfactant protein-D are associated with chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011, **44**:316–322.
26. Lingappa JR, Dumitrescu L, Zimmer SM, Lynfield R, McNicholl JM, Messonnier NE, Whitney CG, Crawford DC: **Identifying host genetic risk factors in the context of public health surveillance for invasive pneumococcal disease.** *PLoS One* 2011, **6**:e23413.
27. Job ER, Deng YM, Barford KK, Tate MD, Caldwell N, Reddiex S, Maurer-Stroh S, Brooks AG, Reading PC: **Addition of glycosylation to influenza A virus hemagglutinin modulates antibody-mediated recognition of H1N1 2009 pandemic viruses.** *J Immunol* 2013, **190**:2169–2177.
28. Wang G, Umstead TM, Phelps DS, Al-Mondhry H, Floros J: **The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein a variants to stimulate cytokine production.** *Environ Health Perspect* 2002, **110**:79–84.
29. Mikerov AN, Umstead TM, Gan X, Huang W, Guo X, Wang G, Phelps DS, Floros J: **Impact of ozone exposure on the phagocytic activity of human surfactant protein A (SP-A) and SP-A variants.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, **294**:L121–L130.
30. Sato A, Whitsett JA, Scheule RK, Ikegami M: **Surfactant protein-d inhibits lung inflammation caused by ventilation in premature newborn lambs.** *Am J Respir Crit Care Med* 2010, **181**:1098–1105.

doi:10.1186/cc13934

Cite this article as: Herrera-Ramos *et al.*: Surfactant protein A genetic variants associate with severe respiratory insufficiency in pandemic influenza A virus infection. *Critical Care* 2014 **18**:R127.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

