



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS

TESIS DOCTORAL

**Variantes de los genes de la Lectina de
Unión a Manosa (MBL) y la Serina-
proteasa-2 asociada a MBL (MASP-2).
Estudio poblacional y papel en la
susceptibilidad y pronóstico en
patologías infecciosas y autoinmunes.**

M^a Isabel García Laorden

Las Palmas de Gran Canaria, 2009

**D/Da SECRETARIO DEL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS DE LA
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,
CERTIFICA,**

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada “Variantes genéticas de los genes de la Lectina de Unión a Manosa (MBL) y la Serina-proteasa-2 asociada a MBL (MASP-2). Estudio poblacional y papel en la susceptibilidad y pronóstico en patologías infecciosas y autoinmunes” presentada por la doctoranda Dña. M^a Isabel García Laorden y dirigida por el doctor D. Felipe Rodríguez de Castro.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Art. 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en
Las Palmas de Gran Canaria, ade..... de dos mil ocho.



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

Facultad de Ciencias de la Salud

Departamento: Ciencias Clínicas

Programa de Doctorado: Microbiología Clínica y Enfermedades
Infecciosas

Título de la tesis

Variantes de los genes de la Lectina de Unión a Manosa (MBL) y la Serina-proteasa-2 asociada a MBL (MASP-2). Estudio poblacional y papel en la susceptibilidad y pronóstico en patologías infecciosas y autoinmunes.

Tesis doctoral presentada por D^a M^a Isabel García Laorden
para optar al grado de Doctor.

Dirigida por el Dr. D Felipe Rodríguez de Castro

El Director

La Doctoranda

Las Palmas de Gran Canaria, a 6 de Octubre de 2008.

Don FELIPE RODRÍGUEZ DE CASTRO, Profesor Titular de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

CERTIFICA

Que el trabajo de investigación titulado “VARIANTES DE LOS GENES DE LA LECTINA DE UNIÓN A MANOSA (MBL) Y LA SERINA-PROTEASA-2 ASOCIADA A MBL (MASP-2). ESTUDIO POBLACIONAL Y PAPEL EN LA SUSCEPTIBILIDAD Y PRONÓSTICO EN PATOLOGÍAS INFECCIOSAS Y AUTOINMUNES”, ha sido realizado por doña M^a Isabel García Laorden, bajo mi 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, extendiendo el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a 6 de Octubre de 2008.

Fdo.: Felipe Rodríguez de Castro

Cada gota, cada idea, cada paso en mi carrera
Y la estrofa de mi última canción
Cada fecha postergada, la salida y la llegada
Y el oxígeno de mi respiración
Y todo a pulmón, todo a pulmón.

A. Lerner



A todos los que, alguna vez, creyeron en mí

Desde donde mi memoria alcanza, he querido ser bióloga. Pero no quería serlo sólo porque lo pusiera un papel. Así que lo realmente difícil llegó cuando terminé la carrera y aposté conmigo misma por este mundo de locos que es la investigación, algo que a todos les parece bonito, pero que consideran un simple hobby. Creo que, después de 12 años en esto, puedo decir que soy bióloga, e incluso me atrevería remotamente a decir que investigadora. Pero en este largo camino, afortunadamente, no he estado sola, y he acumulado deudas de gratitud con un sin fin de personas sin cuya ayuda, material, física, o moral, esto no habría sido posible. Hace varios siglos, Bernardo de Chartres dijo *"Nosotros, como enanos encaramados sobre hombros de gigantes, vemos más y más lejos, no porque seamos más perspicaces y más altos, sino por la grandeza de quienes nos transportan y enaltecen"*. Para mí, estos gigantes no son sólo ciertas mentes privilegiadas, cuyos estudios previos han aportado las bases sobre las que poder levantar líneas de investigación posteriores. Para mí, estos gigantes son mucho más cercanos... son todos ustedes:

Gracias a mi director, Felipe Rodríguez, por su ayuda y por creer en esta tesis, y también por su inestimable colaboración en estos años de trabajo con las neumonías. A mi jefe, Carlos Rodríguez, por algo tan simple como imprescindible: haberme dado una oportunidad hace 12 años, y por haber puesto en mis manos la MBL, compañera inseparable desde entonces; espero no olvidar nunca algunas cosas que he aprendido de él.

Eternamente gracias a toda la gente, presente y pasada, de Inmuno del Negrín (en su día del Pino), mi segunda casa, por echar una mano en lo que hiciera falta, por su apoyo, por el "buen rollo", por crear entre todos un buen sitio donde pasar tantas horas cada día, porque son un auténtico lujo de equipo, por lo bueno y lo malo que hemos pasado juntos, y porque ha sido un gran placer trabajar con todos ellos: A mi "familia biológica molecular", encabezada por "mamá" Ana, que me enseñó a hacer PCRs entre muchas otras cosas y que ha sido una ayuda continua; a mi "hija" Nereída, sin cuya ayuda estos últimos cuatro años de trabajo habrían sido imposibles; mil gracias a las dos por hacerlo todo tan fácil; a mis "biológicos moleculares" que se fueron: mi "hermano"

Ayoze, que encajaba los cogotazos como nadie, mi "sobrina" Mari, con una paciencia infinita para resuspender los ADN, y mi "hermano" Javier, que sin saberlo me hizo un gran favor; y como no, a "la tía" M^a del Carmen Q., tantas cosas que agradecerle no caben en una copla. Gracias también a Florentino Sánchez, por dejarme estar y tener siempre la puerta abierta para mí. A las niñas de celular, Esther, Ithaísa y Yanira, compañeras de tardes que han aguantado la histeria final de esta "boda"; y a Elisa: te debo una muy grande. A las niñas de HLA, Belén, Isa y Rita, también un apoyo moral. Y Maika, que casi hizo un máster en fenol-cloroformo. A Imma y a Tony, los "secres". Y a mucha gente que pasó por aquí, como María, y como Ana M., que fue mi medio equipo durante tres años y mi amiga por los restos (reína, un cachito de esto es tuyo).

Por supuesto, gracias a los pacientes, por su colaboración indispensable, y a los voluntarios sanos, incluidos todos los compañeros/as del hospital "pescados en mis reiteradas redadas vampíricas".

Y ahora, sin que el orden de los factores altere el producto, gracias:

A toda la gente de la Unidad de Investigación. A Sandra, por tantas y tantas cosas. A Fran, por estar ahí siempre que he necesitado asesoramiento, apoyo y mantener "conversaciones científicas", igual que Octavio. A Fayna y Araceli, por hacer un poquito más "amigable" a la bioestadística (aunque sigo pensando que son términos incompatibles) y haber contestado mis mil preguntas. Y, cómo no, a José Carlos Rodríguez; y a Rula, a Arantxa, a Clara,...

A Juan Verona, de Ilustración: mil gracias por tu ayuda incondicional, por aguantar que siempre vaya con prisas, y por ser como los buenos vinos. Gracias también a Ramón.

A Iñigo Rúa, de Reumatología, por estos años de provechosa y honesta colaboración, y al resto del Servicio por su cooperación, especialmente a Ana Bilbao.

Al Servicio de Microbiología, que se llevaron la caja de bombones al mayor número de voluntarios sanos. En especial a Marisol Campos, y a M^a José

Pena, con la que siempre ha sido un placer trabajar (tú también haces que todo sea fácil).

A José A. Camínero, de Neumología, y a las infatigables Linde, Paz (que le dieron 40 vueltas al listado de tuberculosis) y Consuelo.

A Jordi Solé, de UMI, uno de los "socios fundadores y miembro activo" de nuestro grupo de estudio de las neumonías. Gracias también a José M^a Ferrer.

A Olga Rajas y Javier Aspa, del hospital de La Princesa (Madrid), José Blanquer y Marisa Briones, del Hospital Clínico Universitario de Valencia, y a Luís Borderías, del Hospital San Jorge de Huesca. A todos ellos por su ya larga y fructuosa colaboración en la línea de la neumonía comunitaria. Sin olvidar a Alberto Marcos (antes del Negrín, ahora del Hospital General de Lanzarote) y a Nacho Martín-Loeches (antes del Negrín, ahora del Joan XXIII de Tarragona) por su incansable batalla con ese "ente con vida propia" que ha sido y es la base de las neumonías.

A Laïla El Fenniri, que se fue en coche al Atlas para mandarnos sangre de bereberes.

A mis "brujas" de Tenerife (Ángeles, Kenia y Silvia, por orden alfabético), por su apoyo constante a pesar del tiempo y la distancia.

A Nieves, porque sin su ayuda hace dos años, tal vez todo esto no habría sido ahora... o incluso no habría sido.

A mis compañeros en Palma, por hacerme ver lo absurdo e inconcebible de no tener la tesis a aquellas alturas.

A Pedro Lara, por servirme en bandeja un formato de tesis perfecto para mí.

A mis "chicas de oro", que deberían haber estado en apartados anteriores, pero que merecen mención aparte: Candy, Maite (que hasta revisó una parte de esta memoria) y M^a José (también por orden alfabético), por vuestra ayuda, apoyo, preocupación, consejo... Nuestro próximo "homenaje" será por todo lo alto.

Y como no, a mi familia. A mis padres, por hacerme cabezota y darme libre albedrío. A mis hermanos (y "anexos") por su apoyo ilimitado desde hace 35 años. Y a mis sobrinos, siete soles capaces de iluminar los días más oscuros.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación personal de: beca del proyecto FIS 98/1513 (ISCIII), beca de ampliación de estudios de la Fundación Dr. Manuel Morales, beca de la Red RESPIRA (ISCIII-RTIC-3/11), beca del proyecto FIS 05/1196 (ISCIII), y Fundación Canaria de Investigación y Salud (FUNCIS, proyecto Biorregión); y gracias a la financiación material de: FIS 98/1513 (ISCIII), SEPAR 2002, FIS 02/1620 (ISCIII), RedRESPIRA-ISCiii-RTIC-03/11 y FIS 04/1190 (ISCIII).

ÍNDICE

ÍNDICE	1
---------------	----------

CAPÍTULO I: Introducción	5
---------------------------------	----------

Vía de las lectinas de activación del sistema del complemento.

Estructura de la MBL humana.

Genética y niveles séricos de la MBL humana.

Significado clínico de la MBL.

MBL e infección.

MBL y enfermedades no infecciosas.

Las serina-proteasas asociadas a MBL.

CAPÍTULO II: Hipótesis y objetivos	21
---	-----------

Hipótesis.

Objetivos.

CAPÍTULO III: Materiales y métodos generales	27
---	-----------

1. Grupos de individuos a estudio.

1.1. Poblaciones sanas a estudio.

1.2. Casos.

1.3. Otros grupos.

2. Determinaciones genéticas.

2.1. Extracción de ADN genómico.

2.2. Determinación de los polimorfismos del gen

MBL2.

- 2.3. Determinación del polimorfismo en la región CUB-1 del gen *MASP2*.
- 3. Cuantificación de la MBL en suero.
 - 3.1. Obtención del suero.
 - 3.2. Determinación de la concentración de MBL en suero.
- 4. Cuantificación de la MASP-2 en suero.
 - 4.1. Obtención del suero.
 - 4.2. Determinación de la concentración de MASP-2 en suero.
- 5. Cuantificación de la actividad de la vía de las lectinas dependiente de MBL.
 - 5.1. Obtención del suero.
 - 5.2. Determinación de la actividad de la vía de las lectinas dependiente de MBL.
- 6. Análisis estadístico.

CAPÍTULO IV: Estudio de la MBL y el gen *MBL2*

en población sana_____51

Resumen.

Introducción.

Materiales y métodos.

Resultados.

Discusión.

CAPÍTULO V: Polimorfismos del gen *MBL2*
como factor modulador de la enfermedad en
mujeres canarias con LES_____73

Resumen.

Introducción.

Materiales y métodos.

Resultados.

Discusión.

CAPÍTULO VI: Influencia de la MBL en la
infección por el VIH y la tuberculosis activa en
población canaria_____93

Resumen.

Introducción.

Materiales y métodos.

Resultados.

Discusión.

CAPÍTULO VII: Papel de la MBL en la
susceptibilidad y la gravedad de la neumonía
adquirida en la comunidad en población española_____111

Resumen.

Introducción.

Materiales y métodos.

Resultados.

Discusión.

CAPÍTULO VIII: Relevancia del defecto de

MASP-2_____129

Resumen.

Introducción.

Materiales y métodos.

Resultados.

Discusión.

CAPÍTULO IX: Resumen y discusión general_____145

CAPÍTULO X: Conclusiones_____155

BIBLIOGRAFIA_____159

ABREVIATURAS_____173

PUBLICACIONES_____177

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico innato representa la primera línea de defensa contra los agentes infecciosos que atraviesan las barreras mecánicas, permitiendo una respuesta inmediata mediante una gran variedad de mecanismos efectores. Estos mecanismos reconocen, contienen y, en muchos casos, eliminan rápidamente, a los patógenos, estimulando además respuestas inmunológicas adaptativas.

El sistema del complemento juega un papel esencial en la defensa innata. Consta de diversas proteínas plasmáticas que son activadas por los microorganismos, favoreciendo tanto la destrucción de éstos como la inflamación. El reconocimiento de los microorganismos por el complemento y, por tanto, la activación de éste, tiene lugar de tres formas distintas (Walport MJ, 2001): la vía clásica (VC), la cual emplea la proteína C1q para detectar inmunoglobulinas unidas a microorganismos u otras estructuras; la vía alternativa (VA), que se activa por el reconocimiento directo de la superficie de los microorganismos; y la vía de las lectinas (VL), la cual se activa por la unión de la lectina de unión a manosa (MBL), o ciertas ficolinas (Liu J *et al*, 2005), a moléculas de carbohidratos presentes en la superficie de los microorganismos invasores, de manera independiente de anticuerpos. Además, existen también vías de *bypass*, que permiten la activación de C3 en ausencia de algún componente, si bien estas vías de *bypass* son relativamente débiles en comparación con las vías estándar (Degn SE *et al*, 2007). Aún así, esta activación podría ser particularmente importante en diversos estados de deficiencia de complemento, tanto hereditaria como adquirida (Selander B *et al*, 2006).

La deficiencia de componentes de cualquiera de las tres vías del sistema del complemento se asocia con diversas enfermedades, como el lupus eritematoso sistémico (LES), infecciones piógenas, o glomerulonefritis (Walport MJ, 2001).

VÍA DE LAS LECTINAS DE ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

La MBL es una lectina sérica dependiente de calcio, que se sintetiza principalmente en el hígado como proteína de fase aguda. En la circulación, esta

lectina se encuentra asociada a las serina-proteasas asociadas a la MBL (MASPs) generando un complejo funcional (Petersen SV *et al*, 2001). Estas MASPs se activan tras la unión de la lectina a estructuras de carbohidratos de la superficie de los microorganismos (incluyendo un amplio rango de bacterias, virus, hongos, levaduras y parásitos). Como consecuencia de esta activación, la MASP-2 fragmenta las proteínas de complemento C4 y C2, generándose así la convertasa de C3, C4bC2a (Schwaeble W *et al*, 2002), cuya actividad es central en la activación del complemento, y que representa el punto de convergencia de las tres vías (figura I.1). La función de las otras MASPs no está aún del todo clara. Se ha observado que la MASP-1 es capaz de fragmentar directamente C2 y C3 (Hajela K *et al*, 2002), aunque todavía no se ha determinado el papel de la MASP-3 ni de MAp19 (también denominada sMAP) (Sorensen R *et al*, 2005).

La VL también puede ser activada por las ficolinas H, L y M (Matsushita M y Fujita T, 2002; Liu J *et al*, 2005). Al igual que la MBL, las ficolinas se encuentran formando complejos con las MASPs, pero se considera que tienen especificidades de unión diferentes a la MBL.

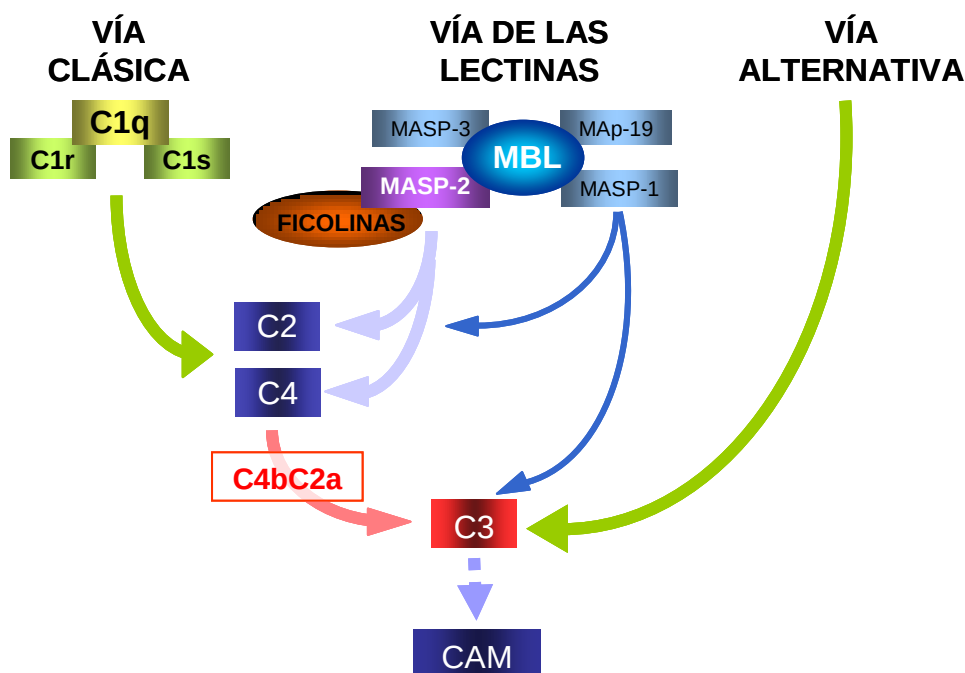


Figura I.1. Esquema de las vías de activación del sistema del complemento. CAM: complejo de ataque a membrana.

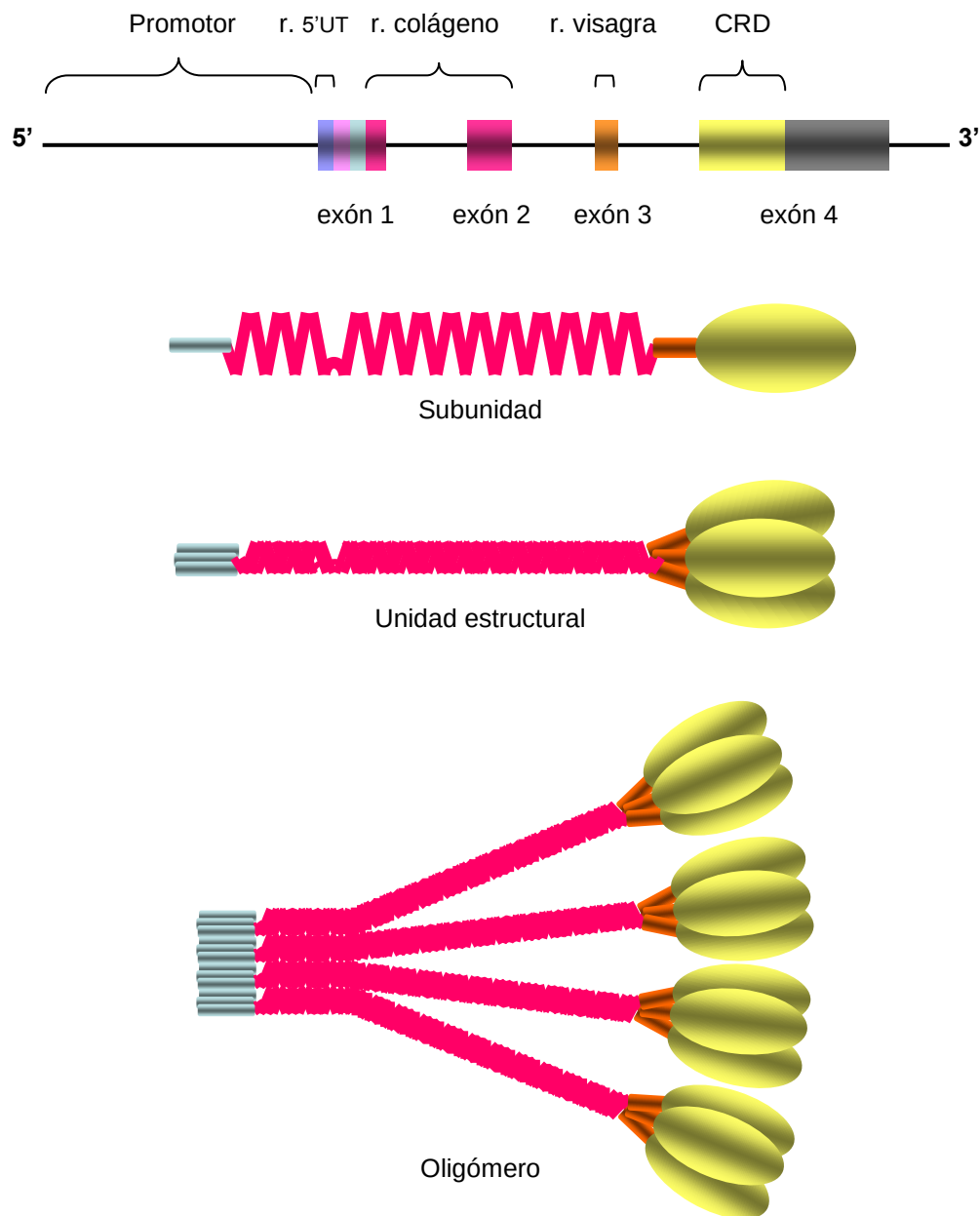


Figura I.2. Estructura del gen *MBL2* y de su producto proteico, la lectina de unión a manosa (MBL). En el esquema superior se representa la estructura del gen, señalándose los exones que codifican las diferentes regiones del polipéptido (subunidad). Tres subunidades iguales dan lugar a una unidad estructural, cuya oligomerización resulta en moléculas de MBL de distinto tamaño (el esquema inferior muestra una forma tetramérica). r.: región; CRD: dominio de reconocimiento de carbohidratos.

ESTRUCTURA DE LA MBL HUMANA

La MBL es una proteína de la familia de las colectinas. Está formada por unidades estructurales de 96 KDa, que a su vez están compuestas por tres

subunidades primarias idénticas de 32 KDa. Cada subunidad comprende 4 regiones distintas, codificadas por distintos exones del gen *MBL2* (como se verá más adelante): un dominio C-terminal de reconocimiento calcio-dependiente de carbohidratos (CRD), una región bisagra hidrofóbica de α -hélice, un dominio de tipo colágeno y una región N-terminal (figura I.2) (Turner MW *et al*, 2000; Dommett RM *et al*, 2006). La MBL circulante se encuentra formando estructuras oligoméricas, incluyendo dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros y hexámeros de la unidad estructural homotrimérica. Esta conformación le permite a la MBL tener múltiples CRDs (figura I.2). Cada CRD es estructuralmente idéntico y es capaz de unirse a una variedad de motivos repetitivos de oligosacáridos, incluyendo N-acetilglucosamina, D-manosa, N-acetilmanosamina y L-fucosa (Turner MW, 1996) (figura I.3), que se encuentran expuestos en elevada densidad en la superficie de bacterias, virus, hongos y protozoos, pero que están ausentes en la superficie de las células de los mamíferos. La MBL también puede unirse a fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas no glicosiladas (Dommett RM *et al*, 2006).

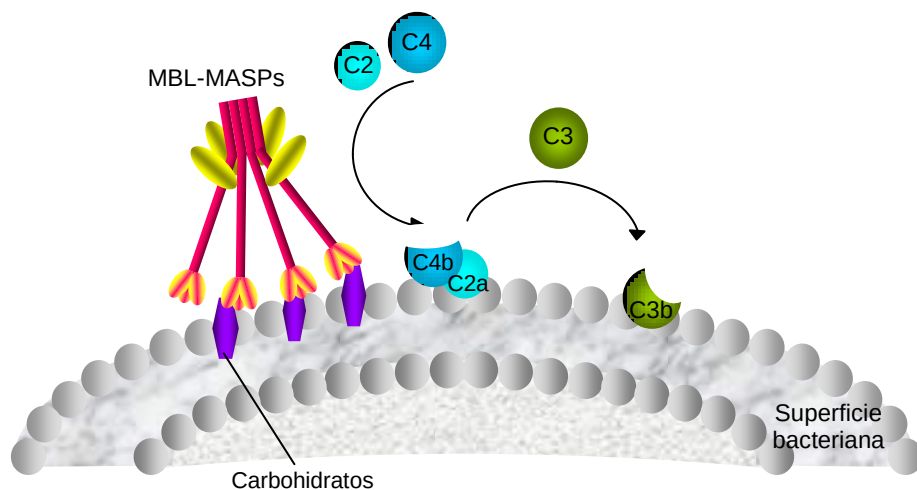


Figura I.3. Unión del complejo MBL-MASPs a varios carbohidratos sobre la superficie bacteriana, lo cual activa la vía de las lectinas del sistema del complemento.

En el plasma, la MBL se encuentra formando complejos con las MASPs, sin embargo, las diferentes formas oligoméricas de la MBL se asocian con distintas proporciones de las MASPs y la Map19 (Gadjeva M *et al*, 2004).

GENÉTICA Y NIVELES SÉRICOS DE LA MBL HUMANA

En humanos existen 2 genes MBL, si bien el gen *MBL1* es un pseudogén y sólo el gen *MBL2* codifica proteína. El gen *MBL2* se localiza en el cromosoma 10 (10q11.2-q21). Este gen comprende 4 exones, de los cuales el exón 1 codifica el péptido señal, una región rica en cisteína y parte de la región de colágeno; el exón 2 la parte restante de la región de colágeno; el 3 codifica la región bisagra; y el exón 4 el CRD (figura I.2). La región promotora codifica elementos reguladores, que afectan a la transcripción de la proteína (Dommett RM *et al*, 2006).

Se han caracterizado varios polimorfismos en el gen *MBL2*, seis de los cuales determinan una considerable variación de la cantidad o funcionalidad de la proteína producida. En el exón 1 se han encontrado tres mutaciones puntuales que dan lugar a sendas sustituciones de aminoácido en la región de colágeno (Arg52Cys, rs5030737; Gly54Asp, rs1800450; Gly57Glu, rs1800451) (Sumiya M *et al*, 1991; Lipscombe RJ *et al*, 1992; Madsen HO *et al*, 1994). Estas mutaciones originan los alelos variantes denominados *D*, *B* y *C* respectivamente, también denominados de forma conjunta alelos *O*. El alelo salvaje se designa como alelo *A* (figura I.4). Así, los individuos portadores del alelo salvaje en homocigosis se denominan *A/A*, los heterocigotos portadores de un alelo mutado, *A/O*, y los homocigotos mutados, *O/O*. Las sustituciones aminoacídicas resultantes dificultan el ensamblaje y/o la estabilidad de la unidad estructural homotrimérica de la proteína, de manera que interfieren en la formación de oligómeros de elevado orden, y resultan en una disminución de los niveles séricos de MBL funcional. La frecuencia de estos alelos variantes difiere entre las poblaciones humanas. Así, el alelo mutado *B* es relativamente común (12-25%) en poblaciones euroasiáticas, mientras que el alelo *C* es muy raro en euroasiáticos, pero muy común en poblaciones africanas subsaharianas (29%). Por su parte, el alelo *D* tiene una frecuencia aproximada del 5% en población caucásica, y está ausente en asiáticos y en la mayoría de las poblaciones africanas. Cabe destacar que la presencia del alelo *D*, si bien también disminuye los niveles séricos de proteína, tiene un efecto menos drástico en el descenso de la concentración que los alelos *B* y *C*. (Garred P *et al*, 2006).

En la región promotora y la región 5'UT del gen se han encontrado otros tres dimorfismos alélicos, los cuales afectan a la expresión de la proteína: en la posición -550 (G>C, alelos *H/L*, rs11003125), en la posición -221 (G>C, alelos

Y/X, rs7096206) y en la posición +4 (C>T, alelos P/Q, rs7095891) (Madsen HO *et al*, 1995 y 1998) (figura I.4). Como resultado de la combinación de las variantes de estas tres posiciones, se han observados cuatro haplotipos distintos: *HYP*, *LYQ*, *LYP* y *LXP*, los cuales se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento con las mutaciones del exón 1, observándose así siete haplotipos comunes, denominados *HYP*A, *LYQ*A, *LYP*A, *LXP*A, *HYP*D, *LYP*B y *LYQ*C. Dado que cada individuo posee dos de estos haplotipos, existen 28 genotipos diferentes. De entre los haplotipos portadores del alelo salvaje A, el *HYP*A es el que conlleva una mayor producción de MBL, mientras que el *LXP*A se asocia con una producción bastante reducida. La frecuencia de los siete haplotipos varía de forma considerable entre las distintas poblaciones humanas (Lipscombe RJ *et al*, 1996; Garred P *et al*, 2006), lo cual refleja las respectivas edades de las mutaciones originales (fundadoras), la historia de las migraciones humanas, y las presiones selectivas ambientales que han actuado en el genoma humano (Casanova JL y Abel L, 2004).

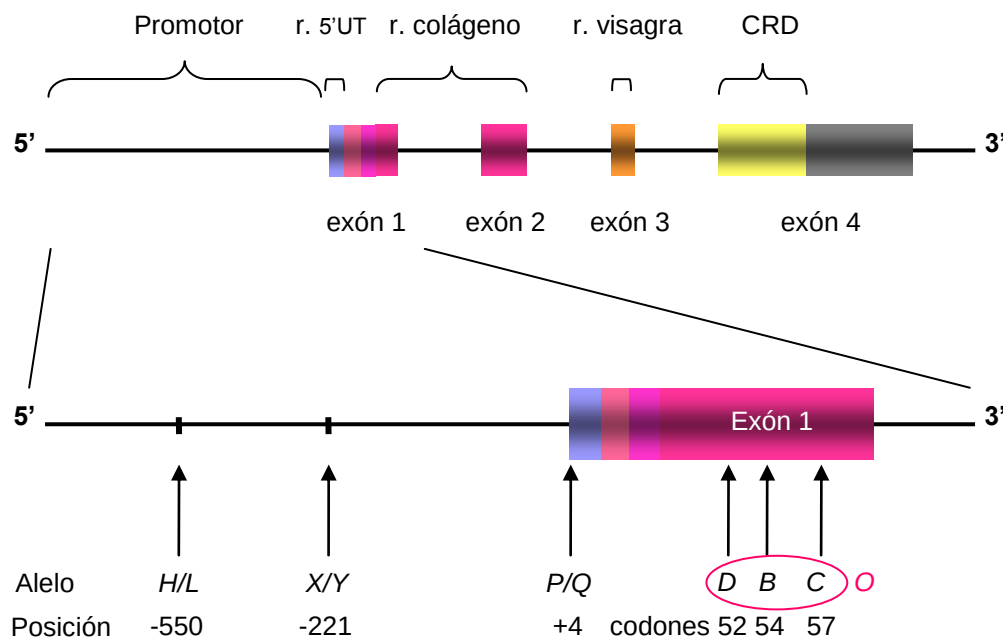


Figura I.4. Variantes alélicas del gen *MBL2*. El esquema superior representa la estructura del gen *MBL2*. En el esquema inferior se representan la región promotora, la región 5'UT y el exón 1, señalándose los sitios polimórficos en el gen. r.: región; CRD: dominio de reconocimiento de carbohidratos.

El hecho es que los humanos, debido mayoritariamente a estas variaciones genéticas, muestran notables variaciones en los niveles séricos de MBL, que oscilan entre 0 y 10.000 ng/ml. Diversas publicaciones muestran que los individuos homocigotos *A/A* presentan niveles séricos de proteína elevados (>1.000 ng/ml), mientras que los heterocigotos *A/O* tienen niveles más reducidos (300-1.000 ng/ml) y los homocigotos *O/O* niveles muy bajos o nulos de MBL (<100 ng/ml) (Madsen HO *et al*, 1995; Steffensen R *et al*, 2000; Minchinton RM *et al*, 2002). También se ha observado que la presencia del alelo *X* en lugar del *Y* tiene un efecto importante de disminución de la producción de MBL. Una repercusión similar se ha observado con respecto a la presencia del alelo *L* en lugar del alelo *H*, e incluso del alelo *P* en lugar del *Q*, si bien en estos casos el efecto es mucho menos marcado (Madsen HO *et al*, 1995; Steffensen R *et al*, 2000; Minchinton RM *et al*, 2002). Así, individuos portadores de alelos *XA* en ambos cromosomas tienen niveles séricos mucho menores de lo esperado en individuos *A/A*, e individuos portadores de alelos *XA* en un cromosoma y *O* en el otro (*XA/O*) tienen niveles muy bajos de MBL en suero. Es por ello que, en base a la correspondencia observada entre los alelos y los genotipos y los niveles séricos de MBL, los genotipos *XA/O* y *O/O*, se consideran genotipos de producción baja o nula de MBL (esto se tratará de manera más extensa en el capítulo IV).

Aunque los resultados que asocian los genotipos con determinados niveles de proteína varían entre las poblaciones estudiadas, no hay consenso sobre el rango de concentración de MBL que constituye un valor sérico normal. La literatura muestra resultados contradictorios que pueden reflejar una combinación del efecto de otros polimorfismos aún no descritos, o de la existencia de polimorfismos específicos de poblaciones (Lee SG *et al*, 2005), si bien también puede deberse a la ausencia de estandarización metodológica y a la discrepancia en la interpretación de los datos.

Existen otros factores que afectan también a la producción de la MBL. De hecho, la MBL es una proteína de fase aguda que muestra un incremento moderado (de hasta tres veces) como consecuencia de infección o trauma (Thiel S *et al*, 1992). Del mismo modo, otros factores, como ciertas hormonas y citocinas, pueden influir en la síntesis de MBL (Arai T *et al*, 1993; Hansen TK *et al*, 2001).

SIGNIFICADO CLÍNICO DE LA MBL

Actualmente se sabe que la MBL juega un papel en diversos procesos, no sólo en la activación del complemento, sino también en la opsonofagocitosis independiente de complemento, en la modulación de la inflamación, y en el reconocimiento de estructuras propias alteradas y el aclaramiento de células apoptóticas. La fagocitosis es un paso crucial en la defensa para la eliminación de los patógenos. También es necesaria para la remodelación tisular durante el desarrollo y tras una lesión, y es un mecanismo de mantenimiento de la homeostasis mediante un aclaramiento rápido de las células apoptóticas. La MBL es un ligando de activación para la fagocitosis. En este sentido se ha observado que, *in vitro*, facilita directamente la eliminación rápida de células dañadas e impide la liberación de componentes intracelulares potencialmente dañinos. Al igual que otras colectinas, se une a determinadas estructuras de carbohidratos sobre las superficies microbianas y facilita la eliminación de los patógenos. Además, se ha visto que la MBL influye en la producción de citocinas por los monocitos y los macrófagos. Estudios *in vitro* han mostrado que, junto con C1q, contribuye a la señalización a los monocitos de sangre periférica, modulando la expresión de las citocinas proinflamatorias. Esta modulación sería ventajosa durante el aclaramiento de las células apoptóticas, así como de otros restos celulares, disminuyendo una posible respuesta inmunológica aberrante contra las proteínas propias (revisado en Bohlson SS *et al*, 2007). Cabe señalar que el defecto en el aclaramiento de las células apoptóticas se ha implicado en la patogénesis de ciertas patologías autoinmunes. Diversos estudios apuntan a un papel complejo de la MBL en la inflamación; de hecho, parece ser que el efecto de la MBL sobre la producción de citocinas es dependiente de su concentración (Klein NJ, 2005).

La elevada frecuencia de las variantes alélicas del gen *MBL2*, así como el hecho de la aparición de éstas en distintos grupos étnicos en diferentes áreas geográficas, sugiere que el defecto de MBL debe tener algún tipo de ventaja evolutiva, al igual que sucede con la anemia falciforme y la malaria. Actualmente hay dos hipótesis, no necesariamente excluyentes, para explicar la posible presión positiva que habría seleccionado a los alelos variantes de *MBL2*: la hipótesis principal sugiere que la MBL favorece la internalización de los microorganismos parásitos intracelulares, de modo que el defecto de MBL resultaría protector frente

a la infección por dichos microorganismos; la otra hipótesis plantea que una activación excesiva de complemento puede ser perjudicial, de modo que el defecto de MBL y, por tanto, una reducción en la activación del complemento, resultaría beneficioso en algunas circunstancias.

Es por ello que la MBL ha sido estudiada en gran número de enfermedades, habiéndose encontrado una asociación en algunas de ellas tanto con los niveles bajos de MBL como con los altos, así como con distintos alelos y genotipos del gen *MBL2*. Todo ello refleja lo que algunos autores han definido como “el carácter *Jekyll y Hyde*” de la MBL. Más recientemente otros autores han propuesto, como alternativa, la neutralidad evolutiva (Verdu P *et al*, 2006; Boldt AB *et al*, 2006). (Las diversas hipótesis, tanto de selección positiva, como de neutralismo, se recogen en el capítulo IV).

MBL e infección.

La MBL interactúa con una amplia variedad de patógenos (Jack DL *et al*, 2001; Kilpatrick DC *et al*, 2002; Eisen DP *et al*, 2003). Esto incluye bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, a las cuales opsoniza gracias a componentes de sus superficies celulares, como el lipopolisacárido y el ácido lipoteicoico.

El defecto de MBL se ha mostrado más relevante en los pacientes inmunocomprometidos. De hecho, los efectos del déficit de MBL se observaron originalmente en estudios realizados en población pediátrica (en niños entre 6 y 24 meses, en la ventana de vulnerabilidad en que ya han desaparecido los anticuerpos proporcionados por la madre, pero el sistema inmunológico adaptativo del niño aún está inmaduro), en los que se encontró una asociación entre el déficit de MBL e infecciones respiratorias agudas o recurrentes (Summerfield JA *et al*, 1997; Koch A *et al*, 2001) y con enfermedad meningocócica (Hibberd ML *et al*, 1999). Del mismo modo, se ha relacionado el defecto de MBL con infecciones bacterianas graves en pacientes adultos inmunosuprimidos con tratamiento quimioterápico (Peterslund NA *et al*, 2001; Mullighan CG *et al*, 2002). Los niveles bajos de MBL (o sus genotipos asociados) se han relacionado también con distintos tipos de enfermedad pulmonar bacteriana. Este es el caso de la neumonía neumocócica (Roy S *et al*, 2002; Kronborg G *et al*, 2002; Eisen DP *et al*, 2003), si bien hasta la fecha no ha habido

consenso sobre si la MBL se une al neumococo de forma significativa (la patología neumocócica se tratará con mayor amplitud en el capítulo VII). Por otra parte, la infección por micobacterias (tanto *Mycobacterium tuberculosis* como *M. leprae*) se ha asociado con niveles séricos elevados de MBL, dada su característica de patógenos intracelulares cuya internalización es facilitada por el complemento (el papel de la MBL en la tuberculosis se abordará con mayor profundidad en el capítulo VI). Estudios en fibrosis quística han mostrado un ejemplo del doble papel de la MBL en la susceptibilidad a la infección y la modulación de la inflamación (Nuytinck L y Shapiro F, 2004; Dommett RM *et al*, 2006).

También se ha observado la unión de la MBL a virus, como el herpes simplex o el influenza A. En el caso de los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) 1 y 2, se ha visto que la MBL opsoniza eficientemente el virus y es capaz de impedir su entrada en los linfocitos T, si bien su capacidad para neutralizarlo es relativamente baja. Diversos estudios se han centrado en el papel de la MBL en la susceptibilidad al VIH y en la progresión del SIDA (síndrome de la inmunodeficiencia adquirida) (este tema se abordará con mayor profundidad en el capítulo VI). Otros estudios han aportado resultados contradictorios sobre la influencia de la MBL en la hepatitis B y C, mientras que trabajos recientes han demostrado la unión de la MBL al coronavirus causante del SARS (síndrome respiratorio agudo severo) y su capacidad para inhibir la infección (Ip WK *et al*, 2005).

El manano, componente principal de la pared celular de los hongos, es reconocido por la MBL. De hecho, se ha observado la unión de MBL a una variedad de hongos, como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans*. El defecto de MBL se ha asociado con diversas micosis, lo cual es importante si se tiene en cuenta la frecuencia de las infecciones fúngicas en personas inmunocomprometidas y la dificultad su tratamiento. (Gadjeva M *et al*, 2004; Worthley DL *et al*, 2005).

La MBL también se une a diversos parásitos. De hecho, varios estudios han analizado el papel de la MBL en pacientes con malaria, aunque la mayoría ha encontrado una asociación nula o débil del defecto de MBL con la enfermedad. (Eisen DP y Minchinton RM, 2003).

MBL y enfermedades no infecciosas.

El defecto de MBL se ha relacionado con diversos trastornos autoinmunes. Existen evidencias de que el sistema inmunológico innato puede conducir a fenómenos de autoinmunidad al promover una respuesta inmunológica excesiva, o mediante un aclaramiento defectuoso de las células apoptóticas. Diversos estudios han asociado las variantes del gen *MBL2*, o la baja producción de MBL, con un mayor riesgo de padecer LES, así como con las posibles complicaciones de dicha enfermedad (lo cual se abordará con más profundidad en el capítulo V). Los estudios sobre el papel de la MBL en la susceptibilidad a la artritis reumatoide son controvertidos, aunque sí coinciden en el hecho de un peor pronóstico asociado al defecto de la proteína (Saevarsdottir S *et al*, 2001; Bouwman LH *et al*, 2006).

El papel patogénico de la MBL también ha sido estudiado en otras enfermedades cardiovasculares, tumorales y obstétricas.

Cuestión a parte sería el síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), un ejemplo, junto con la fibrosis quística, del papel de la MBL en la inflamación (Klein NJ, 2005; Thiel S *et al*, 2006). El SIRS puede producirse por diversas causas, siendo una de ellas la respuesta a una infección; es entonces cuando se emplea el término “sepsis” (la cual será tratada en el contexto de la neumonía adquirida en la comunidad en el capítulo VII). Otras enfermedades inflamatorias estudiadas en relación a la MBL han sido la colitis ulcerativa y el síndrome de Crohn.

Actualmente se tiende a pensar que el defecto de MBL se asocia selectivamente con un aumento en el riesgo de infección y de autoinmunidad, influyendo en la gravedad y en la evolución de múltiples enfermedades. Esta predisposición se hace más evidente en el contexto de otro defecto inmunológico, ya sea por una inmunodeficiencia primaria, o secundaria (como es el caso del SIDA, o del LES). Estos pacientes en que concurren el defecto de MBL y otra deficiencia del sistema inmunológico, deberían ser monitorizados de una forma más estrecha y tratados con criterios individualizados. No obstante, se precisan estudios más amplios, tanto en tamaño muestral como en diversidad de poblaciones, para alcanzar conclusiones definitivas.

LAS SERINA-PROTEASAS ASOCIADAS A MBL

Las MASPs son unas enzimas proteolíticas responsables de la activación de la VL del complemento, las cuales pertenecen a la superfamilia de las serina-proteasas. Tanto la MBL como las ficolinas se han encontrado asociadas con las MASP-1, 2 y 3, así como con la no proteasa MAp19 (o sMAP) (Fujita T *et al*, 2004; Sorensen R *et al*, 2005).

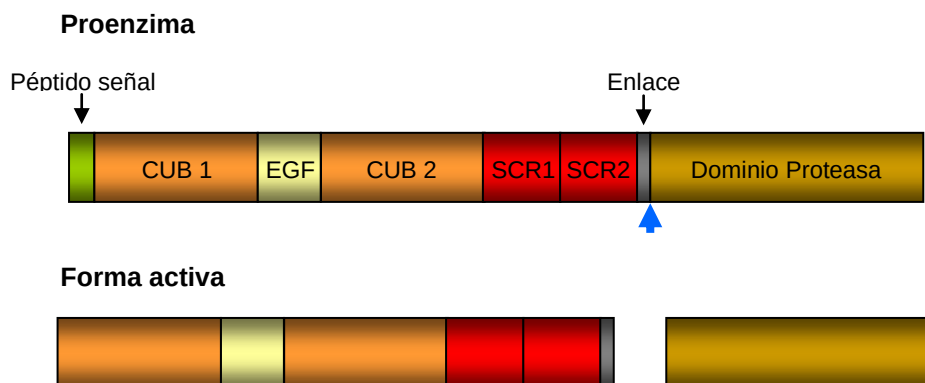


Figura I.5. Estructura de los dominios de las MASPs: dos dominios CUB separados por un dominio EGF (dominio tipo factor de crecimiento epidérmico), dos dominios CCP (proteínas de control de complemento) o SCR (repeticiones consenso cortas) y un dominio de serina-proteasa. Al unirse la MBL a los carbohidratos sobre la superficie de los microorganismos, la forma proenzima de la MASP se fragmenta, lo que da lugar a la forma activa, constituida por dos polipéptidos. (Modificado de T. Fujita *et al*, Immunological Reviews 2004).

Su estructura general, similar a los componentes de la VC C1r y C1s, consiste en seis dominios: dos dominios CUB, uno de proteína tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), dos proteínas de control de complemento o repeticiones consenso cortas, y un dominio serina-proteasa (figura I.5) (Fujita T *et al*, 2004). Se ha observado que las MASPs se encuentran formando homodímeros, para lo cual son necesarios los dominios CUB1-EGF. Estos dominios también son necesarios para la unión de las MASPs a la MBL, que parece ocurrir a través de la región colágeno de ésta última (Holmskov U *et al*, 2003; Takahashi K *et al*, 2006). Se ha observado que menos de un 10% de MASP-1, MASP-2 y MAp19 está formando un complejo con la MBL (Sorensen R *et al*, 2005).

La MASP-2 activa a C4 y C2 de una manera aparentemente idéntica a las enzimas de C1 C1r y C1s. La forma activa de la MASP-2 consiste en dos

polipéptidos unidos por puentes disulfido a la MBL (Holmskov U *et al*, 2003; Fujita T *et al*, 2004). Estos polipéptidos son sintetizados en el hígado y secretados al suero en su estado de proenzima inactiva. Es esta forma de proenzima la que establece complejos con la MBL y, cuando se produce la unión de la MBL (o las ficolinas) a los carbohidratos de la superficie de los microorganismos, la forma de proenzima de la MASP se fragmenta, convirtiéndose en la forma activa y adquiriendo así su actividad proteolítica frente a los componentes del complemento. La MASP-2 fragmenta a C4 y C2, generando la convertasa de C3. Por su parte, se ha observado que la MASP-1 fragmenta a C3 y C2, mientras que el papel de MASP-3 y de MASP-19 en este contexto permanece desconocido (Holmskov U *et al*, 2003; Fujita T *et al*, 2004).

Las MASPs son codificadas por dos genes. El gen *MASP2* se encuentra en el cromosoma 1p36.2-3, siendo la MASP-19 una forma truncada de la MASP-2. El gen *MASP-1/3*, en el cromosoma 3q27-q28, codifica la MASP-1 y, mediante un procesamiento alternativo, la MASP-3 (Holmskov U *et al*, 2003).

Debido al papel que desarrolla la MASP-2 en la actividad biológica, tanto de la MBL como de las ficolinas, cabría esperar que el defecto de MASP-2 tuviera unas consecuencias más amplias que el de la MBL. En 2003 se describió el primer individuo con defecto funcional de la MASP-2 (Stengaard-Pedersen K *et al*). Este individuo resultó ser homocigoto para una mutación en el dominio CUB1 del gen *MASP2*, la cual fue denominada *D105G*, y cuya consecuencia era una reducción drástica en los niveles séricos de la proteína y de la actividad de la VL. Este individuo era un paciente con diversas manifestaciones autoinmunes e infecciones recurrentes, incluyendo neumonía y bacteriemia. Recientemente se han descrito otros casos con este defecto en homocigosis (esto se tratará más ampliamente en el capítulo VIII). La presencia de esta mutación y su posible papel se ha estudiado en diversas enfermedades, sin observarse ningún resultado clínico relevante, aunque sí una asociación entre los niveles séricos de MASP-2 y la gravedad y el pronóstico de ciertos tipos de cáncer (Ytting H *et al* 2005 y 2005b).

Se han descrito otras mutaciones en el gen *MASP2* en diversas poblaciones, con un claro carácter de endemismo en la mayoría de los casos. Algunas de estas mutaciones se han relacionado con niveles reducidos de MASP-2, aunque la mutación *D105G* es la causa principal de los niveles bajos de esta proteína en población caucásica (Lozano F *et al*, 2005; Thiel S *et al*, 2007). Además, hasta la

fecha no se ha descrito asociación de ninguna de estas otras mutaciones con enfermedad alguna.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

En base a los antecedentes expuestos en el capítulo I, se plantean las siguientes hipótesis:

1. a. Las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* varían en las distintas poblaciones.
1. b. Los niveles séricos de MBL y la actividad de la VL dependiente de MBL varían en función del genotipo *MBL2*.
2. Los alelos y genotipos del gen *MBL2* asociados a una producción insuficiente de la proteína son un factor de susceptibilidad de padecer LES, así como de padecer determinadas manifestaciones clínicas de la enfermedad y de una peor evolución de ésta.
3. a. Los alelos y genotipos del gen *MBL2* asociados a una producción insuficiente de la proteína se asocian con una mayor susceptibilidad a la infección por el VIH.
3. b. Los alelos y genotipos de producción suficiente de MBL se asocian con una mayor susceptibilidad a padecer tuberculosis (TBC) activa, tanto en individuos VIH-positivos, como en VIH-negativos.
4. Los alelos y genotipos del gen *MBL2* asociados a una producción insuficiente de la proteína se asocian con una mayor susceptibilidad a neumonía adquirida en la comunidad (NAC), así como a una mayor gravedad y a un peor pronóstico de la misma.
5. a. Las frecuencias alélicas y genotípicas del alelo mutado *D105G* del gen *MASP2* varían en las distintas poblaciones.
5. b. Los niveles séricos de MASP-2 varían en función del genotipo *MASP2*, y la actividad de la VL dependiente de MBL varía en función de los genotipos *MBL2* y *MASP2*.

5. c. Los alelos y genotipos del gen *MASP2* defectuosos en la producción de proteína se asocian con la susceptibilidad y gravedad de enfermedades autoinmunes e infecciosas, como son el caso del LES y la NAC en adultos.

OBJETIVOS

1. a. Establecer las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del gen *MBL2* en población española, canaria y bereber, y analizar las diferencias entre estas poblaciones y otras previamente descritas.
1. b. Confirmar la correspondencia entre los grupos de genotipos y los niveles séricos de MBL, así como la actividad de la VL dependiente de MBL.
2. Determinar si los polimorfismos del gen *MBL2* se asocian con la susceptibilidad al LES y con ciertas características clínicas de la enfermedad en mujeres canarias.
3. a. Determinar si los polimorfismos del gen *MBL2* se asocian con la susceptibilidad a infección por el VIH, así como con determinadas características epidemiológicas de los pacientes VIH-positivos.
3. b. 1. Determinar si los polimorfismos del gen *MBL2* se asocian con la susceptibilidad a TBC activa en pacientes VIH-negativos. Comparar las frecuencias de estos polimorfismos con las de individuos del entorno familiar de los pacientes, pero que no hayan desarrollado la enfermedad (estén infectados o no por el *M. tuberculosis*).
3. b. 2. Determinar si los polimorfismos del gen *MBL2* se asocian con la susceptibilidad a TBC activa en pacientes VIH-positivos.
4. Determinar si los polimorfismos del gen *MBL2* se asocian con la susceptibilidad a NAC en población española, así como con una mayor gravedad y un peor pronóstico de la enfermedad. Analizar si existen diferencias en función del patógeno causante de la enfermedad (principalmente *Streptococcus pneumoniae*).
5. a. Establecer las frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación *D105G* del gen *MASP2* en las distintas poblaciones sanas estudiadas y analizar las diferencias entre estas poblaciones.

5. b. Confirmar la correspondencia entre los grupos de genotipos y los niveles séricos de MASP-2, así como con la actividad de la VL dependiente de MBL.
5. c. Determinar si el polimorfismo *D105G* del gen *MASP2* se asocia con la susceptibilidad al LES y a la NAC en adultos.

CAPÍTULO III

**MATERIALES Y MÉTODOS
GENERALES**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. GRUPOS DE INDIVIDUOS A ESTUDIO

1.1. POBLACIONES SANAS A ESTUDIO

POBLACIÓN CANARIA

El grupo control de población sana canaria lo formaron 730 individuos de origen español no relacionados entre sí, los cuales fueron voluntarios en el Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín”. La edad media de este grupo control fue de 35,40 años $\pm$ 10,68 (56.7% mujeres).

POBLACIÓN DE MADRID

Se analizó un grupo sano de individuos de Madrid formado por 388 donantes de sangre (40.7% mujeres; edad media 51,63 $\pm$ 17,49 años) de origen español y no relacionados entre sí, voluntarios en el Hospital Universitario de la Princesa.

POBLACIÓN DE VALENCIA

El grupo sano de población valenciana lo formaron 329 donantes de sangre (edad media 38,79 $\pm$ 9.92 años; 37.6% mujeres) de origen español y no relacionados entre sí, voluntarios en el Hospital Clínico Universitario de Valencia.

POBLACIÓN DE HUESCA

El grupo sano de población de Huesca lo formaron 107 donantes de sangre (edad media 41,90 $\pm$ 9,74 años; 74,5% mujeres) voluntarios en el Hospital San Jorge.

POBLACIÓN BEREBER

Se analizaron 70 muestras de origen bereber procedentes de individuos sanos de la región del Atlas (Marruecos) (edad media 40,40 años $\pm$ 14,39; 57.1% mujeres), obtenidas por la Dra. Laila El Fenniri (Département d'Immunologie-

Virologie, Institut national d'Hygiène, Rabat, Moroc) y procesadas en nuestro hospital.

CONTACTOS FAMILIARES DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS

Se analizaron 142 contactos familiares de los pacientes con TBC. Estos son descritos en el capítulo VI.

1.2. CASOS

PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

En el estudio se incluyeron 89 mujeres españolas no relacionadas, en seguimiento en el Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín”. Estas son descritas en el capítulo V.

PACIENTES CON TUBERCULOSIS ACTIVA

En este grupo se incluyeron 127 pacientes españoles diagnosticados de TBC en el Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín”. Estos son descritos en el capítulo VI.

PACIENTES INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Este grupo lo formaron 615 pacientes españoles infectados por el VIH, en seguimiento en el Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín”. Ciento seis de estos pacientes también fueron diagnosticados de TBC. Los pacientes infectados por el VIH son descritos en el capítulo VI.

PACIENTES CON NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

En este grupo se incluyeron 848 pacientes ingresados con diagnóstico de NAC en el Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín”, en el Hospital Universitario de La Princesa y en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. Estos pacientes se describen en el capítulo VII.

1.3. OTROS GRUPOS

CONTROLES PAREADOS NO SANOS DE LOS PACIENTES CON NAC

Se analizaron 391 individuos de Gran Canaria y 128 de Madrid con enfermedades no infecciosas, ajustados por edad y sexo con los pacientes con NAC. Estos son descritos en el capítulo VII.

2. DETERMINACIONES GENÉTICAS

La extracción de ADN, así como el tipaje de los genes *MBL2* y *MASP2* de todas las muestras, se realizaron en la Unidad de Inmunología del Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín”.

2.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

De cada individuo a estudio se obtuvo una muestra de entre 5 y 10 ml de sangre venosa anticoagulada en un tubo con EDTA, que se procesó según el siguiente protocolo estándar de extracción por fenol-cloroformo (modificado de Blin N y Stafford DW, 1976):

Para el aislamiento y lavado de las células blancas, a la sangre total de cada individuo se le añadió tampón de lisis de células rojas hasta un volumen de 50 ml y se centrifugó a 600 $\times g$ durante 10 minutos. A continuación se decantó el sobrenadante y se repitió el lavado dos veces más.

Las células blancas se lisaron resuspendiendo el precipitado resultante en 4 ml de solución de lisis e incubando en agitación a 42°C hasta el día siguiente. Tras este paso, se añadieron 4 ml de fenol/cloroformo/isoamílico y se puso en agitación 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugándose a continuación 10 minutos a 1.700 $\times g$. La fase superior (acuosa) resultante se pasó a otro tubo y se repitió el proceso, desechándose la fase inferior (orgánica). Para el siguiente paso, se añadieron 4 ml de cloroformo-isoamílico a la fase superior y se puso en agitación a temperatura ambiente durante 7 minutos, tras lo cual se centrifugó 5 minutos a 1.200 $\times g$. De nuevo se rescató la fase superior acuosa y se repitió el proceso. Se añadieron 300 μl de NaCl 3M y 4 ml de isopropanol, mezclando suavemente por inversión hasta la aparición del precipitado. Dicho precipitado se extrajo a otro

tubo y se lavó durante 30 minutos en etanol al 70% frío, tras lo cual se dejó secar a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Una vez seco, se añadieron 500 µl de tris-EDTA (TE) 1/0,1 y se puso a rotar en un agitador orbital en días sucesivos hasta su resuspensión.

A los ADN así resuspendidos se les midió tanto su concentración como su pureza mediante espectrofotometría, ajustándose la concentración a 100 µg/ml mediante adición del TE 1/0,1 necesario.

2.2 DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN *MBL2*

La tabla III.1 muestra las secuencias de los oligonucleótidos empleados para las distintas amplificaciones. Los protocolos empleados son en su mayoría modificaciones de Madsen HO *et al* (1994, 1995 y 1998) y Sullivan KE *et al* (1996).

Tabla III.1. Oligonucleótidos empleados para el análisis genético de los genes *MBL2* y *MASP2*.

Nombre	Amplificación	Secuencia
MBP2	Reverso SDM-PCR alelo D, PCR-SSP H, L, X e Y	5'-CAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3'
MBP3	Directo PCR alelos B y C	5'-CCCAGATTGTAGGACAGAG-3'
MBP4	Directo SDM-PCR alelo D	5'-CATCAACGGCTTCCCAGGCAAAGACGCG-3'
MBP5	Directo PCR-SSP alelo L	5'-TTACCCAGGCAAGCCTGTC-3'
MBP7	Directo PCR-SSP alelo X	5'-CATTTGTTCTCACTGCCACC-3'
MBP8	Directo PCR-SSP alelo Y	5'-CATTTGTTCTCACTGCCACG-3'
MBP13	Directo PCR-SSP alelo H	5'-GCTTACCCAGGCAAGCCTGTG-3'
MBP14	Reverso PCR-SSP alelo X c/t	5'-GGAAGACTATAAACATGCTTTTCG-3'
MBP15	Reverso PCR-SSP alelo Y c/t	5'-GGAAGACTATAAACATGCTTTCC-3'
MBP17	Reverso PCR alelos B y C	5'-AGTTGTTGTTCTCCTGTCCAG-3'
PQD	Directo SDM-PCR P/Q	5'-ACCCAGATTGTAGGACAGAGGGCAAGC-3'
PQI	Reverso SDM-PCR P/Q	5'-TTGCAGAGACAGAACAGC-3'
EXTD	Directo PCR-SSP X/Y	5'-GCTTACCCAGGCAAGCCTG-3'
CUB1D	Directo PCR MASP-2	5'-CCTGGCAAGGACACTTTCTAC-3'
M2-1R2	Reverso PCR MASP-2	5'-ACTGAAGGCAGGGCTGCCTG-3'

c/t: cis/trans

En la figura III.1 se puede ver un esquema de la región a amplificar del gen *MBL2*, con la situación de los oligonucleótidos utilizados.

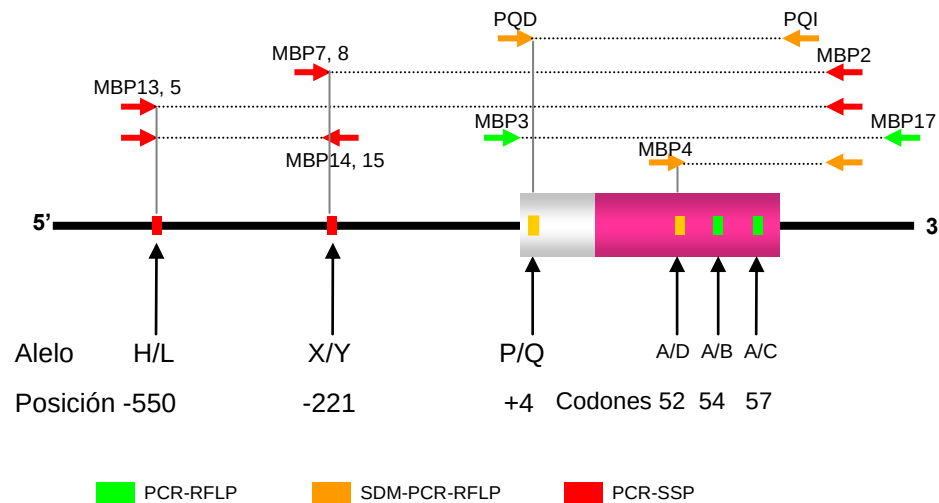


Figura III.1. Representación esquemática de la región estudiada del gen *MBL2*, señalando la posición de los sitios polimórficos analizados, así como la colocación de los oligonucleótidos empleados y el tipo de amplificación llevada a cabo con éstos.

TIPAJE DE LAS VARIANTES DEL EXÓN 1

Amplificación del ADN:

Para la determinación de las mutaciones en posición 54 y 57 del exón 1 del gen *MBL2* (alelos *B* y *C* respectivamente) se amplificó un fragmento de 679 pb de la región mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los oligonucleótidos MBP3 y MBP17. La amplificación se realizó en un volumen de 50 µl, con 250 ng de ADN genómico, 1,5 mM de MgCl₂, deoxinucleótidos trifostato (dNTP) a 0,2 mM cada uno, 0,3 µM de cada oligonucleótido y 1,25 U de polimerasa AmpliTaq (Perkin-Elmer, NJ, EE.UU.) en su propio tampón. La PCR se realizó en un termociclador 9.600 de Perkin-Elmer según el siguiente protocolo: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C; 30 ciclos de 30s a 94°C, 60s a 62°C y 120s a 72°C; 5 minutos de extensión final a 72°C.

Para la determinación de la mutación en posición 52 del exón 1 del gen (alelos *D*) se amplificó un fragmento de 119 pb de la región mediante PCR con

mutagénesis dirigida de sitio (SDM-PCR) empleando los oligonucleótidos MBP2 y MBP4 como cebadores específicos, y una banda control de 294 pb en el mismo tubo de reacción, con los oligonucleótidos MBP9 y MBP10. La amplificación se realizó en un volumen de 50 µl, con 350 ng de ADN genómico, 1,5 mM de MgCl₂, dNTP a 0,2 mM cada uno, 0,3 µM de cada oligonucleótido y 1,25 U de polimerasa AmpliTaq en su propio tampón. La PCR se realizó en un termociclador PTC-100 de MJ Research según el siguiente protocolo: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C; 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 58°C y 60s a 72°C; 5 minutos de extensión final a 72°C.

Para verificar la amplificación de ambas PCR, se tomaron 8 µl de cada producto de amplificación y se mezclaron con 4 µl de tampón de carga y 8 µl de agua destilada, sometiéndose los 20 µl finales de cada muestra a electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,005%) y visualización en un transiluminador de luz UV.

Análisis de los polimorfismos:

La determinación de la presencia o no de las tres mutaciones se realizó mediante digestión con enzimas de restricción y análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Para el análisis del alelo *B*, se sometió el producto de PCR a digestión con la enzima BanI (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) incubando 8 µl del amplificado con 8 U de la restrictasa durante 60 minutos a 50°C. A continuación, el volumen total fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, visualizado en luz UV y fotografiado. La enzima BanI tiene un sitio de corte constitutivo en el fragmento amplificado, dando lugar al siguiente patrón de bandas: una banda de 569 pb y otra de 116 pb en los individuos homocigotos no portadores de la mutación; en los individuos homocigotos mutados la banda de 569 pb, es escindida en dos de 308 y 261 pb, manteniéndose intacta la banda de 166 pb; los individuos heterocigotos presentan los cuatro tamaños de banda (569, 308, 261 y 166 pb) (Fig. III.2 A).

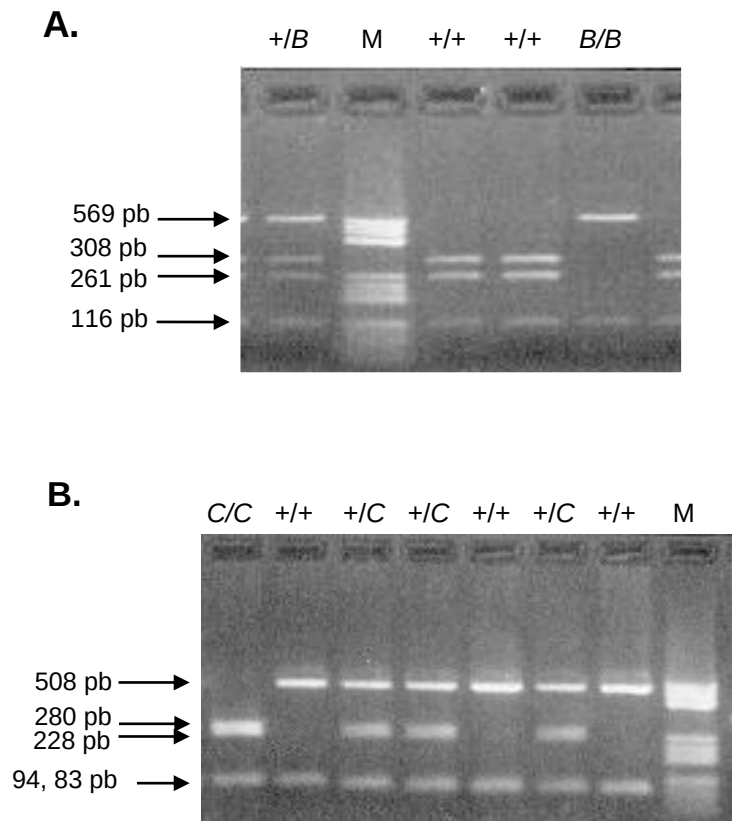


Figura III.2. Gel de electroforesis mostrando el patrón de bandas obtenidas tras el análisis por RFLP (análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) del producto de amplificado de 685 pb para la identificación de los alelos mutados *B* y *C* del gen *MBL2*. **A.** RFLP mediante la enzima de restricción *BanI* para el análisis de los alelos *B* (+/+ : individuo homocigoto no portador de la mutación, +/B : individuo heterocigoto, B/B : individuo homocigoto mutado; M: marcador de peso molecular). **B.** RFLP mediante la enzima de restricción *MboII* para el análisis de los alelos *C* (+/+ : individuo homocigoto no portador de la mutación, +/C : individuo heterocigoto, C/C : individuo homocigoto mutado; M: marcador de peso molecular). Ambas fotografías corresponden a geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

Para el análisis del alelo *C*, el producto de PCR fue sometido a digestión con la enzima *MboII* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.), incubando 8 µl del amplificado con 7 U de la restrictasa durante 90 minutos a 37°C. A continuación, el volumen total fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, visualizado en luz UV y fotografiado. La *MboII* tiene dos sitios de corte constitutivo, dando lugar al siguiente patrón de bandas: 3 bandas de 508, 94 y 83 pb en los individuos homocigotos no portadores de la mutación; en los individuos homocigotos mutados el fragmento de 508 pb es escindido en dos fragmentos de 280 y 228 pb, manteniéndose intactos los

fragmentos de 94 y 83 pb; los individuos heterocigotos presentan los cinco tamaños de banda (508, 280, 228, 94 y 83 pb) (Fig.III. 2 B).

Para el análisis del alelo *D*, se sometió el producto de la SDM-PCR a dos digestiones por separado, incubando 8 µl del amplificado con 15 U de la enzima *Mlu*I (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) y otros 8 µl del amplificado con 12 U de la enzima *Hha*I (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) o su isoesquizómero, la *Cfo*I (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), ambos durante 90 minutos a 37°C. A continuación, el volumen total fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y posterior tinción en un baño de bromuro de etidio, visualizándose en luz UV y fotografiándose. La *Mlu*I divide el producto de la SDM-PCR específico para el alelo *D* en dos fragmentos de 100 y 25 pb, no produciéndose corte si el individuo carece de este alelo (o sea, en el caso de alelo *A*, *B* o *C*). La *Hha*I (o *Cfo* I) escinde el producto de amplificado en los fragmentos de 100 y 25 pb en individuos con alelos *A*, *B* o *C*, no digiriendo el amplificado en el caso de alelo *D*. Por su parte, el amplificado correspondiente al control de corte genera dos bandas de 245 y 49 pb en todos los individuos al ser digerido con la *Mlu*I (Fig. III.3).

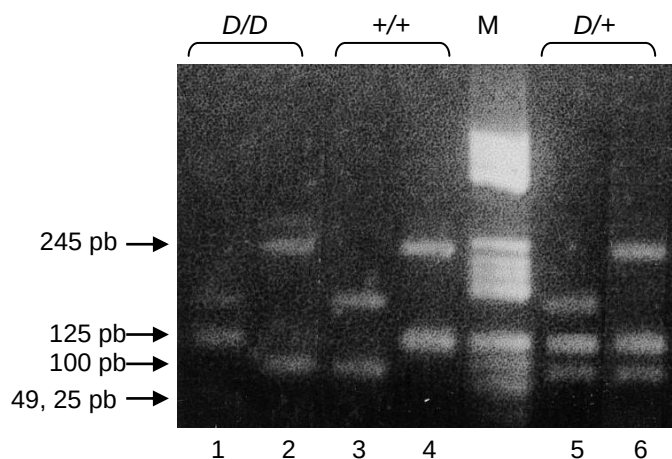


Figura III.3. Gel de electroforesis mostrando el patrón de bandas obtenidas tras el análisis por RFLP (análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) del producto de amplificado de 125 pb para la identificación del alelo mutado *D* del gen *MBL2*. Las calles 2, 4 y 6 muestran el resultado del análisis por RFLP mediante la enzima de restricción *Mlu*I, mientras que las calles 1, 3 y 5 muestran el resultado de RFLP mediante la enzima *Hha*I (o su isoesquizómera *Cfo*I) (+/+ : individuo homocigoto no portador de la mutación, +/D: individuo heterocigoto, D/D: individuo homocigoto mutado; M: marcador de peso molecular). La fotografía corresponde a un gel de poliacrilamida al 6% teñido con bromuro de etidio.

TIPAJE DE LAS VARIANTES DE LA REGIÓN DEL PROMOTOR

Amplificación del ADN:

Para la determinación de las variantes del promotor del gen se amplificó la región mediante PCR con oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSP).

Para las variantes del promotor en posición -550 (alelos *H* o *L*), se emplearon el oligonucleótido MBP13 como específico para la reacción de amplificación del alelo *H* y el MBP5 como específico para la amplificación del alelo *L*, y el MBP2 como reverso de ambas. En ambas amplificaciones se incluyeron dos oligonucleótidos para generar un control de amplificación de 226 pb. Ambas amplificaciones se realizaron en un volumen de 50 µl, con 300 ng de ADN genómico, 2,3 mM de MgCl₂, dNTP a 0,2 mM cada uno, 0,18 µM de cada oligonucleótido y 2 U de polimerasa AmpliTaq en su propio tampón. Las PCR se realizaron en un termociclador 9.600 de Perkin-Elmer según el siguiente protocolo: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C; 30 ciclos de 30s a 94°C, 60s a 65°C y 60s a 72°C; 5 minutos de extensión final a 72°C. Los productos de amplificación resultantes tanto para el alelo *H* como para el *L* tenían 883 pb.

Para las variantes del promotor en posición -221 (alelos *X* o *Y*), se procedió del mismo modo que para las variantes en posición -550, pero empleándose los oligonucleótidos MBP7 como específico para *X* y MBP8 como específico para *Y*, teniendo los productos resultantes 554 pb, tanto para el alelo *X* como para el *Y*.

Para el tipaje de *X/Y* en aquellos grupos en que sólo se analizaron las variantes de exón y ésta variante de promotor, se empleó una técnica de PCR-SSP, en la cual se amplifican en la misma reacción ambos alelos. Para ello se emplearon los siguientes cebadores: MBP7 como específico para *X*, MBP15 como específico para *Y*, EXT-D como oligonucleótido directo tanto para la amplificación de *Y* como de la banda control de amplificación, y MBP2 como oligonucleótido reverso para la amplificación de *X* y de la banda control. Los amplificadores resultantes tenían un tamaño de 554 pb para el alelo *X*, 372 para el *Y*, y 884 el control.

Para el análisis de la localización cis/trans de las variantes del promotor se realizaron cuatro PCR-SSP en las que el oligonucleótido directo era específico para una variante de la posición -550 y el reverso para una variante de la posición -221. Para *HY* se emplearon los oligonucleótidos MBP13 (directo específico de *H*)

y MBP15 (reverso específico de Y); para *LY* se emplearon MBP5 (directo específico de *L*) y MBP15; para *LX*, MBP5 y MBP14 (reverso específico de *X*); para *HX*, MBP13 y MBP14. En las cuatro amplificaciones se emplearon también en la misma reacción los oligonucleótidos MBP9 y MBP10 para la generación de una banda control de amplificación. La amplificación se realizó del mismo modo que para las PCR-SSP sencillas, pero con 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 60°C y 30s a 72°C. Los amplificados *HY* y *HX* tenían un tamaño de 372 pb, mientras que los de *LY* y *LX* tenían 370 pb.

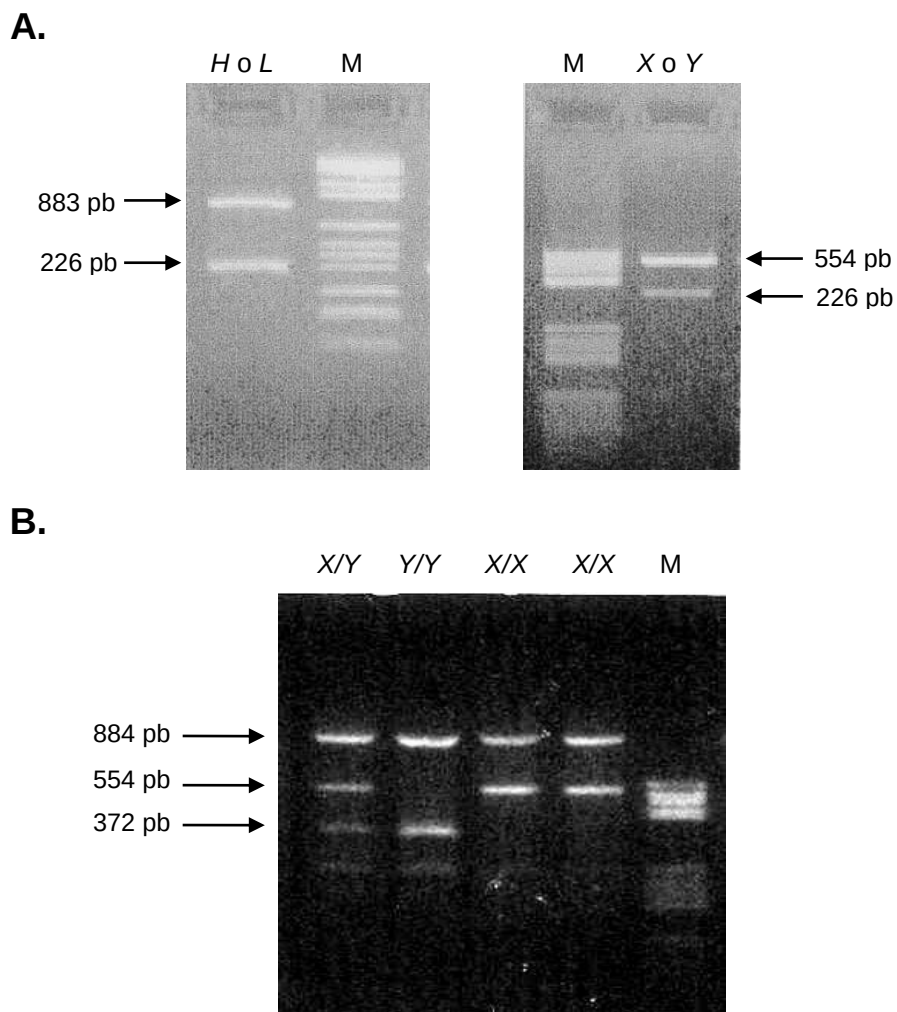


Figura III.4. Gel de electroforesis mostrando el patrón de bandas resultantes de la amplificación de la región del promotor del gen *MBL2* para la identificación de los alelos variantes *H* y *L*, así como *X* e *Y*. **A.** Bandas de amplificación de la PCR-SSP (amplificación por reacción en cadena de la polimerasa con polimorfismo de cadena sencilla) para el análisis de los alelos *H/L* y *X/Y*. **B.** Bandas de amplificación de la PCR-SSP doble para el análisis de los alelos *X/Y*. M: marcador de peso molecular. Sendas fotografías corresponden a geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

Análisis de los polimorfismos:

Para determinar tanto las variantes de promotor presentes en cada individuo, como su localización cis/trans, se tomaron 8 µl de cada producto de amplificación y se sometieron a electroforesis en agarosa con bromuro de etidio y visualización en luz UV, del mismo modo que para las PCR-RFLP (Figuras III.4 y III.5).

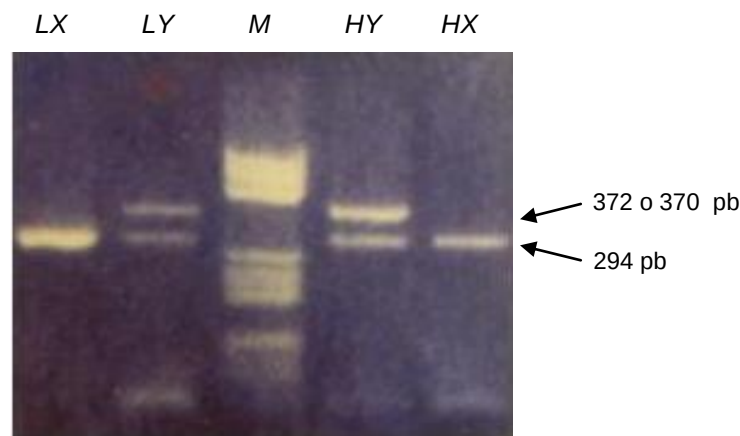


Figura III.5. Gel de electroforesis mostrando el patrón de bandas resultante de la amplificación de la región del promotor del gen *MBL2* para el análisis de la localización cis/trans de las variantes del promotor. La imagen muestra el bandeo resultante de las PCR-SSP (amplificación por reacción en cadena de la polimerasa con polimorfismo de cadena sencilla) con oligonucleótidos directos y reversos específicos de polimorfismo, en un individuo positivo para el haplotipo *HY* y *LY*, con lo cual es negativo para los haplotipos *LX* y *HX*. M: marcador de peso molecular. La fotografía corresponde a un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

TIPAJE DE LAS VARIANTES DE LA REGIÓN 5'UT

Amplificación del ADN:

Para la determinación de la mutación en la región 5'UT del gen *MBL2* (alelos *P* o *Q*) se amplificó un fragmento de 136 pb de la región mediante SDM-PCR empleando los oligonucleótidos PQD y PQI como cebadores específicos, y otra pareja de oligonucleótidos para generar una banda control, en el mismo tubo de reacción. La amplificación se realizó de igual modo que la SDM-PCR para la determinación del alelo *D*, pero en un termociclador 9.600 de Perkin-Elmer y con una temperatura de anillamiento en los ciclos de 55,5°C.

Para verificar la amplificación, se visualizó el amplificado en UV tras electroforesis en agarosa, de la misma manera ya citada en los apartados anteriores.

Análisis de los polimorfismos:

La determinación de la presencia del alelo *P*, *Q*, o ambos, se realizó mediante SDM-PCR-RFLP. El producto de la SDM-PCR fue sometido a digestión con la enzima HindIII (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.), incubando 8 µl del amplificado con 7 U de la restrictasa durante 90 minutos a 37°C. A continuación, el volumen total fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y posterior tinción en baño de bromuro de etidio, visualizándose en luz UV y fotografiándose. La enzima HindIII reconoce una diana en los alelos *Q*, dividiendo el amplificado en dos fragmentos de 110 y 26 pb, mientras que deja intactos los alelos *P*. En los individuos heterocigotos se observan los tres tamaños de banda: 136, 110 y 26 pb (Fig. III.6).

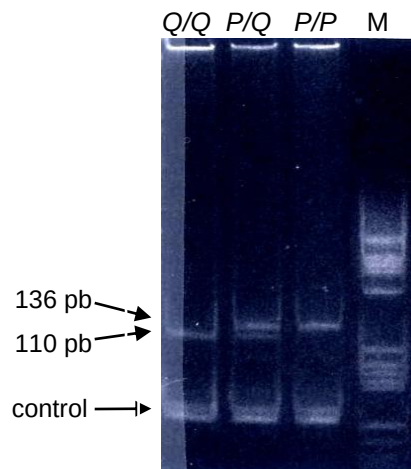


Figura III.6. Gel de electroforesis mostrando el patrón de bandas obtenido tras el análisis por RFLP (análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) mediante la enzima de restricción Hind III del producto de amplificado de 136 pb, para la identificación de las variantes alélicas *P* y *Q* de la región 5'UT del gen *MBL2*. M: marcador de peso molecular. La fotografía corresponde a un gel de poliacrilamida al 6% teñido con bromuro de etidio.

ASIGNACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS

En la primera población analizada, un grupo de 344 individuos de población general de Gran Canaria, se confirmó la localización cis/trans de las

variantes del promotor respecto a las variantes estructurales. Para ello se realizó una PCR anidada (*nested*) (para los alelos *B* y *C*) o una SDM-PCR (para el alelo *D*) sobre los productos de PCR-SSP, seguido de un análisis de RFLP con las enzimas de restricción correspondientes.

Dado el resultado de este análisis, así como lo descrito por otros autores, para el resto de los grupos a estudio se asumió la correspondencia del alelo *B* con el haplotipo *LYPB*, del alelo *C* con el haplotipo *LYQC* y del alelo *D* con el haplotipo *HYPD*.

CONFIRMACIÓN DE HOMOZIGOTOS POR SECUENCIACIÓN

En la primera población analizada, el grupo de 344 individuos de población general de Gran Canaria, se confirmó la correcta determinación de los individuos homocigotos mutados mediante secuenciación directa en un secuenciador automático (ALF express, Pharmacia Biotech) en la Unidad de Genética Forense de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

TIPAJE GENÉTICO DEL GEN *MBL2* MEDIANTE KIT COMERCIAL

En un grupo de 150 controles sanos pertenecientes al personal hospitalario, el análisis genético completo del gen *MBL2* se realizó mediante el sistema de INNO-LiPA *MBL2* (Innogenetics, Ghent, Bélgica).

Fundamento del sistema INNO-LiPA *MBL2*:

El sistema INNO-LiPA *MBL2* permite el genotipaje simultáneo de 6 variantes del gen *MBL2*. Se basa en un método de hibridación reversa, en el cual se hibrida el ADN amplificado sobre 12 sondas, específicas para las variantes del gen, inmovilizadas sobre tiras.

Protocolo INNO-LiPA *MBL2*:

1. Amplificación del ADN.

Se amplificaron 500 ng de ADN de cada muestra con la siguiente mezcla maestra:

- 10 µl de tampón de amplificación (AB)
- 10 µl de solución de oligonucleótidos (PS)
- 0,1 µl de AmpliTaq polimerasa (Perkin-Elmer)

24,9 ml de H₂O estéril

En cada reacción se incluyó un control negativo con 5 µl de H₂O estéril.

La amplificación se realizó en un termociclador 9.600 de Perkin-Elmer con un ciclo inicial de desnaturalización de 15 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 65°C y 60s a 72°C, y un ciclo final de elongación de 7 minutos a 72°C.

El amplificado se visualizó en un transiluminador de luz UV tras electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Por cada muestra aparecen dos bandas de 473 y 379 pb.

2. Hibridación.

Para la hibridación se usaron entre 7 y 10 µl de los amplificados, en función de la intensidad observada de las bandas en el gel.

Tanto la hibridación (hibridación reversa en tiras de INNO-LiPA MBL2 con 12 sondas inmovilizadas), como los posteriores pasos de lavado y revelado de color, se realizaron de forma automatizada en un aparato Auto-LiPA 48 (Innogenetics).

3. Lectura del resultado.

La interpretación del patrón de reactividad de las sondas se realizó mediante el software de análisis para Lipa MBL2 (Innogenetics).

2.3. DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO EN LA REGIÓN CUB-1 DEL GEN *MASP2*

Análisis genético del polimorfismo en el exón 3 (en el dominio CUB-1) del gen *MASP2*, que produce un cambio de Asp (GGC) a Gly (GAC) (alelos A y G respectivamente).

TIPAJE DE LAS VARIANTES A Y G

Amplificación del ADN:

Para la determinación de la mutación en el exón 3, en el dominio CUB1 del gen *MASP2*, se amplificó un fragmento de 200 pb de la región mediante PCR empleando los oligonucleótidos CUB1D y M2-1R2. La amplificación se realizó en un volumen de 25 µl, con 150 ng de ADN genómico, 1,5 mM de MgCl₂, dNTP a 0,2 mM cada uno, 0,27 µM de cada oligonucleótido y 0,75 U de polimerasa AmpliTaq (Perkin-Elmer, NJ, EE.UU.) en su propio tampón. La PCR se realizó

en un termociclador PTC-100 de MJ Research empleando el mismo programa de amplificación que la SDM-PCR para alelos *D* del gen *MBL2*.

Para verificar la amplificación se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualización en un transiluminador de luz UV (mismo procedimiento que para las anteriores PCR).

Análisis del polimorfismo:

La determinación de la presencia o no de la mutación se realizó mediante digestión con enzima de restricción y análisis de RFLP.

Se sometió el producto de PCR a digestión con la enzima HpaII (Roche Diagnostics, Indianapolis, EE.UU.) incubando 7 µl del amplificado con 15 U de la restrictasa durante 90 minutos a 37°C. A continuación, el volumen total fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, visualizado en luz UV y fotografiado. La HpaII tiene un sitio de corte en los alelos G, dando lugar a dos fragmentos de 144 y 56 pb, no digiriéndose los alelos A (Fig. III.7).

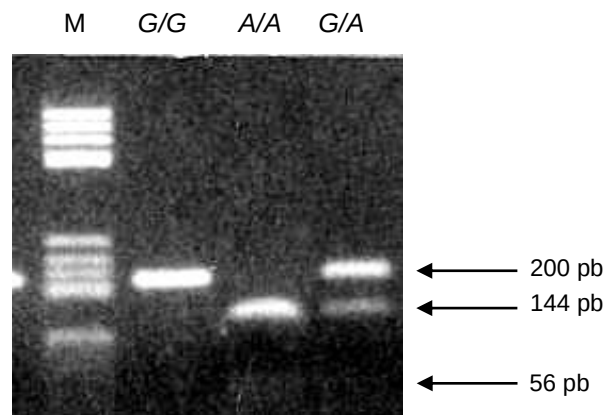


Figura III.7. Gel de electroforesis mostrando el patrón de bandas obtenidas tras el análisis por RFLP (análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) mediante la enzima de restricción Hpa II del producto de amplificado de 200 pb, para la identificación de la mutación *D105G* de la región CUB1 del gen *MAASP2*. M: marcador de peso molecular. La fotografía corresponde a un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

CONFIRMACIÓN DEL GENOTIPAJE POR SECUENCIACIÓN

Se confirmó la correcta determinación de los individuos homocigotos mutados mediante secuenciación directa en un secuenciador automático (ABI Prism 310, Applied Biosystems) en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín”. La secuencia de los oligonucleótidos empleados fue la siguiente: 5'-GCGAGTACGACTTCGTCAAGG-3' y 5'-CTCGGCTGCATAGAAGGCCTC-3' (Stengaard-Pedersen K *et al*, 2003).

3. CUANTIFICACIÓN DE MBL EN SUERO

3.1 OBTENCIÓN DEL SUERO

Para la cuantificación de los niveles séricos de MBL se extrajeron entre 3 y 7 ml de sangre venosa total en tubos *Vacutainer* con gel para separación de suero. Estas muestras se sometieron a centrifugación a 1.700 *xg* durante 7 minutos. El suero así obtenido se repartió en varias alícuotas que fueron congeladas a -40°C hasta su utilización.

3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MBL EN SUERO

La cuantificación de MBL en suero se realizó por ELISA, mediante el sistema “MBL oligomer ELISA kit” (Antibodyshop, Gentofte, Dinamarca).

FUNDAMENTO DEL SISTEMA “MBL OLIGOMER ELISA KIT”

Este sistema es un ELISA que se realiza en pocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal contra el dominio de unión a carbohidrato de la MBL. La MBL unida se detecta con el mismo anticuerpo, en esta ocasión marcado con biotina, se revela con HRP (horseradish peroxidase) marcada con estreptavidina e incubación con un sustrato (una sustancia cromogénica) que genera color azul. La intensidad del color (densidad óptica) se mide en un lector de placas de ELISA a 450 nm, siendo el valor de cada pocillo proporcional a la concentración de MBL oligomérica de cada muestra. Los resultados de los calibradores incluidos en la placa se emplean para construir una curva de la cual se extrapola la concentración

de MBL de las muestras. Estudios cromatográficos han mostrado que el anticuerpo monoclonal usado es específico para oligómeros de MBL cuando se emplea como anticuerpo tanto de captura como de detección.

PROCEDIMIENTO DEL MBL OLIGOMER ELISA KIT

1. Se incuban 100 μ l de muestra de suero diluida 1:100 (5 μ l en 495 μ l) en diluyente que lleva 1% de suero adulto bovino (para reducir posibles interferencias de anticuerpos reaccionando con inmunoglobulinas), así como 100 μ l de los calibradores de 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 y 40 ng/ml, en los pocillos de la placa por duplicado durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

2. Se lavan 3 veces los pocillos con solución de lavado. Se añaden a cada pocillo 100 μ l de anticuerpo biotinilado y se incuba 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

3. Se lavan 3 veces los pocillos con solución de lavado. Se añaden a cada pocillo 100 μ l de solución de conjugado (HRP conjugada con estreptavidina) y se incuba 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

4. Se lavan 3 veces los pocillos con solución de lavado. Se añaden 100 μ l de solución sustrato (solución de tetrametilbencidina, TMB) y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

5. Se para la reacción anterior mediante la adición de 100 μ l de solución de parada.

6. Se cuantifica la intensidad de color mediante su lectura a 450 nm, con una longitud de onda de referencia de 650 nm, en un lector de microplacas de ELISA.

7. Para el cálculo de la concentración de MBL se construye una curva con los valores de los calibradores y se extrapola el valor de cada muestra de suero diluido, el cual debe ser multiplicado por el factor de dilución, para obtener así la concentración en ng/ml de cada muestra original.

4. CUANTIFICACIÓN DE LA MASP-2 EN SUERO

4.1 OBTENCIÓN DEL SUERO

El suero empleado es una alícuota distinta del mismo suero utilizado para la cuantificación sérica de MBL (ver 3.1.).

4.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MASP-2 EN SUERO

La cuantificación de MASP-2 en suero se realizó por ELISA, mediante el sistema “ELISA kit for human MASP-2” (Hycult biotechnology, Uden, Holanda).

FUNDAMENTO DEL SISTEMA “*ELISA KIT FOR HUMAN MASP-2*”

Este sistema es un ELISA que se realiza en pocillos recubiertos con anticuerpos que reconocen MASP-2 humana. La MASP-2 unida se detecta con un anticuerpo secundario biotinilado, el cual se revela con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa e incubación con el sustrato TMB. El color se desarrolla proporcionalmente a la cantidad de MASP-2 presente en la muestra. La reacción enzimática se detiene mediante la adición de ácido cítrico, y la intensidad del color (densidad óptica) se mide en un lector de placas de ELISA a 450 nm. Los resultados de los estándares incluidos en la placa se emplean para construir una curva de la cual se extrapola la concentración de MASP-2 de las muestras.

PROCEDIMIENTO DEL “*ELISA KIT FOR HUMAN MASP-2*”

1. Se incuban 100 µl de muestra de suero diluida 4 veces en tampón de unión, así como 100 µl de los 8 tubos de dilución seriada del estándar (según protocolo del kit), en los pocillos de la placa por duplicado durante 1 hora a temperatura ambiente.

2. Se lavan 4 veces los pocillos con solución de lavado. Se añaden a cada pocillo 100 µl de anticuerpo secundario biotinilado y se incuba 1 hora a temperatura ambiente.

3. Se lavan 4 veces los pocillos con solución de lavado. Se añaden a cada pocillo 100 µl de solución de conjugado (estreptavidina-peroxidasa) y se incuba 1 hora a temperatura ambiente.

4. Se lavan 4 veces los pocillos con solución de lavado. Se añaden 100 μ l de solución sustrato (TMB) y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

5. Se para la reacción anterior mediante la adición de 100 μ l de solución de parada.

6. Se cuantifica la intensidad de color mediante su lectura a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA.

7. Para el cálculo de la concentración de MASP-2 se construye una curva con los valores de los calibradores y se extrapola el valor de cada muestra de suero diluido, el cual debe ser multiplicado por el factor de dilución, para obtener así la concentración en ng/ml de cada muestra original.

5. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA VÍA DE LAS LECTINAS DEPENDIENTE DE MBL

5.1. OBTENCIÓN DEL SUERO

Para la cuantificación de la actividad de la vía MBL dependiente del sistema del complemento se emplearon muestras de suero obtenidas según el mismo procedimiento que para la determinación de la concentración de MBL en suero (ver apartado 3.1.)

5.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA VÍA DE LAS LECTINAS DEPENDIENTE DE MBL

La cuantificación de la actividad de la VL dependiente de MBL se realizó por ELISA, mediante el sistema “Wieslab Complement System MBL pathway” (Wieslab, Lund, Suecia).

FUNDAMENTO DEL SISTEMA “WIESLAB COMPLEMENT SYSTEM MBL PATHWAY”

Este sistema combina principios del ensayo hemolítico para activación de complemento con el uso de anticuerpos marcados específicos para neoantígeno producido como resultado de la activación del complemento. La cantidad de

neoantígeno generada es proporcional a la actividad funcional de las vías de complemento. Los pocillos están recubiertos con activadores específicos de la vía MBL. Los sueros son diluidos en un diluyente que asegura la activación única y específica de la vía MBL. Los pocillos son posteriormente lavados y se detecta C5b-9 con un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina específico para el neoantígeno expresado durante la formación del complejo de ataque a membrana. Tras un posterior lavado, se detectan los anticuerpos específicos mediante incubación con una solución sustrato para la fosfatasa alcalina. La cantidad de activación de complemento correlaciona con la intensidad de color, que es medida como absorbancia (densidad óptica).

Debe tenerse en cuenta que el déficit de otros componentes de complemento, como MASP-2, C2, C4, C3 o C5-9, también produciría una disminución de la actividad de la vía MBL.

PROCEDIMIENTO DEL “WIESLAB COMPLEMENT SYSTEM MBL PATHWAY”

1. Se incuban 100 µl de muestra de suero diluida 1/101 (5 µl + 500 µl de diluyente), así como 100 µl de diluyente (como blanco), de control positivo (CP) y de control negativo (CN), en los pocillos de la placa por duplicado durante 1 hora a temperatura ambiente.
2. Se lavan 3 veces los pocillos con solución de lavado. Se añaden a cada pocillo 100 µl de conjugado y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Se lavan 3 veces los pocillos con solución de lavado. Se añaden a cada pocillo 100 µl de solución de sustrato y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Se cuantifica la intensidad de color mediante su lectura de absorbancia a 405 nm, en un lector de microplacas.
5. Para el cálculo de la actividad de cada muestra se realizan los siguientes cálculos: se resta a cada resultado la absorbancia del blanco; se calcula la media de los duplicados de cada muestra, del CP y del CN, y se calcula el % de actividad de complemento según la siguiente fórmula: $(\text{muestra-CN}) / (\text{CP-CN}) \times 100$.

También pueden usarse los controles positivo (100%) y negativo (0%) como semicuantitativos, trazándose una recta y extrapolando los valores porcentuales de cada muestra.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables categóricas (cualitativas) se describieron mediante su distribución de frecuencias. Las variables continuas (cuantitativas) se describieron mediante medidas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica, error típico de la media).

Para testar la hipótesis nula para la distribución de las variables categóricas entre los pacientes y los controles, así como las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes a estudio para dos grupos, se empleó la prueba de Chi-cuadrado con corrección de Yates, o el test exacto de Fisher cuando fue necesario. El riesgo de enfermedad asociado con los genotipos de los genes *MBL2* y *MASP2* como factor genético y la fuerza de la asociación de los genotipos con la frecuencia de las características clínicas se estimó usando el cálculo de los *odds ratio* (OR) con un intervalo de confianza (IC) del 95%. El equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas se testó mediante el análisis de la Chi-cuadrado.

Se empleó el estadístico de Kolmogorov-Smirnov para analizar si las variables continuas seguían o no una distribución normal. La comparación de variables continuas que seguían una distribución normal se realizó mediante pruebas paramétricas: el test de la *t* de Student para dos muestras independientes, o el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) para la comparación de más de dos categorías. La comparación de variables continuas que no seguían una distribución normal se realizó mediante pruebas no paramétricas: el test de Mann-Whitney para dos muestras independientes, o el test de Kruskal-Wallis para más de dos categorías.

La correlación entre dos variables cuantitativas se estimó mediante el coeficiente de correlación de Pearson, para variables que seguían una distribución normal, o el coeficiente Rho de Spearman para variables que no seguían una distribución normal.

La estimación de la supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan-Meier, y su comparación en relación a los genotipos se realizó mediante el test de long-rank para análisis bivalente.

Para el análisis multivariante, en los casos en que la variable dependiente era cualitativa, con dos categorías, se realizó un análisis de regresión logístico binario. Cuando la variable dependiente fue la supervivencia (tiempo transcurrido hasta que se produce el evento muerte), se realizó un modelo de regresión de Cox, en el cual se testó que se cumpliera la hipótesis de riesgos proporcionales.

Todos los tests empleados fueron de dos colas. La significación estadística se tomó como un valor de p menor de 0,05.

El análisis estadístico se realizó empleando el paquete estadístico SPSS (versión 15.0 para Windows) y el programa EPI-INFO (versión 6), a partir de bases de datos en Microsoft Access.

CAPÍTULO IV

ESTUDIO DE LA MBL Y EL GEN *MBL2* EN POBLACIÓN SANA

ESTUDIO DE LA MBL Y EL GEN *MBL2* EN POBLACIÓN SANA

RESUMEN

Antecedentes. La MBL es una proteína sérica implicada en la activación del sistema del complemento. Sus niveles séricos, así como su capacidad para activar el complemento, varían en función de ciertas variantes polimórficas del gen *MBL2*. Por otra parte, la frecuencia de estos polimorfismos varía considerablemente entre las diversas poblaciones.

Objetivo. Establecer las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del gen *MBL2* en población española (incluida la canaria) y bereber, y comparar con las descritas en otras poblaciones. Determinar la relación de los polimorfismos del gen *MBL2* con la concentración sérica de la proteína y con la actividad sérica de la VL dependiente de MBL.

Materiales y métodos. Se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* en 1.554 individuos de población general española y 70 bereberes del Atlas (Marruecos). Se determinaron la concentración de MBL y la actividad dependiente de MBL en suero en individuos sanos.

Resultados. El análisis funcional de los niveles séricos de MBL y de la actividad de la VL dependiente de MBL confirmó una disminución significativa de ambos asociada a los alelos mutados (alelos *O*) y, en menor grado, al alelo de promotor *X*. La frecuencia de alelos de *MBL2* mutados, así como la de los genotipos portadores de mutación y de los insuficientemente productores, es similar en población española (incluida la canaria) a la de otras poblaciones europeas publicadas, si bien, en nuestra población, las frecuencias de alelos *O* (0,23 en población española total y 0,25 en canaria) y de individuos *O/O* (0,053 en española total y 0,066 en canaria) son algo mayores que en el resto de las poblaciones europeas y asiáticas estudiadas. La población bereber difirió de la española y la canaria principalmente en la ausencia de alelo mutado *D*.

Conclusiones. A pesar de los aparentes efectos perjudiciales que se han asociado a la deficiencia de la MBL, la elevada frecuencia de los alelos asociados a no producción de MBL en diversas poblaciones, sugiere que pudiera conferir alguna ventaja selectiva. El presente estudio establece las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* en población española y bereber, y muestra que éstas concuerdan con su origen étnico. El análisis funcional nos permite agrupar los múltiples genotipos de *MBL2* como *genotipos suficientes* (*A/A* + *YA/O*) y *genotipos insuficientes* (*XA/O* + *O/O*), facilitando la interpretación de posteriores estudios.

INTRODUCCIÓN

Los humanos muestran variaciones considerables en los niveles séricos de MBL, oscilando en un rango de entre 0 y 10.000 ng/ml. El defecto y los bajos niveles de MBL en suero se deben principalmente a la presencia de los alelos estructurales *B*, *C* y *D* (llamados alelos *O*, siendo *A* la denominación del alelo salvaje) (Madsen HO *et al*, 1995, 1998; Turner MW, 1998; Turner MW y Hamvas RM, 2000). Diversas publicaciones muestran que los individuos homocigotos *A/A* presentan niveles séricos de proteína elevados (> 1.000 ng/ml), mientras que los heterocigotos *A/O* presentan niveles más reducidos (300-1.000 ng/ml) y los homocigotos *O/O* niveles muy bajos o nulos (<100 ng/ml) (Madsen HO *et al*, 1995; Steffensen R *et al*, 2000; Minchinton RM *et al*, 2002). Además, existen tres sitios polimórficos (*H/L*, *X/Y* y *P/Q*, en las posiciones -550, -221 y +4 respectivamente), los cuales tienen un efecto importante sobre los niveles séricos de MBL (Madsen HO *et al*, 1995, 1998; Turner MW, 1998; Turner MW y Hamvas RM, 2000). Como sucede con las variantes estructurales, se ha observado que la presencia del alelo *X*, en lugar del *Y*, tiene un efecto considerable de disminución de la producción de MBL. Un efecto similar se ha observado con respecto a la presencia del alelo *L* en lugar del alelo *H*, e incluso del alelo *P* en lugar del *Q*, si bien en estos casos el efecto es mucho menos marcado. Como consecuencia del fuerte desequilibrio de ligamiento existente entre las variantes alélicas de los distintos sitios polimórficos, sólo se observan siete haplotipos: *HYPA*, *LYQA*, *LYPA*, *LXPA*, *LYPB*, *LYQC* y *HYPD*, cuya combinación da lugar a 28 posibles genotipos. Los resultados previos que asocian los genotipos con determinados niveles de proteína varían entre las poblaciones estudiadas, de manera que no hay un consenso definitivo sobre el rango de concentración de MBL que constituye un valor sérico normal.

Respecto a la distribución poblacional de las variantes, está ampliamente descrito que el alelo *B* es común en poblaciones europeas y asiáticas, mientras que el alelo *C* es frecuente en la mayoría de las poblaciones africanas sub-saharianas. Por su parte, el alelo *D* se encuentra presente en europeos, y está ausente en asiáticos y en la mayoría de las poblaciones africanas (Garred P *et al*, 2006). Las frecuencias de los 7 haplotipos de *MBL2* varían de manera considerable entre las poblaciones, reflejando así las edades de las mutaciones “fundadoras”, la historia de las migraciones humanas y las presiones selectivas ambientales que han

actuado sobre el genoma humano (Casanova JL y Abel L, 2004). En este sentido, el haplotipo original del gen *MBL2* parece haber sido un haplotipo de alta producción, posiblemente perdido actualmente, localizado en el árbol evolutivo entre los haplotipos *LYQA* y *LYPA* (Madsen HO *et al*, 1998; Seyfarth J *et al*, 2005; Garred P *et al*, 2006). Las evidencias apuntan a que las variantes alélicas *B* y *C* surgieron de manera independiente en distintas poblaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Individuos analizados.

Se realizó la determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del gen *MBL2* en población española (N = 1.554) (procedente de los cuatro grupos españoles descritos en el apartado 1.1 del capítulo III). Se determinaron también dichas frecuencias en población bereber de la región del Atlas (Marruecos) (N = 70), también descrita en el apartado 1.1 del capítulo III.

Niveles séricos de MBL.

Los niveles séricos de la MBL se analizaron en 150 individuos sanos mediante el sistema “MBL oligomer ELISA kit” (Antibodyshop, Gentofte, Dinamarca), tal como se describe en el apartado 3 del capítulo III.

Actividad de la vía de las lectinas dependiente de MBL.

La actividad de la vía MBL-dependiente se analizó en suero a 164 individuos sanos mediante el sistema “Wieslab Complement System MBL pathway” (Wieslab, Lund, Suecia), del modo en que se describe en el apartado 5 del capítulo III.

Análisis genético.

La extracción del ADN así como el genotipaje se realizaron como se describe en el apartado 2 del capítulo III.

Análisis estadístico.

Para comparar la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* para dos grupos, se empleó la prueba de Chi-cuadrado, o el test exacto de Fisher cuando fue necesario.

Las diferencias en los niveles séricos de MBL y en la actividad de complemento respecto a los genotipos se compararon mediante el test de Mann-Whitney para dos muestras independientes, o el test de Kruskal-Wallis para más de dos categorías.

La correlación entre los niveles séricos y la actividad de complemento se estimó mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

(Para una descripción más detallada del análisis estadístico ver el apartado 6 del capítulo III).

RESULTADOS

Caracterización de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* en población canaria.-

Realizamos el genotipaje completo del gen *MBL2* en un grupo de 730 individuos de población canaria. Las frecuencias alélicas observadas se muestran en la tabla IV.1. No se observaron desviaciones de lo esperado bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,384$).

Tabla IV.1. Frecuencia de los haplotipos *MBL2* en 730 individuos de población de Gran Canaria.

Alelos	N	%
<i>HYP A</i>	387	26,51
<i>LYQ A</i>	319	21,85
<i>LYP A</i>	109	7,46
<i>LXP A</i>	274	18,77
Total A	1.089	74,59
<i>HYP D</i>	93	6,37
<i>LYP B</i>	233	15,96
<i>LYQ C</i>	45	3,08
Total O	371	25,41
H_e	0,811	

N designa el número de cromosomas.

O designa el total de los alelos mutados B, C y D.

H_e : heterocigosidad media esperada.

La tabla IV.2 muestra las frecuencias observadas de los genotipos estructurales del gen *MBL2*.

Tabla IV.2. Frecuencias de los genotipos estructurales del gen *MBL2* en 730 individuos de población de Gran Canaria.

Genotipos	N	%
A/A	407	55,75
A/O	275	37,67
A/B	172	23,56
A/C	34	4,66
A/D	69	9,45
O/O	48	6,58
B/B	20	2,74
B/C	5	0,68
B/D	16	2,19
C/C	3	0,41
D/D	4	0,55
C/D	0	0

N designa el número de individuos.

O designa el total de los alelos mutados B, C y D.

Al tener en cuenta las variantes de promotor y de la región 5'UT del gen, se observaron 27 de los 28 posibles genotipos (no se observó el genotipo *LYQC/HYPD*). La tabla IV.3 muestra las frecuencias genotípicas observadas al agrupar los 27 genotipos en función de las variantes X/Y de promotor y de la presencia o no de mutación estructural (A/O).

Tabla IV.3. Frecuencias genotípicas del gen *MBL2* en 730 individuos de población de Gran Canaria.

Genotipos	N	%
YA/YA	232	31,78
YA/XA	153	20,96
XA/XA	22	3,01
YA/YO	198	27,12
XA/YO	77	10,55
O/O	48	6,58
Total A/A + YA/O	605	82,88
Total XA/O + O/O	125	17,12

N designa el número de individuos.

O designa el total de los alelos mutados B, C y D.

Caracterización de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* en población española.

Realizamos el genotipaje del gen *MBL2* en 1.554 individuos de población española (incluyendo la población canaria).

La tabla IV.4 muestra las frecuencias observadas de los alelos estructurales del gen *MBL2*. No se observaron desviaciones de lo esperado bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,11$).

Tabla IV.4 Frecuencia de los alelos estructurales *MBL2* en 1554 individuos de población española.

Alelos	N	%
A	2.397	77,12
O	711	22,88
B	442	14,22
C	86	2,77
D	183	5,89

N designa el número de cromosomas.

O designa el total de los alelos mutados B, C y D.

La tabla IV.5 muestra las frecuencias observadas de los genotipos estructurales del gen *MBL2*.

Tabla IV.5. Frecuencias de los genotipos estructurales del gen *MBL2* en 1.554 individuos de población española.

Genotipos	N	%
A/A	925	59,52
A/O	547	35,20
A/B	346	22,27
A/C	60	3,86
A/D	141	9,07
O/O	82	5,28
B/B	26	1,67
B/C	16	1,03
B/D	28	1,80
C/C	4	0,26
D/D	6	0,39
C/D	2	0,13

N designa el número de individuos.

O designa el total de los alelos mutados B, C y D.

La tabla IV.6 muestra las frecuencias genotípicas observadas al tener en cuenta tanto las variantes *X/Y* de promotor como la presencia o no de mutación estructural (*A/O*).

Tabla IV.6 Frecuencias genotípicas del gen *MBL2* en 1.554 individuos de población española.

Genotipos	N	%
YA/YA	508	32,69
YA/XA	350	22,52
XA/XA	67	4,31
YA/YO	396	25,48
XA/YO	151	9,72
O/O	82	5,28
Total A/A + YA/O	1.321	85,01
Total XA/O + O/O	233	14,99

N designa el número de individuos.

O designa el total de los alelos mutados B, C y D.

Caracterización de las frecuencias alélicas y genotípicas en población bereber del Atlas (Marruecos).

Realizamos el genotipaje completo del gen *MBL2* en un grupo de población bereber. Las frecuencias alélicas observadas se muestran en la tabla IV.7. No se observaron desviaciones de lo esperado bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,539$).

La tabla IV.8 muestra las frecuencias observadas de los genotipos estructurales del gen *MBL2* en población bereber.

La tabla IV.9 muestra las frecuencias genotípicas observadas al agrupar los genotipos en función de las variantes *X/Y* de promotor y de la presencia o no de mutación estructural (*A/O*).

Tabla IV.7. Frecuencia de los haplotipos *MBL2* en 70 individuos de población bereber.

Alelos	N	%
<i>HYP A</i>	34	24,28
<i>LYQ A</i>	41	29,29
<i>LYP A</i>	21	15,00
<i>LXP A</i>	13	9,29
Total A	109	77,86
<i>HYP D</i>	1	0,71
<i>LYP B</i>	23	16,43
<i>LYQ C</i>	7	5,00
Total O	31	22,14
H_e	0,800	

N designa el número de cromosomas.

O designa el total de los alelos mutados *B*, *C* y *D*.

H_e : heterocigosidad media esperada.

Tabla IV.8. Frecuencias de los genotipos estructurales del gen *MBL2* en 70 individuos de población bereber.

Genotipos	N	%
<i>A/A</i>	44	62,86
<i>A/O</i>	21	30,00
<i>A/B</i>	15	21,43
<i>A/C</i>	6	8,57
<i>A/D</i>	0	0
<i>O/O</i>	5	7,14
<i>B/B</i>	4	5,71
<i>B/C</i>	0	0
<i>B/D</i>	0	0
<i>C/C</i>	0	0
<i>D/D</i>	0	0
<i>C/D</i>	1	1,43

N designa el número de individuos.

O designa el total de los alelos mutados *B*, *C* y *D*.

Tabla IV.9. Frecuencias genotípicas del gen *MBL2* en 70 individuos de población bereber.

Genotipos	N	%
YA/YA	34	48,57
YA/XA	10	14,29
XA/XA	0	0
YA/YO	18	25,71
XA/YO	3	4,29
O/O	5	7,14
<i>Total A/A + YA/O</i>	62	88,57
<i>Total XA/O + O/O</i>	8	11,73

N designa el número de individuos.

O designa el total de los alelos mutados B, C y D.

Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* entre población canaria y española, y otras poblaciones.

En concordancia con el componente caucásico encontrado en las Islas Canarias (Pinto F *et al*, 1994), la distribución de los alelos estructurales del gen *MBL2* en nuestra población fue similar a la de otras poblaciones europeas publicadas (tabla IV.10), si bien, en nuestra población, la frecuencia del alelo O (0,25), de individuos O/O (0,066) y la heterocigosidad media (0,81), son algo mayores que en el resto de las poblaciones europeas y asiáticas estudiadas.

La distribución de los haplotipos de *MBL2* en la población canaria difirió significativamente de la de población bereber, esquimal, japonesa, africana subsahariana y sudamericana ($p < 0,001$ para todas). Respecto a otras poblaciones europeas, la distribución haplotípica difirió significativamente de la población checa y danesa ($p < 0,001$ para ambas), si bien no fue significativamente distinta de la de población alemana, noruega, ni del Reino Unido. De igual modo, al analizar el total de la población española, su distribución haplotípica difirió significativamente de la de población bereber, esquimal, japonesa, africana subsahariana y sudamericana ($p < 0,001$ para todas), de población checa ($p = 0,0015$) y danesa ($p = 0,036$), pero no de las poblaciones alemana, noruega, ni del Reino Unido.

La población bereber difirió significativamente de la canaria en la frecuencia del alelo estructural *D* ($p = 0,011$), así como en la de los alelos *LYPA* ($p = 0,0031$) y *LXPA* ($p = 0,0074$). Sin embargo, la única frecuencia genotípica significativamente diferente entre ambas poblaciones fue la del genotipo *A/D* ($p = 0,014$). De manera similar, al comparar con el total de población española, la población bereber mostró menor frecuencia del alelo *D* ($p = 0,016$), del haplotipo *LXPA* ($p = 0,0019$) y del genotipo *A/D* ($p = 0,0004$).

Tabla IV.10. Frecuencia de los haplotipos *MBL2* en diversas poblaciones.

Población	<i>HYP A</i>	<i>LYQA</i>	<i>LYPA</i>	<i>LXPA</i>	<i>HYP D</i>	<i>LYP B</i>	<i>LYQC</i>	<i>O</i>	<i>O/O</i>	<i>H_e</i>
Gran Canaria (730)	0,265	0,219	0,075	0,188	0,064	0,160	0,031	0,254	0,066	0,81
España (1.554)		0,567 ^a		0,204	0,059	0,142	0,028	0,229	0,053	n.m.
Bereber (70)	0,24	0,29	0,15	0,09	0,007	0,16	0,05	0,22	0,07	0,80
Chequia ^b (359)	0,325	0,270 ^b		0,228	0,042	0,116	0,008	0,177	0,03	n.m.
Alemania ^c (212)	0,27	0,22	0,05	0,21	0,05	0,15	0,04	0,24	0,06	0,80
R.U. ^d (302)		0,775 ^d			0,066	0,144	0,015	0,225	0,046	n.m.
Dinamarca ^e (250)	0,31	0,19	0,04	0,26	0,06	0,11	0,03	0,20	0,03	0,79
Noruega ^f (100)		0,80 ^f			0,035	0,140	0,025	0,20	0,03	n.m.
Esquimales ^g (72)	0,81	0	0,04	0,03	0	0,12	0	0,12	0,03	0,33
Japón ^g (325)	0,44	0,16	0,06	0,12	0	0,22	0	0,22	0,03	0,72
Kenia ^e (61)	0,08	0,25	0,13	0,24	0,04	0,02	0,24	0,30	0,13	0,81
Mozambique ^e (154)	0,06	0,27	0,30	0,13	0	0	0,24	0,24	0,06	0,76
Chiriguano ^e (43)	0,54	0,01	0,02	0,01	0	0,42	0	0,42	0,14	0,54
Mapuches ^e (25)	0,38	0	0,08	0,04	0	0,46	0,04	0,50	0,16	0,66

O designa el total de los alelos mutados *B*, *C* y *D*.

H_e: heterocigosidad media esperada.

R.U.: Reino Unido.

n.m.: no medible, debido a no disponer de las frecuencias de todos los haplotipos.

^aEn población total española no se dispone de las frecuencias de los haplotipos *HYP A*, *LYQA* y *LYPA*, por lo que se da la frecuencia conjunta de los haplotipos *YA*.

^bSkalnikova H *et al*, 2004. En este estudio no se determinó el polimorfismo *P/Q*, por lo que no se pueden diferenciar los haplotipos *LYQA* y *LYPA*, y se da su frecuencia conjunta. En esta población se observaron además 8 individuos *LYD*, no mostrados en la tabla, pero sí contabilizados en el número de individuos total y para el cálculo de las frecuencias de los demás haplotipos, e incluidos en el total de alelos *O*.

^cBernig T *et al*, 2005.

^dMead R *et al*, 1997. En este estudio no se determinaron los polimorfismos de promotor, de manera que se da conjuntamente la frecuencia de los haplotipos *HYP A*, *LYQA*, *LYPA* y *LXPA* (alelos *A*).

^eMadsen HO *et al*, 1998.

^fMadsen HO *et al*, 1998b. En este estudio no se determinaron los polimorfismos de promotor, de manera que se da conjuntamente la frecuencia de los haplotipos *HYP A*, *LYQA*, *LYPA* y *LXPA* (alelos *A*).

^gMatsushita M *et al*, 1998.

Estudio de los niveles séricos de MBL en población canaria sana. Correlación entre el genotipo *MBL2* y la concentración sérica de MBL.

Los valores obtenidos al medir los niveles séricos de MBL oscilaron entre 27 y 5.370 ng/ml, siendo la media 960,19 ng/ml, la mediana 496,00 ng/ml y la desviación estándar 1110,68 ng/ml.

En la figura IV.1 se representa gráficamente la concentración sérica de MBL en función de los genotipos estructurales del gen *MBL2*, agrupados en base a la presencia de mutación (alelo *O*). La tabla muestra los valores de la media y el error típico de la media (ETM) para cada uno de los grupos genotípicos.

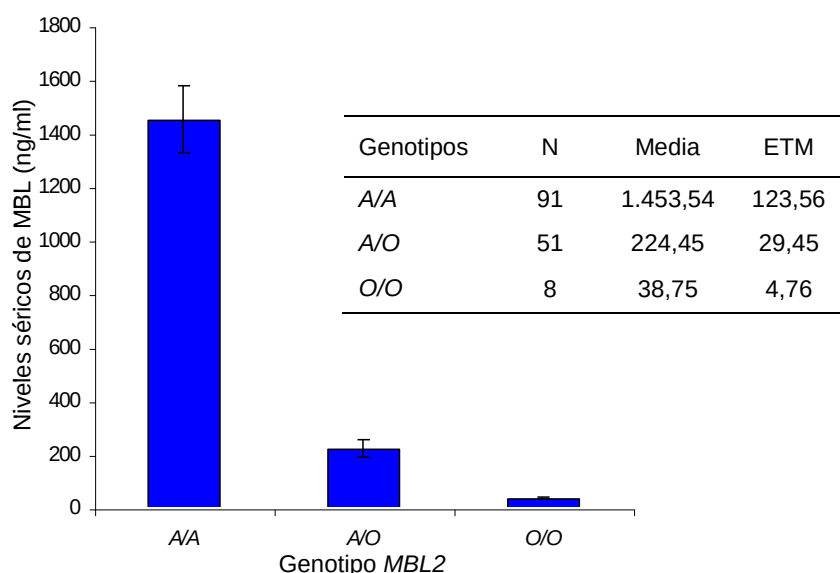


Figura IV.1. Niveles séricos de MBL (ng/ml) en relación a su genotipo estructural *MBL2* (A/A vs. A/O vs. O/O). La comparación de los tres grupos mostró diferencias significativas ($p < 0,001$ para todas las comparaciones).

Se realizó el análisis teniendo también en cuenta las variantes de promotor *X/Y*, tal como se muestra en la figura IV.2.

Como resultado de la distribución observada, que confirma una menor producción de proteína asociada a los alelos *X* y *O*, agrupamos los genotipos como A/A + YA/O y XA/O + O/O, tal y como se muestra en la figura IV.3.

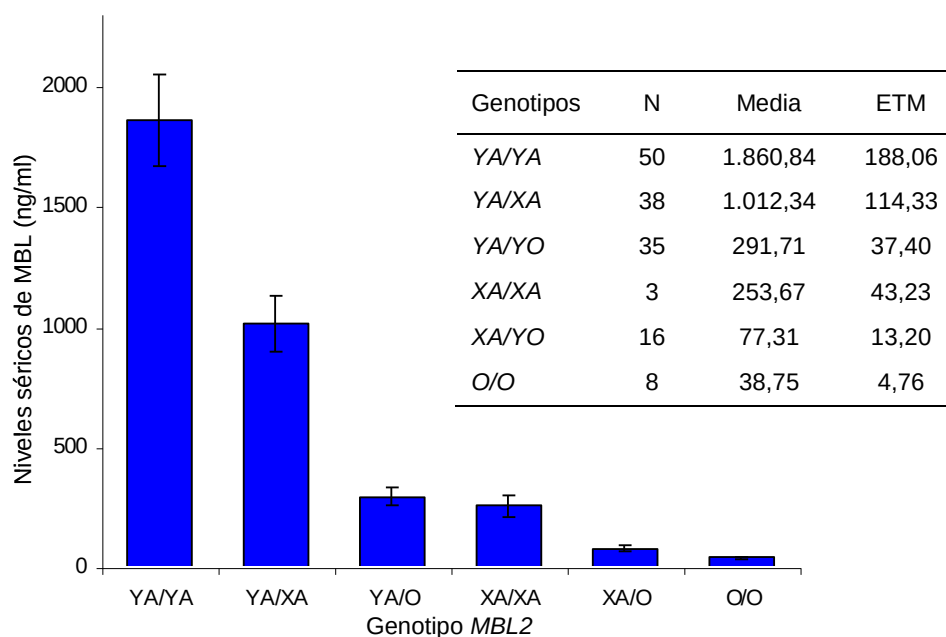


Figura IV.2. Niveles séricos de MBL (ng/ml) en relación a su genotipo *MBL2*

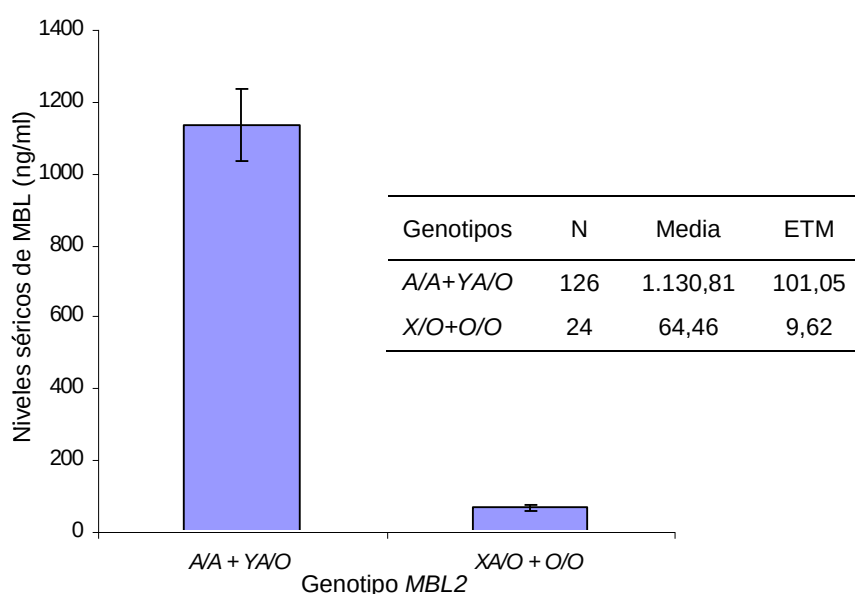


Figura IV.3. Niveles séricos de MBL (ng/ml) en relación a su genotipo *MBL2* (A/A + YA/O vs. XA/O + O/O). La comparación de ambos grupos mostró diferencias significativas ($p < 0,001$).

Se observa un marcado descenso en los niveles séricos de MBL en lo que denominaremos individuos con *genotipos insuficientes* (XA/O + O/O), al comparar con aquellos con *genotipos suficientes* (A/A + YA/O) ($64,46 \pm 9,62$

ng/ml y $1.130,81 \pm 101,05$ ng/ml respectivamente; $p < 0,001$). Estos resultados están de acuerdo con las observaciones de otros estudios (Madsen HO *et al*, 1995; Steffensen R *et al*, 2000; Minchinton RM *et al*, 2002).

Actividad en suero del sistema del complemento dependiente de MBL. Correlación entre el genotipo de la MBL y la actividad de la vía de las lectinas dependiente de MBL.

Los valores obtenidos al medir la actividad de la VL dependiente de MBL oscilaron entre 0 y 788%, siendo la media 27,80%, la mediana 4,0% y la desviación estándar 72,50%.

En la figura IV.4 se representa gráficamente la actividad en suero de la vía dependiente de MBL en función de los genotipos estructurales del gen, agrupados en base a la presencia de mutación (alelo O). La tabla muestra los valores de la media y el error estándar de la media (ETM) para cada uno de los grupos genotípicos.

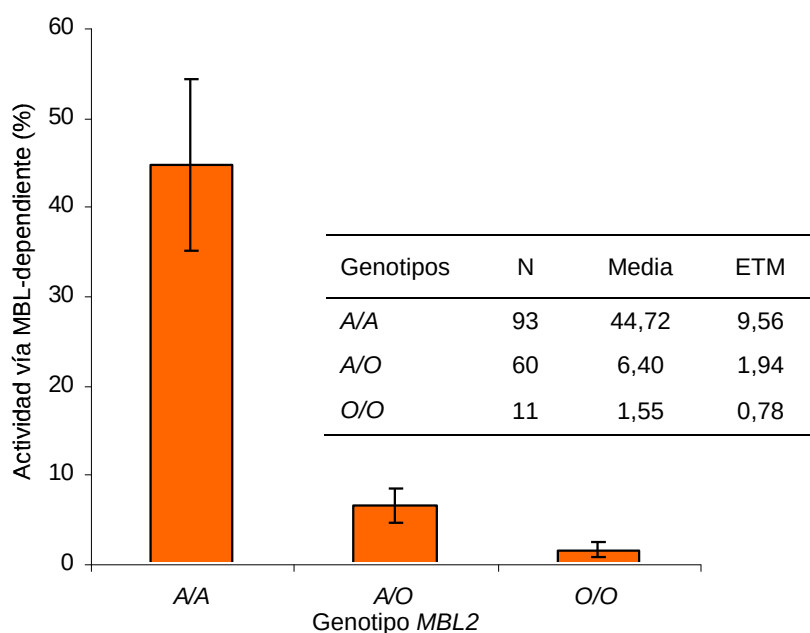


Figura IV.4. Actividad de la vía de las lectinas dependiente de MBL (%) en relación a su genotipo estructural *MBL2* (A/A vs. A/O vs. O/O). La comparación de los tres grupos mostró diferencias significativas ($p < 0,001$ para todas las comparaciones, salvo A/O vs. O/O, que no fue significativa).

Se realizó el análisis teniendo también en cuenta las variantes de promotor X/Y, tal como se muestra en la figura IV.5.

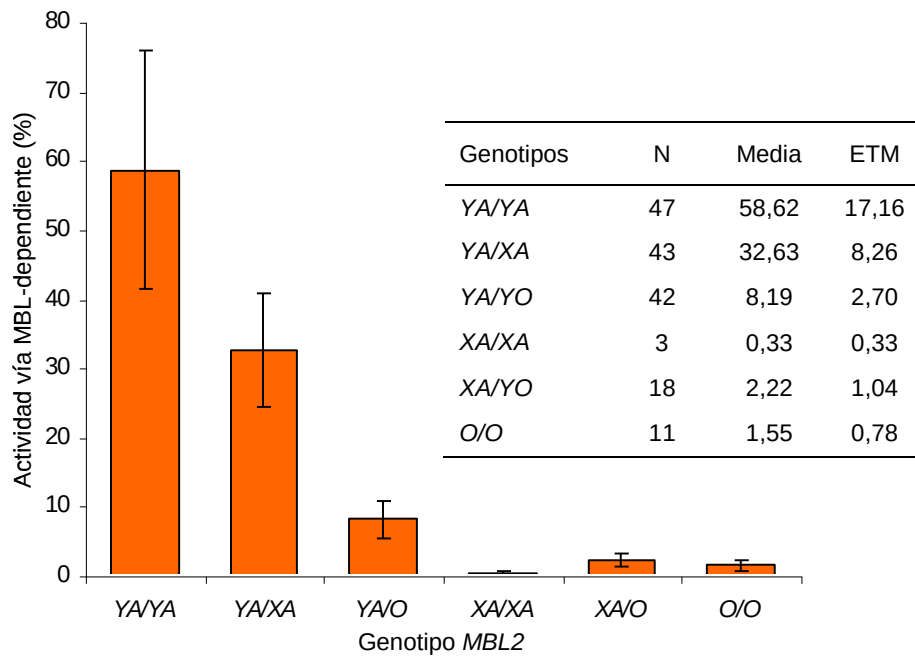


Figura IV.5. Actividad de la vía de las lectinas dependiente de MBL (%) en relación al genotipo *MBL2*.

Los resultados observados confirman una menor producción de proteína asociada a los alelos *X* y *O*. En esta ocasión se observa, al contrario de lo que sucedía con los niveles séricos de proteína, una actividad media menor en los genotipos *XA/XA* que en los *XA/YO* y *O/O*. Sin embargo, cabe destacar que sólo se dispone del dato en tres individuos *XA/XA*.

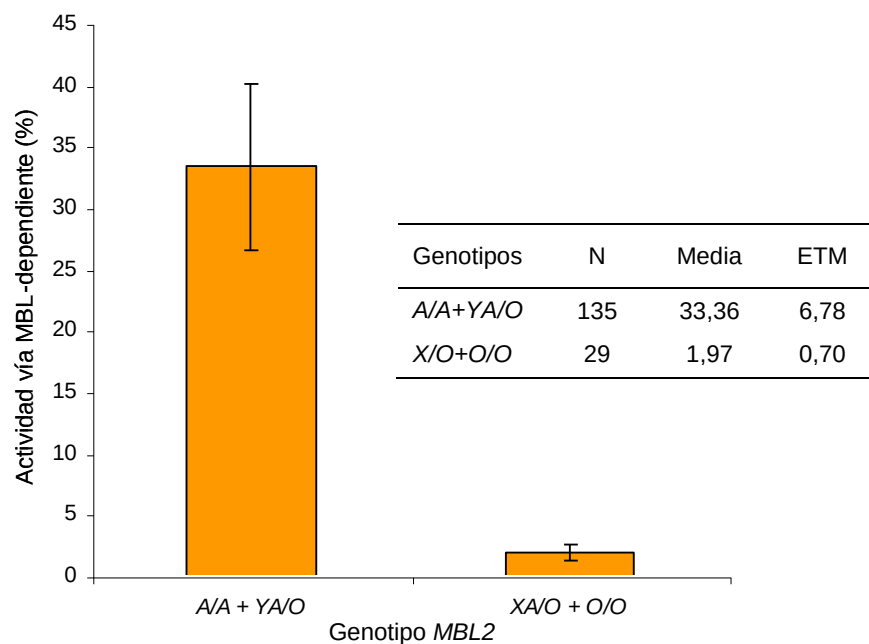


Figura IV.6. Actividad de la vía de las lectinas dependiente de MBL (%) en relación a su genotipo *MBL2* (*A/A + YA/O* vs. *XA/O + O/O*). La comparación de ambos grupos mostró diferencias significativas ($p < 0,001$).

La figura IV.6 muestra los resultados observados al agrupar los genotipos como $A/A + YA/O$ y $XA/O + O/O$.

Correlación entre los niveles séricos de MBL y la actividad de la vía de las lectinas dependiente de MBL en población canaria sana.

Al analizar la distribución de los niveles séricos de MBL (ng/ml) en relación a la actividad dependiente de MBL de la VL (%) en suero, encontramos una correlación positiva significativa ($\rho = 0,776$; $p < 0,001$) (figura IV.7).

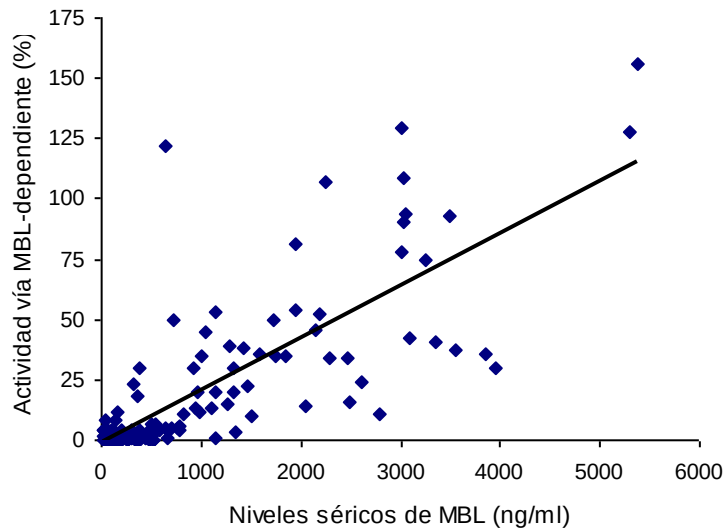


Figura IV.7. Correlación entre los niveles séricos de MBL (ng/ml) y la actividad de la vía de las lectinas dependiente de MBL en población sana canaria (%) ($\rho = 0,776$; $p < 0,001$).

DISCUSIÓN

A pesar del riesgo incrementado de infección asociado al defecto de la MBL, los alelos defectivos de MBL se han encontrado en elevada frecuencia en muchas poblaciones. Esto ha llevado a sugerir la existencia de alguna ventaja selectiva que favorezca los niveles bajo-medios de esta proteína (Garred P *et al*, 1994; Madsen HO *et al*, 1998), lo que justificaría la preservación de estos alelos, e implicaría que puede tratarse de un sistema genético equilibrado (Garred P *et al*, 1994), en analogía al caso del alelo Hbs (alelo responsable de la anemia falciforme) y la malaria (Haldane JBS, 1949). Sobre cuáles pudieran ser las ventajas selectivas, hay dos teorías, no mutuamente excluyentes. Una teoría

sugiere que la heterocigosidad para los alelos variantes puede conferir protección frente a parásitos intracelulares, los cuales usan la opsonización mediada por complemento como ruta de entrada a la célula. Otra teoría sugiere que la ruta de activación del complemento mediada por la MBL puede, en algunas circunstancias, ser perjudicial para el hospedador, o lo que es lo mismo, que bajos niveles de MBL funcional podrían reducir posibles consecuencias deletéreas por activación del complemento y la subsecuente liberación de mediadores inflamatorios que pueden acarrear daño tisular.

Las frecuencias alélicas del gen *MBL2* observadas en nuestro estudio podrían ser el resultado del sistema genético equilibrado propuesto (Garred HO *et al*, 1994; Madsen HO *et al*, 1998). Por otra parte, análisis previos en población de las islas Canarias, realizado en individuos con ascendencia canaria de al menos dos generaciones, coinciden en una proporción de mezcla de 60-75% europea, 20-30% norteafricana y 5-10% subsahariana (Pinto F *et al*, 1994). De este modo, nuestros datos pueden también estar reflejando la mezcla de genes europeos y africanos observados en población canaria, si bien cabe reseñar que, nuestro grupo de población de Gran Canaria, no está restringido a individuos con un origen canario de varias generaciones, sino a individuos españoles residentes en Canarias. Por su parte, los resultados observados en bereberes, muestran una frecuencia del alelo C (alelo característico negroide) mucho más parecida a la encontrada en Europa (1-4%) (Mead R *et al*, 1997; Madsen HO *et al*, 1998; Madsen HO *et al*, 1998b; Skalnikova H *et al*, 2004; Bernig T *et al*, 2005) que en el África subsahariana (alrededor de un 24%) (Madsen HO *et al*, 1998), lo cual está de acuerdo con su etnicidad.

La diseminación de los alelos deletéreos del gen *MBL2* por el mundo podría también sugerir que la MBL es meramente redundante y un vestigio residual de la vía de activación del complemento más antigua. Si la MBL fuera neutral o levemente beneficiosa para la protección del hospedador, no justificaría la elevada frecuencia de deficiencia de MBL. Verdu *et al* (2006) proponen, como alternativa a la ventaja selectiva para explicar las elevadas frecuencias de haplotipos deficientes de MBL, que éstas sean fruto de una evolución neutral. Según ésta, los alelos deficientes de MBL no tienen un efecto en la salud de la población y pueden así aumentar su frecuencia. En base a sus resultados, la MBL

jugaría un papel redundante en el sistema inmunológico humano, y la dispersión mundial de los alelos variantes sólo habría sido el resultado de las migraciones humanas y de la deriva genética. En este mismo sentido, Boldt *et al* (2006) realizaron un estudio del que concluyen que, al menos en población amerindia, factores evolutivos estocásticos parecen haber tenido un papel predominante en dirigir los polimorfismos del gen *MBL2*. Todo esto no querría decir inexorablemente que la MBL fuera funcionalmente irrelevante, sino que no ha jugado un papel principal a nivel poblacional; pero no excluiría que pudiese tener un papel en presencia de otras morbilidades y que, de hecho, pueda jugar un papel modulador en individuos inmunocomprometidos. Por otra parte, Bernig *et al* (2004) realizaron un análisis de la secuencia de los haplotipos extendidos de *MBL2* en distintos grupos étnicos de EE.UU., cuyos resultados apoyan la noción de que existen fuerzas selectivas que están trabajando incluso actualmente, encontrando una elevada heterocigosidad con evidencias de selección. En este sentido, un estudio reciente en población africana (Dossou-Yovo OP *et al*, 2007) apoya la presencia de alguna ventaja selectiva: si bien sus resultados no muestran diferencias en las frecuencias alélicas ni genotípicas de las variantes de *MBL2* entre recién nacidos sanos y recién nacidos con anemia falciforme, sí se observa que los alelos asociados con deficiencia de MBL (en concreto los heterocigotos) son más frecuentes en adultos que en recién nacidos. De este modo, en vez de un efecto neutral, ciertos haplotipos de *MBL2* pueden haber ejercido un impacto beneficioso en la defensa del hospedador durante ciertas epidemias, habiendo sido beneficiosos a nivel poblacional, y pudiendo así haber actuado sobre este gen una selección equilibrada a través de su historia evolutiva. Esta teoría se vería apoyada por la aparición de los alelos defectuosos *B* y *C* en distintas poblaciones, causados por eventos moleculares independientes.

El estudio de los niveles séricos de MBL confirma, como ya se ha observado en otras poblaciones (Madsen HO *et al*, 1995; Steffensen R *et al*, 2000; Minchinton RM *et al*, 2002), una menor concentración de proteína asociada a los alelos *X* y *O*, y a los genotipos portadores de dichos alelos, siendo el efecto de la mutación (alelos *O*) aún más relevante que el del alelo *X*. Este estudio, realizado en individuos sanos sin ninguna sintomatología en el momento de la extracción de la muestra, minimiza la posible alteración de los resultados debida a la cualidad de proteína de fase aguda de la MBL. Si bien, como sucede en los demás estudios,

existe un cierto solapamiento en la concentración correspondiente a los distintos genotipos, nuestro estudio muestra cómo los niveles séricos se distribuyen claramente en tres grupos en función del genotipo *MBL2*: genotipos de alta producción ($YA/YA + YA/XA$), de media producción ($YA/YO + XA/XA$) y de baja producción ($XA/YO + O/O$). La bibliografía previa demuestra la suficiencia de estos niveles medios de proteína que, además, pueden aumentar en el caso de una respuesta de fase aguda, mientras que, en el caso de los individuos con genotipos de baja-nula producción, este aumento sería insignificante. Esto nos permite agrupar los 28 posibles genotipos como *genotipos suficientes* ($A/A + YA/O$) y *genotipos insuficientes* ($XA/O + O/O$), correspondiéndose estos últimos con niveles séricos menores de 100 ng/ml.

El análisis funcional mostró una gran influencia de los genotipos *MBL2* sobre la activación de la VL dependiente de MBL. La presencia de los alelos mutados disminuye drásticamente la actividad de la VL. Como sucede con los niveles séricos, el alelo *X* también tiene un efecto en la disminución de la actividad. Así, los individuos con genotipos insuficientes, tienen un porcentaje de activación de complemento dependiente de MBL prácticamente nulo. En este caso, no se ha visto claramente una distribución de la actividad en tres grupos de genotipos, como sucede con los niveles séricos de la proteína, encontrándose muy disminuída la actividad correspondiente a los genotipos XA/XA . Sin embargo, como ya se comentó, esto puede deberse a la aleatoriedad del valor de la media obtenida, causada por tener el dato solamente de tres individuos. De hecho, Walsh *et al* (2007), con un número mayor de individuos con genotipo XA/XA , observan una actividad mayor en éstos que en aquellos con genotipos O/O ; por su parte, Minchinton *et al* (2002) en 11 individuos XA/XA , encuentran una mayor actividad que en el grupo con genotipo XA/O . Seelen *et al* (2005) establecen de manera arbitraria un valor de corte del 10% de la actividad, por debajo del cual consideran que la actividad es anormal y que se correlaciona con niveles séricos de MBL bajos. En nuestro estudio se observó también una fuerte correlación positiva entre los niveles séricos de MBL y su capacidad para activar la VL, si bien el valor de corte podríamos situarlo en valores aún menores (incluso en el 5%). Por todo ello consideramos válida la agrupación de los genotipos en *suficientes* e *insuficientes*. Al igual que en el caso de los niveles séricos, el control del estado de los

individuos analizados reduce la posibilidad de actividad elevada como resultado de una respuesta de fase aguda.

En conclusión, el presente estudio confirma la asociación gradual existente entre los genotipos *MBL2* y los niveles séricos de MBL, así como con la actividad de la VL mediada por MBL. Esto nos permite realizar estudios del gen *MBL2* agrupando los 28 posibles genotipos en base a su funcionalidad. Por otra parte, este estudio establece las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* en población española (incluida la canaria), mostrando, en primer lugar, la concordancia con su origen caucásico, y permitiendo, en segundo lugar, posteriores estudios de susceptibilidad a enfermedad en nuestra población, que contribuyan a arrojar luz sobre el papel de la MBL en diversas enfermedades.

CAPÍTULO V

POLIMORFISMOS DEL GEN *MBL2* COMO FACTOR MODULADOR DE LA ENFERMEDAD EN MUJERES CANARIAS CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES)

POLIMORFISMOS DEL GEN *MBL2* COMO FACTOR MODULADOR DE LA ENFERMEDAD EN MUJERES CANARIAS CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES)

RESUMEN

Antecedentes. El LES es una enfermedad multifactorial y poligénica cuya patología y etiología precisas permanecen desconocidas. La MBL está implicada en la activación de complemento. Su deficiencia ha sido asociada con un riesgo aumentado de LES, aunque los resultados obtenidos en diversos estudios son contradictorios.

Objetivo. Determinar si los polimorfismos del gen *MBL2* se asocian con las características clínicas y la susceptibilidad al LES en mujeres canarias.

Materiales y métodos. Se determinaron los alelos y genotipos del gen *MBL2* en 89 mujeres con LES y 414 mujeres controles sanas.

Resultados. No se encontraron diferencias en las frecuencias alélicas ni genotípicas entre pacientes y controles. Los anticuerpos anti-U1RNP fueron menos frecuentes en asociación con los alelos mutados ($p = 0,037$) y con los genotipos deficientes de MBL (aunque esta última asociación no fue estadísticamente significativa). El grupo de pacientes con genotipos de producción insuficiente mostraron una frecuencia disminuida de anticuerpos anti-Sm ($p = 0,059$). Se observó también una tendencia no significativa entre menor prevalencia de anticuerpos anti-Sm y anti-cardiolipina en asociación tanto con alelos mutados como con genotipos insuficientemente productores. La prevalencia de más de un autoanticuerpo fue menor en asociación con los alelos mutados ($p = 0,022$) y con genotipos de producción insuficiente ($p = 0,052$). Por otra parte, los pacientes homocigotos o heterocigotos para los alelos mutados presentaron una edad significativamente mayor tanto al comienzo de la enfermedad como al diagnóstico de LES ($p = 0,005$ y $p = 0,014$ respectivamente). Se observó también un aumento en la media de edad al comienzo de la enfermedad y al diagnóstico de LES en relación al número de alelos no productores presentes ($p = 0,021$ y $p = 0,038$ respectivamente).

Conclusiones. El defecto de MBL no es un factor de riesgo para el desarrollo de LES en población femenina canaria, pero sí se asocia con una menor prevalencia de autoanticuerpos y con una edad más tardía del comienzo y el diagnóstico de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

El LES es una enfermedad autoinmune prototípica que implica la formación de múltiples autoanticuerpos y la inflamación recurrente de varios órganos. Es una enfermedad crónica con un amplio rango de manifestaciones clínicas, caracterizada por cursar con sucesivas exacerbaciones y remisiones. La prevalencia estimada en población española de LES en adultos es de 91 casos por cada 100.000 habitantes (Carmona L, 2001), cifra similar en la Comunidad Canaria. La edad de inicio oscila entre los 17 y los 35 años, siendo más frecuente en mujeres que en varones (en una proporción 10:1), si bien esta preponderancia femenina disminuye cuando la enfermedad comienza en la infancia o después de los 65 años. Ciertos grupos étnicos, como aquellos con ancestros africanos o asiáticos, tienen un mayor riesgo de presentar este trastorno, que además puede ser más grave que en pacientes caucásicos. El LES está caracterizado por una serie de alteraciones inmunológicas, viéndose afectadas tanto la inmunidad celular como la humoral. Estas alteraciones dan como resultado la aparición masiva de autoanticuerpos frente a gran número de componentes celulares, fundamentalmente nucleares. El depósito de estos inmunocomplejos produce inflamación, originándose daño tisular en diversos órganos. (Lindqvist AK y Alarcón-Riquelme ME, 1999; Mok CC y Lau CS, 2003).

Dada la gran heterogeneidad de manifestaciones clínicas que pueden presentar los individuos afectados de LES, el *American College of Rheumatology* (ACR) estableció 11 criterios para el diagnóstico de la enfermedad (Tan EM *et al*, 1982), los cuales se revisaron posteriormente (Hochberg MC, 1997), y que son los que se tienen en cuenta en la práctica clínica, de manera que un paciente será diagnosticado de LES cuando presente cuatro o más de estos criterios, simultáneamente o a lo largo de la evolución de su enfermedad.

La etiología del LES es desconocida, si bien contribuyen factores tanto hormonales, como ambientales y genéticos (Mok CC y Lau CS, 2003). La evidencia de predisposición hereditaria al LES proviene de estudios familiares, que demuestran una elevada concordancia entre gemelos homocigóticos, así como una alta prevalencia de la enfermedad entre familiares de pacientes con LES (Deapen D *et al*, 1992). La base genética es muy compleja, y de los estudios realizados hasta la fecha se deduce que pueden estar implicados varios genes. Así, se han realizado tanto estudios de ligamiento como de asociación caso-control.

Los análisis de ligamiento han relacionado un intervalo del brazo largo del cromosoma 1 (1q23-24), donde se encuentran los genes de los FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), y de la proteína C reactiva, con el LES en diversas poblaciones, así como, entre otras más, la región 6p11-21, donde se sitúan los genes del sistema principal de histocompatibilidad (HLA). También se han obtenido resultados de asociación con genes relacionados con la producción de citocinas y con la regulación de la respuesta de los linfocitos. Los estudios genéticos de asociación son tratados con mayor amplitud en las revisiones de Kelly *et al* (2002), Mok y Lau (2003) y Tsao (2004).

Por otra parte, la deficiencia de alguno de los componentes tempranos del sistema de complemento (C1q, C2 y C4) representa un riesgo mayor de predisposición a LES (Walport MJ, 1993; Pickering MC *et al*, 2001). Para explicar la relación entre el defecto de complemento y la enfermedad autoinmune se han desarrollado diversas hipótesis: desórdenes en la inmunidad humoral, o aclaramiento deteriorado de inmunocomplejos o de cuerpos apoptóticos.

Diferentes estudios han señalado al gen *MBL2* como un gen candidato de asociación a LES en diversas poblaciones. Sin embargo, mientras unos estudios mostraban al defecto de MBL como un factor de riesgo para el desarrollo de LES, o como un factor implicado en la producción de autoanticuerpos o en el daño de ciertos órganos, otros estudios no encontraban asociación alguna (ver relación de estudios relevantes en el ANEXO V.1, al final del capítulo). La falta de reproducibilidad de los estudios realizados puede tener varias causas, desde tamaños muestrales insuficientes, a resultados sesgados por sexo, pasando por la heterogeneidad étnica.

Para examinar el papel propuesto para el defecto de la MBL en el LES, estudiamos la asociación de los alelos y genotipos del gen *MBL2* con la susceptibilidad al LES o con alguna característica clínica o serológica, en un grupo de mujeres de origen español con LES en las Islas Canarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y controles.

En la población de pacientes estudiada se incluyeron 89 mujeres españolas, no relacionadas entre sí, atendidas en el Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín” (edad media 40,44 ± 12,39 años). Todas las pacientes

cumplían cuatro o más de los criterios revisados propuestos por el ACR para el diagnóstico del LES. La edad media al inicio de la enfermedad fue de 30 años (con un rango entre 12 y 68 años). Las características clínicas analizadas fueron las siguientes: criterios de clasificación de LES, presencia de los autoanticuerpos anti-cardiolipina, anti-dsDNA (ADN de doble cadena), anti-Sm (antígeno Smith), anti-U1RNP (ribonucleoproteína U1) y anti-Ro/SSA y/o -La/SSB (ribonucleoproteínas Ro y La), edad al inicio de la enfermedad y en el momento del diagnóstico de LES, hipocomplementemia, trombosis, aborto, ictus, fenómeno de Raynaud, SLAM (medición de la actividad del lupus sistémico) y SLEDAI (índice de actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico) (tabla V.1).

Tabla V.1. Características clínicas de las pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES).

Características clínicas	Frecuencia^a	Individuos total^b
Edad media	40,44	89
Criterios de LES (ACR)		
Erupción malar	49 (55,06)	89
Erupción discoide	11 (12,36)	89
Fotosensibilidad	47 (52,81)	89
Úlceras orales	34 (38,20)	89
Artritis	75 (84,27)	89
Serositis	25 (28,09)	89
Afectación renal	39 (43,82)	89
Afectación neurológica	12 (13,48)	89
Afectación hematológica	69 (77,53)	89
Afectación inmunológica	80 (89,89)	89
Anticuerpos antinucleares	89 (100)	89
Hipocomplementemia	71 (80,68)	88
Trombosis	11 (12,36)	89
Aborto	8 (8,99)	89
Ictus	3 (3,37)	89
Fenómeno de Raynaud	36 (42,35)	85
Auto-anticuerpos		
Anti-cardiolipina	42 (48,84)	86
Anti-dsDNA	78 (87,64)	89
Anti-Sm	22 (25,29)	87
Anti-U1RNP	33 (37,50)	88
Anti-La y/o -Ro	38 (43,18)	88

^a Los valores son el número (%), excepto para la edad, que es la media en años.

^b Número de individuos con dato válido para la característica analizada.

Los datos demográficos y clínicos se obtuvieron retrospectivamente de las historias clínicas, siendo los criterios de recolección de datos uniformes para todos los pacientes.

El grupo control lo formaron 414 mujeres sanas españolas no relacionadas entre sí, las cuales fueron voluntarias en el Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín” (pertenecientes al grupo de población canaria descrito en el apartado 1 del capítulo III). La edad media de este grupo control fue de $34,67 \pm 10,06$ años.

Debido a la baja incidencia del LES en varones, el estudio se realizó únicamente en población femenina.

Análisis genético.

La extracción del ADN así como el genotipaje se realizaron tal como se describe en el capítulo III.

Análisis estadístico.

Para comparar la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* para dos grupos, se empleó la prueba de Chi-cuadrado, o el test exacto de Fisher cuando fue necesario. El riesgo de LES asociado con los genotipos de *MBL2* como factor genético y la fuerza de la asociación de los genotipos con la frecuencia de las características clínicas se estimó usando el cálculo de los odds ratio (OR) con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

La comparación de la diferencia de medias para la edad al inicio de la enfermedad y la edad al diagnóstico de LES, en relación a los genotipos *MBL2*, se realizó mediante el test de la *t* de Student para dos muestras independientes o mediante el análisis de la varianza de la ANOVA de un factor cuando se compararon más de dos categorías.

(Para una descripción más detallada del análisis estadístico ver el apartado 6 del capítulo III).

RESULTADOS

La frecuencia alélica de las variantes de la región estructural no difirió significativamente entre los grupos de casos y de controles. La frecuencia total de los alelos no productores (alelos *O*) también fue similar entre ambos grupos: 49

alelos en pacientes (27,53%) frente a 212 alelos en el grupo control (25,60%); $p = 0,66$ (tabla V.2).

Tabla V.2. Frecuencia de los alelos estructurales del gen *MBL2* en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y población control.

Alelos	Pacientes (N = 178)	Controles (N = 828)
A	129 (72,47)	616 (74,40)
O	49 (27,53)	212 (25,60)
B	33 (18,54)	131 (15,82)
C	6 (3,37)	29 (3,50)
D	10 (5,62)	52 (6,28)

Los valores son el número de cromosomas (%).

A designa el alelo salvaje y O designa el total de los alelos mutados B, C y D.

Las frecuencias genotípicas se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos grupos.

En la tabla V.3 se muestran las frecuencias de los genotipos agrupados en base a la presencia de las variantes estructurales. El 50,56% de las pacientes portaban genotipos A/A, el 43,82% genotipos A/O y un 5,62% genotipos O/O. Esta distribución general también fue similar a la observada en el grupo control: 55,31% de homocigotos A/A; 38,16% de heterocigotos A/O y 6,52% de homocigotos O/O (χ^2 para tendencia lineal = 1, 2 grados de libertad, $p = 0,61$; comparación A/A vs. A/O + O/O: $p = 0,48$; comparación O/O vs. A/A + A/O: $p = 0,94$). Al evaluar la presencia del alelo de baja producción L_{XPA} en los distintos genotipos, observamos que la frecuencia de homocigotos L_{XPA} no difería entre pacientes con LES (3,37%) y controles (2,90%). Además, la frecuencia de genotipos L_{XPA}/O no difirió significativamente entre casos y controles (7,87% vs. 11,84% respectivamente; $p = 0,16$). De igual modo, la frecuencia de genotipos de producción insuficiente (L_{XPA}/O + O/O) tampoco fue significativamente diferente entre pacientes y controles (13,48% vs. 18,36%; $p = 0,35$) (tabla V.3).

Tabla V.3. Frecuencias genotípicas del gen *MBL2* en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y población control.

Genotipos <i>MBL2</i>	LES (N = 89)	Controles (N = 414)
A/A total	45 (50,56)	229 (55,31)
YA/YA	27 (30,34)	139 (33,57)
XA/YA	15 (16,85)	78 (18,84)
XA/XA	3 (3,37)	12 (2,90)
A/O total	39 (43,82)	158 (38,16)
YA/O	32 (35,95)	109 (26,33)
XA/O	7 (7,87)	49 (11,84)
O/O total	5 (5,62)	27 (6,52)
A/A + YA/O	77 (86,52)	338 (81,64)
XA/O + O/O	12 (13,48)	76 (18,36)

Los valores son el número de individuos (%).

A designa el alelo salvaje y O designa los alelos mutados B, C y D.

Las frecuencias genotípicas en las principales características clínicas de las pacientes se muestran en la tabla V.4. Algunos datos clínicos no pudieron ser obtenidos de algunas pacientes. No se encontraron diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas al analizar los criterios de clasificación de LES así como otras características clínicas (aborto, citopenias, ictus y fenómeno de Raynaud).

Al analizar la distribución de los autoanticuerpos entre los distintos subgrupos de alelos y genotipos (tabla V.5) se observó que las frecuencias de anti-cardiolipina, anti-Sm y anti-U1RNP eran menores en relación con los alelos y genotipos asociados al defecto de MBL. Es de destacar que los alelos O se asociaron significativamente con una menor prevalencia de autoanticuerpos U1RNP (24,49%) al comparar con los alelos A (42,52%) ($p = 0,037$, OR = 0,44, IC 95% 0,19-0,96). Una tendencia similar, aunque no significativa, hacia una menor prevalencia de autoanticuerpos anti-U1RNP se observó al comparar pacientes con genotipos A/O o O/O con aquellos con genotipos A/A (27,27% vs. 47,73% respectivamente; $p = 0,077$). Además, el grupo de pacientes con genotipos insuficientemente productores (*LXPA/O* + *O/O*) mostraron una frecuencia disminuida de anticuerpos anti-Sm (0%) al ser comparados con

aquellas pacientes sin estos genotipos (28,95%), aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística ($p = 0,059$).

Tabla V.4. Frecuencias genotípicas del gen *MBL2* en pacientes con LES en función de las principales características clínicas.

Características clínicas	A/A + YA/O	XA/O + O/O
Criterios de LES (ACR)		
Erupción malar	42 (54,55)	7 (58,33)
Erupción discoide	11 (14,29)	0 (0)
Fotosensibilidad	42 (54,55)	5 (41,67)
Úlceras orales	31 (40,26)	3 (25,00)
Artritis	64 (83,12)	11 (91,67)
Serositis	22 (28,57)	3 (25,00)
Afectación renal	35 (45,45)	4 (33,33)
Afectación neurológica	10 (12,99)	2 (16,67)
Afectación hematológica	59 (76,62)	10 (83,33)
Afectación inmunológica	70 (90,91)	10 (83,33)
Anticuerpos antinucleares	77 (100)	12 (100)
Hipocomplementemia	68 (83,95)	10 (71,43)
Trombosis	10 (12,19)	2 (14,29)
Aborto	7 (8,54)	1 (7,14)
Ictus	4 (100)	0
Fenómeno de Raynaud	33 (42,31)	4 (30,77)

Los valores son el número de individuos (%).

A designa el alelo salvaje y O designa los alelos mutados B, C y D.

También se analizó el número de autoanticuerpos distintos presentes (anti-cardiolipina, anti-dsDNA, anti-Sm, anti-U1RNP y anti-La/Ro) con respecto a los genotipos de *MBL2* (los anticuerpos antinucleares, ANA, fueron excluidos del análisis debido a su prevalencia del 100% en nuestras pacientes) (tabla V.5). La prevalencia de más de un autoanticuerpo frente a ninguno o uno (mayoritariamente anti-dsDNA) fue de un 66,66% en asociación con los alelos O, comparado con un 83,33% asociado a los alelos A ($p = 0,022$, OR= 0,4, IC 95% 0,17-0,93). Además, la prevalencia de más de un autoanticuerpo también estaba disminuida en pacientes con genotipos A/O o O/O (69,78% vs. 87,80% en

pacientes con genotipos *A/A*; $p = 0,062$) y en pacientes con genotipos *LXPA/O* o *O/O* (54,54% vs. 82,19% en pacientes con los demás genotipos; $p = 0,052$). Por otra parte, evaluamos la frecuencia de sólo aquellos autoanticuerpos en los que se había observado alguna diferencia (anti-cardiolipina, anti-Sm y anti-U1RNP). En este sentido, se encontró una asociación de los alelos *O* con una menor frecuencia de estos autoanticuerpos con respecto a los alelos *A* (58,33% vs. 76,67%; $p = 0,023$, OR= 0,43, IC 95% 0,21-0,87), siendo también estas diferencias estadísticamente significativas al comparar los genotipos *A/O* + *O/O* frente a genotipos *A/A* (60,46% vs. 82,93%; $p = 0,030$, OR = 0,31, IC 95% 0,1-0,96). Además, observamos un descenso no significativo en la frecuencia de pacientes con alguno de estos autoanticuerpos en los genotipos *LXPA/O* + *O/O* (45,45% vs. 75,34% en pacientes sin ninguno de estos autoanticuerpos; $p = 0,069$).

Tabla V.5. Prevalencia de autoanticuerpos en pacientes con lupus eritematoso sistémico en función de los alelos estructurales y los genotipos de *MBL2*^a.

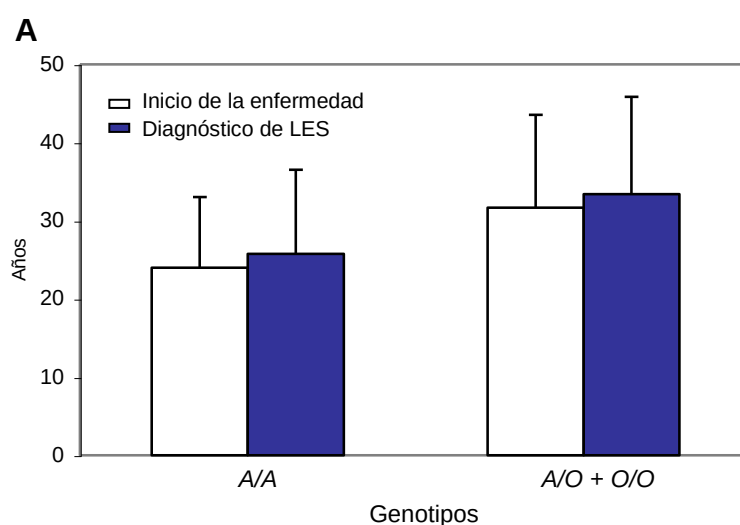
	<i>A</i>	<i>O</i>	<i>A/A</i>	<i>A/O</i> + <i>O/O</i>	<i>A/A</i> + <i>YA/O</i>	<i>X/O</i> + <i>O/O</i>
Anti-cardiolipina (n = 86)	64 (52,03)	20 (40,82)	24 (57,14)	18 (40,91)	38 (51,35)	4 (33,33)
Anti-Sm (n = 87)	34 (26,98)	10 (20,83)	12 (27,27)	10 (23,26)	22 (28,95) ^b	0 (0) ^b
Anti-U1RNP (n = 88)	54 (42,52) ^c	12 (24,49) ^c	21 (47,73) ^d	12 (27,27) ^d	31 (40,79)	2 (16,67)
Anti-cardiolipina, - Sm, -U1RNP ^e (n = 84)	92 (76,67) ^f	28 (58,33) ^f	34 (82,93) ^g	26 (60,46) ^g	55 (75,34) ^h	5 (45,45) ^h
Anti-DNA (n = 89)	115 (89,15)	41 (83,67)	41 (91,11)	37 (84,09)	68 (88,31)	10 (83,33)
Anti-La/Ro (n = 88)	54 (42,52)	22 (44,90)	19 (43,18)	19 (43,18)	33 (43,42)	5 (41,67)
Más de 1 autoanticuerpo ⁱ (n = 84)	100 (83,33) ^j	32 (66,66) ^j	36 (87,80) ^k	30 (69,78) ^k	60 (82,19) ^l	6 (54,54) ^l

^aLos valores son el número de cromosomas para los alelos y el número de individuos para los genotipos (%). ^b $p = 0,059$. ^c $p = 0,037$, OR= 0,44, IC 95% 0,19-0,96. ^d $p = 0,077$. ^eAnálisis de la presencia de anti-cardiolipina y/o anti-Sm y/o anti-U1RNP vs. ninguno de estos autoanticuerpos. ^f $p = 0,023$, OR= 0,43, IC 95% 0,21-0,87. ^g $p = 0,030$, OR = 0,31, IC 95% 0,1-0,96. ^h $p = 0,069$. ⁱAnálisis de más de 1 de los 5 autoanticuerpos vs. ninguno o 1 autoanticuerpo. ^j $p = 0,022$, OR= 0,4, IC 95% 0,17-0,93. ^k $p = 0,062$. ^l $p = 0,052$.

Finalmente, se analizó la relación de los genotipos deficientes de MBL con la edad tanto al inicio de la enfermedad como al diagnóstico de LES, observándose que la edad media al inicio de la enfermedad era 7,7 años menor en pacientes con genotipos *A/A* que en aquellos con genotipos *A/O* o *O/O* ($24,0 \pm 9,05$ años vs. $31,7 \pm 11,9$ respectivamente; $p = 0,005$) (figura V.1A). De forma similar, la edad media al diagnóstico de LES fue 7,7 años menor en pacientes con genotipos *A/A* que en aquellos con genotipos *A/O* o *O/O* ($25,75 \pm 10,8$ años vs. $33,45 \pm 12,4$ respectivamente; $p = 0,014$) (figura V.1A).

Además, se observó un aumento en la edad media al inicio de la enfermedad relacionado con el número de alelos no productores presentes: $24,0 \pm 9,05$ años en pacientes con genotipos *A/A*, $31,5 \pm 12,3$ años en pacientes con genotipos *A/O* y $33,7 \pm 5,9$ años en pacientes con genotipos *O/O* (figura V.1B). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0,021$). Se observaron resultados similares al analizar la edad media al diagnóstico de LES. Esta fue de $25,75 \pm 10,8$ años en pacientes con genotipos *A/A*, $33,0 \pm 12,7$ en pacientes con genotipos *A/O* y $39,4 \pm 0,1$ en pacientes con genotipos *O/O*. Estas diferencias también fueron estadísticamente significativas ($p = 0,038$) (figura V.1B).

Las diferencias entre los genotipos suficientes y los insuficientes no fueron significativas para ninguna de las dos comparaciones de edades (figura V.1C).



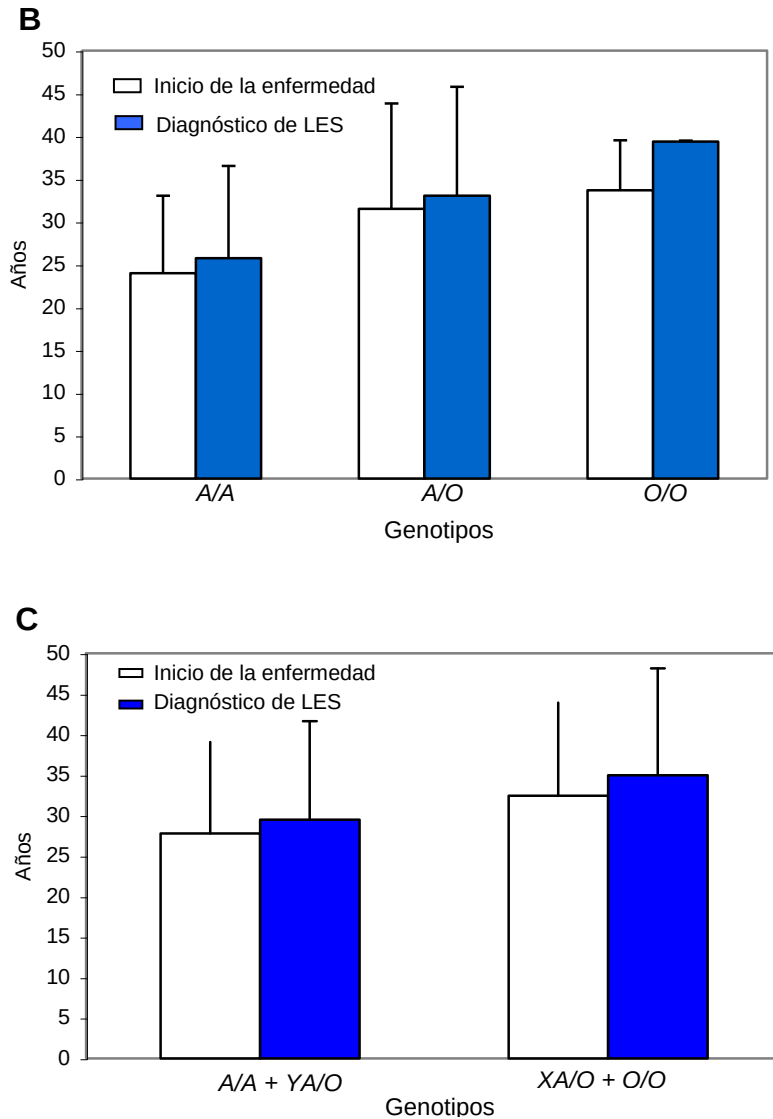


Figura V.1. Edades al inicio de la enfermedad y al diagnóstico de LES en relación a los genotipos *MBL2*. Los valores son la edad media $\pm$ desviación estándar. **A.** Comparación de los genotipos estructurales A/A vs. A/O + O/O ($p = 0,004$ para la edad media al inicio de la enfermedad y $p = 0,013$ para la edad media al diagnóstico de LES). **B.** Comparación de los genotipos estructurales A/A vs. A/O vs. O/O ($p = 0,021$ para la edad media al inicio de la enfermedad y $p = 0,038$ para la edad media al diagnóstico de LES). **C.** Comparación de los genotipos suficientes vs. insuficientes (diferencias no significativas).

DISCUSIÓN

El presente estudio muestra una gran similitud en las frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes con LES y controles en mujeres canarias. También documenta una menor prevalencia de ciertos autoanticuerpos en pacientes con genotipos asociados al defecto de MBL, así como una asociación entre el defecto

de la proteína y unas edades de inicio de la enfermedad y de diagnóstico de LES mayores.

Previamente se ha sugerido que el defecto de MBL se asocia con una mayor susceptibilidad a LES. Los primeros estudios llevados a cabo para averiguar la relación entre la MBL y el LES revelaron un aumento significativo en la frecuencia de los alelos estructurales *B* y *C* en pacientes afroamericanos (Sullivan KE *et al*, 1996). Por el contrario, en pacientes ingleses no se detectó un aumento significativo ni en la frecuencia del alelo *B*, ni en la de homocigotos *BB* (Davies EJ *et al*, 1995). Sin embargo, el oligonucleótido directo empleado en estos y otros estudios incluía el sitio polimórfico *P/Q* el cual, tal y como ha sido puesto de manifiesto, puede llevar a una sobreestimación del alelo *B* y de los homocigotos *BB* (Madsen HO *et al*, 1994). En subsecuentes estudios, en pacientes de Sudáfrica (Davies EJ *et al*, 1998), China (Lau YL *et al*, 1996; Huang HF *et al*, 2003) y Dinamarca (Garred P *et al*, 1999), se observó un aumento de la frecuencia de las mutaciones estructurales del gen *MBL2*. Si bien los análisis estadísticos de estos estudios no son concluyentes respecto a la significación estadística, se ha sugerido que la deficiencia de MBL puede ser un factor de riesgo menor para LES. Por otra parte, en un meta-análisis en pacientes daneses (Garred P *et al*, 2001) se observa asociación de las mutaciones estructurales con mayor susceptibilidad a LES, y un estudio en japoneses (Takahashi R *et al*, 2005) encuentra una mayor susceptibilidad a LES asociada al genotipo *B/B*. Respecto a las variantes del promotor del gen *MBL2*, en poblaciones chinas se ha observado un aumento significativo del alelo de baja producción *LX* (Ip WK *et al*, 1998; Huang YF *et al*, 2003), mientras que en pacientes afroamericanos se ha observado un aumento significativo de homocigotos para este alelo (Sullivan KE *et al*, 1996). Estos resultados, sin embargo, no fueron confirmados por un estudio realizado en población danesa (Garred P *et al*, 1999).

Por otro lado, un estudio posterior en población japonesa (Horiuchi T *et al*, 2000) ha mostrado similitudes entre las frecuencias de las variantes estructurales y de promotor encontradas en pacientes con LES al comparar con un grupo control. Los autores concluyen que, en su población, no parece que el defecto de MBL juegue un papel principal en la patogénesis del LES. Así, la deficiencia de MBL puede tener mayor significación en unas poblaciones que en otras. Estudios más recientes, tanto en caucásicos (Jonsen A *et al*, 2004; Momot T *et al*, 2006; Bultink

ITEM *et al*, 2006), como en un grupo multiétnico norteamericano (Piao W *et al*, 2007), no encuentran asociación entre las variantes del gen *MBL2*, o el defecto de MBL, y una mayor susceptibilidad a LES, mientras que un meta-análisis realizado en 2005 con individuos europeos-americanos (Lee YH *et al*, 2005), y que incluye nuestro grupo de pacientes con LES (obtenidos de nuestros datos publicados en 2003), muestra a los alelos *B*, *L* y *X* como factor de riesgo para LES.

Considerando el análisis de las variantes estructurales y de las de la región del promotor, los resultados de nuestro estudio muestran un elevado grado de similitud en las frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes y controles. De este modo, se puede concluir que, al menos en lo que respecta a nuestra población, los datos obtenidos no apoyarían la hipótesis de que el defecto de MBL represente un factor de riesgo para LES. Estudios previos en población española de Barcelona mostraron un aumento en el número de pacientes portadores del alelo *B* (Davies EJ *et al*, 1997; Villareal J *et al*, 2001) y una frecuencia disminuida del alelo *HYP A* (Villareal J *et al*, 2001) en sus pacientes con LES.

En apoyo a nuestros datos, los estudios de rastreo genómico para ligamiento a LES que se han realizado hasta la fecha no han encontrado asociación dentro de la región del gen *MBL2* (Gaffney PM *et al*, 1998; Shai R *et al*, 1999). Por otro lado, dado que el LES es una patología con una distribución fuertemente sesgada por género, se estimó necesario realizar un estudio limitado sólo a mujeres. De hecho, Garred *et al* (1999) encontraron una sobreestimación de hombres en el grupo de homocigotos mutados en su población de pacientes con LES, sugiriendo que el defecto de MBL puede aumentar el riesgo de adquirir LES entre los hombres. Sin embargo, si se hubiera hecho un análisis sólo en las mujeres de su población de pacientes, el defecto de MBL, al igual que en nuestro estudio, no habría representado susceptibilidad a LES. En este sentido, gran parte de los estudios realizados hasta la fecha han incluido en su grupo de pacientes tanto a hombres como a mujeres, analizándolos de forma conjunta.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran una menor prevalencia de determinados autoanticuerpos asociada a la deficiencia de MBL. Estudios previos (Davies EJ *et al*, 1995; Sullivan KE *et al*, 1996) no encontraron que los alelos mutados de *MBL2* ejercieran influencia en la prevalencia de autoanticuerpos, mientras que estudios recientes muestran una asociación entre los genotipos *A/O* y *O/O* con un aumento de anti-cardiolipina y anti-C1q (Seelen MA

et al, 2005b) y anti-fosfolípido (aunque con una significación estadística de $p = 0,05$) (Bertoli AM *et al*, 2006). Por otra parte, Piao *et al* (2007) encuentran también ausencia de genotipos O/O en relación al anticuerpo anti-Sm, si bien sus pacientes A/O presentaban dicho anticuerpo con mayor frecuencia. Nosotros encontramos que la prevalencia de anti-U1RNP fue menor en asociación a los alelos defectivos, y se observó también una menor prevalencia, aunque no significativa estadísticamente, en genotipos deficientes de MBL. Además, se observó una tendencia hacia una menor prevalencia de los anticuerpos anti-Sm y anti-cardiolipina asociada a la deficiencia de MBL. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, lo cual puede ser atribuido al bajo número de individuos en cada subgrupo. Al evaluar el análisis conjunto del estudio de autoanticuerpos, también se observó un papel protector de los alelos y genotipos defectivos de producción de MBL cuando se comparó la prevalencia de tener ninguno o uno (principalmente anti-dsDNA) frente a tener más de uno, así como para el subsecuente análisis conjunto de los autoanticuerpos anti-cardiolipina, anti-Sm y anti-U1RNP. Nuestros resultados sugieren claramente que el defecto de MBL juega un papel protector en la producción de autoanticuerpos en pacientes con LES. Si bien estos resultados discrepan de los obtenidos por Seelen *et al* (2005), Bertoli *et al* (2006) y Piao *et al* (2007), habría que tener en cuenta que estos tres estudios están realizados en grupos de pacientes que incluyen individuos de ambos sexos y de diversos orígenes étnicos mezclados, lo cual podría influir en los resultados observados.

La prevalencia de algunos autoanticuerpos también es menor en pacientes con otras deficiencias de complemento. De hecho, se ha establecido que el sistema del complemento juega un papel importante en la producción de una respuesta inmunológica humoral normal a antígenos T-dependientes (Walport MJ, 1993; Pickering MC *et al*, 2001). Nuestras observaciones parecen sugerir que la deficiencia de MBL está asociada con una menor prevalencia de algunos autoanticuerpos, pero no con una mayor susceptibilidad a LES.

Cuando la relación entre los genotipos de *MBL2* y las edades al inicio de la enfermedad y al diagnóstico del LES fueron evaluadas, se encontró un aumento en la edad media al inicio de la enfermedad ($p = 0,021$) en pacientes con genotipos defectivos de proteína. Se observaron resultados similares al analizar la edad media al diagnóstico de LES ($p = 0,038$). Por tanto, aquellos pacientes con

deficiencia de MBL tienen un comienzo de la enfermedad y un diagnóstico de LES más tardío. Este hallazgo no fue observado en un estudio previo (Garred P *et al*, 1999), y discrepa de lo observado recientemente por Jakab *et al* (2007), que encuentran una asociación entre el genotipo X/X y un diagnóstico y desarrollo más temprano del LES. Previamente se ha comprobado en algunos estudios, pero no en todos, que un retraso en el inicio de la enfermedad se asocia con una supervivencia prolongada (Wallace DJ *et al*, 1981; Ginzler EM *et al*, 1982; Ward MM *et al*, 1995; Abu-Shakra M *et al*, 1995). Este dato, junto con el hecho de que la presencia de ciertos autoanticuerpos se han asociado con determinadas características clínicas que pueden definir el curso de la enfermedad, podría sugerir que la deficiencia de MBL puede ser un factor que contribuye a un menor grado de severidad de la enfermedad. De hecho, la habilidad de los genotipos *MBL2* de influir en más de un aspecto de una enfermedad es evidente en otras condiciones inflamatorias (Hibberd ML *et al*, 1999; Garred P *et al*, 2000; Rector A *et al*, 2001), posiblemente como consecuencia de una capacidad reducida de activar el complemento y, de ese modo, de provocar un menor daño (Turner MW *et al*, 1996). Sin embargo, al evaluar la asociación entre los alelos y genotipos de *MBL2* y determinar las características clínicas del LES, no se encontró relación directa, excepto en el caso en el que se observó un aumento significativo en la frecuencia del alelo C en pacientes con trombosis ($p = 0,026$). Por otra parte, se ha observado previamente que el daño renal era más frecuente en pacientes con genotipos defectuosos de MBL (Garred P *et al*, 1999; Bertoli AM *et al*, 2006; Font J *et al*, 2007) y en pacientes portadores del alelo B (Davies EJ *et al*, 1997). Sin embargo, en nuestro estudio, así como en otros estudios publicados (Davies EJ *et al*, 1995; Sullivan KE *et al*, 1996), no se observó asociación con trastorno renal.

Adicionalmente, evaluamos los índices SLAM y SLEDAI, y no encontramos ninguna asociación con la deficiencia de MBL. Sin embargo, dado que tanto el SLAM como el SLEDAI son índices sólo de actividad, y no se relacionan directamente con la gravedad de la enfermedad, sería interesante analizar los datos del índice de daño SLICC (Systemic Lupus Internacional Collaborating Clinics) para clarificar la relación entre la gravedad del LES y la deficiencia de MBL. Así, aunque nuestros datos pueden sugerir un papel protector para la MBL en la gravedad de la enfermedad, esto no es apoyado por los datos

clínicos. En este sentido, los únicos autores que encuentran alguna asociación con estos parámetros son Garred *et al* (2001), que asocian el SLEDAI con las mutaciones estructurales, y Font *et al* (2007), que encuentran un mayor SLICC medio en pacientes con LES con genotipos *O/O*, *X/O* y *X/X*.

En resumen, en nuestro estudio, no se han encontrado diferencias estadísticas en las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes estructurales y de promotor del gen *MBL2* entre las pacientes con LES y el grupo control. Estos resultados sugieren que, al menos en el caso del grupo femenino de esta serie, la deficiencia de MBL no representaría un factor de riesgo de LES. Sin embargo, la menor prevalencia de autoanticuerpos observada en pacientes con genotipos de producción defectiva de proteína, junto con un retraso en la edad de inicio de la enfermedad y de diagnóstico de LES en estos pacientes, sugiere que la deficiencia de MBL es un factor modulador de la enfermedad. En vista de la disparidad en los resultados publicados hasta la fecha, se necesitan estudios adicionales para aclarar la relación entre los polimorfismos del gen *MBL2* y el LES.

ANEXO V.1. Publicaciones más relevantes sobre la asociación entre polimorfismos del gen *MBL2* y el lupus eritematoso sistémico (LES).

Autor, año	Población	Nº pacientes	Características	Hallazgos
Davies et al, 1995	Reino Unido	102		No significativo.
Sullivan et al, 1996	Afroamericanos	92		Defecto de MBL (variantes estructurales y de promotor) predispone a LES.
Lau et al, 1996	Chinos de Hong Kong	111		No significativo.
Davies et al, 1997	Espanoles	50		Alelo <i>B</i> se asocia a susceptibilidad de LES,
Davies et al, 1998	Negros sudafricanos	50		No significativo.
Ip et al, 1998	Chinos	112		<i>LX</i> se asocia a susceptibilidad a LES.
Garred et al, 1999	Daneses	91	Análisis conjunto de hombres y mujeres	Asociación de <i>O/O</i> a riesgo de infección, nº de infecciones, neumonía y a menor tiempo entre el diagnóstico y la primera infección, y a daño renal, en pacientes con LES.
Horiuchi et al, 2000	Japoneses	95		No asociación con LES de las variantes de promotor ni estructurales.
Garred et al, 2001	Daneses	99 y meta-análisis	Análisis conjunto de hombres y mujeres	Asociación de mutación estructural a mayor susceptibilidad a LES, SLEDAI e infecciones.
Villareal et al, 2001	Espanoles	125		Alelo <i>B</i> más frecuente en pacientes, y <i>HY</i> mayor en controles.
Huang et al, 2003	Chinos	41		<i>LX</i> es un factor importante de riesgo de LES.
Jönsen et al, 2004	Caucásicos	143	5 con 3 criterios. Hombres y mujeres	No asociación de MBL con susceptibilidad a LES.
Seelen et al, 2005	No indicado (Holanda)	53	Análisis conjunto de hombres y mujeres	Alelos <i>O</i> asociados a disminución de actividad MBL. <i>A/O</i> y <i>O/O</i> asociado a aumento de anti-cardiolipina y anti-C1q.
Takahashir et al, 2005	Japoneses	147		Genotipo <i>B/B</i> asociado a mayor susceptibilidad a LES.
Lee et al, 2005	Caucásicos	96, 85 y meta-análisis	Europeos-americanos y alemanes. Hombres y mujeres.	Alelos <i>B</i> , <i>L</i> y <i>X</i> son factor de riesgo para LES en meta-análisis*.
Momot et al, 2006	Alemanes	287		No asociación entre los alelos variantes y el LES.
Font et al, 2006	No indicado (España)	114		Genotipos <i>O/O</i> , <i>X/O</i> y <i>X/X</i> se asocian con diferentes patologías cardiovasculares y con fallo renal crónico y mayor SLICC medio en pacientes con LES.
Bertoli et al, 2006	Cohorte multiétnica de EE.UU.	417	Análisis conjunto de hombres y mujeres	Genotipos <i>A/O</i> y <i>O/O</i> asociados a leucopenia, daño renal y anti-fosfolípido.
Bultink et al, 2006	No indicado (Holanda)	103	Análisis conjunto de hombres y mujeres	No asociación de defecto de MBL con susceptibilidad a LES ni riesgo adicional de infección.
Mok et al, 2007	Chinos	245	Análisis conjunto de hombres y mujeres	Niveles bajos de MBL predisponen a los LES a más infecciones (principalmente bacterianas).
Piao et al, 2007	Norteamericanos multiétnicos	130	Incluye 2 hombres	No asociación entre MBL y LES. Genotipos <i>A/B</i> y <i>A/C</i> asociados a aumento de anti-Sm,
Jönsen et al, 2007	No indicado (Suecia)	143	Incluye 3 con 3 criterios	Defecto de MBL no se asocia con aumento de infecciones severas en pacientes con LES
Jakab et al, 2007	Húngaros	315		Genotipo <i>X/X</i> asociado a diagnóstico y desarrollo más joven, mayor riesgo de manifestaciones cutáneas y de pleuritis/pericarditis.

* incluye los datos de nuestra publicación (García-Laorden MI et al, 2003)

CAPÍTULO VI

INFLUENCIA DE LA MBL EN LA INFECCIÓN POR EL VIH Y LA TUBERCULOSIS EN POBLACIÓN CANARIA

INFLUENCIA DE LA MBL EN LA INFECCIÓN POR EL VIH Y LA TUBERCULOSIS EN POBLACIÓN CANARIA

RESUMEN

Antecedentes. La MBL es una lectina sérica que media la fagocitosis y activa el complemento. Su deficiencia se ha asociado con una susceptibilidad aumentada a enfermedades infecciosas, principalmente en la infancia. Sin embargo, los alelos no productores de MBL son comunes en la mayoría de las poblaciones, sugiriendo una ventaja selectiva para estos alelos.

Objetivo. Determinar si los polimorfismos del gen *MBL2* se asocian con la susceptibilidad a la infección por el VIH en población canaria, así como a una mayor susceptibilidad a padecer TBC.

Materiales y métodos. Hemos analizado la asociación de los polimorfismos estructurales y de promotor del gen *MBL2* con la infección por el VIH y con TBC en población canaria, incluyendo 615 pacientes VIH positivos con y sin TBC, 127 pacientes con TBC sin VIH, 142 contactos familiares no infectados de los pacientes con TBC, y 730 controles sanos.

Resultados. Las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* no difirieron significativamente entre pacientes con VIH y controles. Los pacientes con VIH con alelos y genotipos de producción deficiente presentaron unas edades medias al diagnóstico significativamente menores. Los pacientes con VIH que también tenían TBC presentaron frecuencias de alelos mutados significativamente menores que los pacientes VIH sin TBC, y menores no significativamente que los controles. Estos pacientes con TBC VIH+ también presentaron menores frecuencias de genotipos insuficientes de MBL que los pacientes VIH sin TBC y los controles, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* de los pacientes con TBC sin VIH no difirieron significativamente de las del grupo control.

Conclusiones. La deficiencia de MBL no parece estar asociada de manera significativa con un mayor riesgo de infección por el VIH, aunque, al menos en nuestros pacientes con VIH, los alelos y genotipos estructurales portadores de mutación se asocian débilmente con una menor frecuencia de TBC activa. El débil papel protector de los alelos mutados y los genotipos estructurales portadores de mutación frente a la TBC, junto con el hecho de que esto sólo se observe en individuos co-infectados por el VIH, y no en aquellos que sólo presentan infección por la micobacteria, no apoyan la teoría de selección equilibrada en el caso de la MBL, según la cual, a pesar de los efectos perjudiciales asociados a la deficiencia de MBL, los alelos de *MBL2* deficientes podrían haber sido seleccionados como consecuencia de su ventaja selectiva contra patógenos intracelulares, como el *M. tuberculosis*, aunque sí apoyan que dicho defecto pueda jugar un papel protector frente a TBC en individuos inmunocomprometidos.

INTRODUCCIÓN

La TBC y el VIH/SIDA son la causa principal de muerte por enfermedad infecciosa en el mundo. Se estima que un tercio de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, aunque sólo alrededor de un 10% de los individuos infectados desarrollan la enfermedad activa (Davies PD y Grange JM, 2001; McShane H, 2003). Entre estos individuos enfermos hay, además, variabilidad en el tiempo de curso de la enfermedad, la gravedad y la distribución anatómica. La TBC está causada por el *M. tuberculosis*, un patógeno intracelular que sobrevive dentro de los macrófagos. Hay muchos factores de riesgo bien conocidos, como la edad avanzada, la malnutrición, el abuso de alcohol, la diabetes y los corticosteroides. Sin embargo, muchos pacientes no presentan un factor de riesgo obvio. Diversas líneas de estudio han apuntado a un papel de los genes del hospedador en el control de la resistencia o la susceptibilidad a la TBC. Por un lado, están los estudios que demuestran diferencias raciales, con niveles elevados de resistencia en poblaciones étnicas expuestas a la micobacteria durante generaciones (Motulsky AG, 1960). Por otro lado, se ha obtenido una demostración más directa de herencia mediante el estudio de gemelos mono y dicigóticos (Comstock GW, 1978). La primera evidencia convincente de asociación genética fue en relación a los genes de HLA. Otros genes han sido posteriormente implicados en la susceptibilidad a la TBC, como ciertas variantes del gen *SLC11A1* (antiguamente *NRAMP1*), una variante del gen del receptor de la vitamina D (*VDR*), un polimorfismo del interferón gamma (*IFNG*), y polimorfismos de los genes codificantes de ciertas citocinas. Fitness *et al* (2004) y Fortin *et al* (2007) revisan en sendas publicaciones diversos genes asociados. Acerca del papel de los alelos y genotipos del gen *MBL2* en la infección y enfermedad por *M. tuberculosis*, los estudios previos han mostrado resultados conflictivos (ver relación de estudios relevantes en el ANEXO VI.1, al final del capítulo).

En muchas poblaciones gran parte del resurgimiento de la TBC se puede atribuir a la epidemia de infección por el VIH, el cual es el mayor factor de riesgo único para la progresión a TBC activa en adultos (Davies PD y Grange JM, 2001; McShane H, 2003). De hecho, las personas infectadas por el VIH tienen un riesgo marcadamente elevado para la TBC primaria o su reactivación (Havlr y Barnes, 1999), siendo la TBC la co-infección más importante del VIH. Es probable que el *M. tuberculosis* aumente la replicación del VIH induciendo a los macrófagos a producir TNF- α , IL-1 e IL-6 (Havlr DV y Barnes PF, 1999). Al replicarse el virus en células T CD4⁺ activadas, la infección por la micobacteria, así como por otros patógenos, causaría replicación y activación de

esas células y, por lo tanto, un aumento de la replicación viral (Pennycook A *et al*, 2000). Una vez más, factores genéticos del hospedador juegan un papel importante en la susceptibilidad a la infección por el VIH y en la progresión a SIDA. Numerosas investigaciones han sugerido un papel de diversos genes en esta enfermedad, tanto genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), como genes de quimiocinas y de sus receptores, de defensinas, citocinas, receptores de tipo Toll (TLR) y otros (Lama J y Planelles V, 2007). Es conocido desde 1989 (Ezekowitz RA *et al*) la interacción entre la MBL y el VIH. Estudios posteriores corroboraron que la unión de la MBL al VIH es dependiente de los glicanos con alto contenido en manosa de la proteína gp120 de la envoltura del virus. Un estudio más reciente (Ying H *et al*, 2004) sugiere que, *in vivo*, la MBL puede afectar al aclaramiento del VIH de la sangre uniéndose al virus y mediando la captación por los macrófagos tisulares. Por otra parte, este y otro estudio (Hart ML *et al*, 2003) encuentran que los aislados primarios de VIH son resistentes a la neutralización por la MBL. Los resultados del estudio de Hart *et al* (2003) también sugieren que, el tratamiento de los pacientes con drogas que alteran la glicosilación, puede resultar en una destrucción incrementada o aclaramiento del VIH por la MBL. La cuestión que sigue sin estar clara es porqué la unión de la MBL a la gp120 no resulta en una neutralización eficiente.

Por motivos ya descritos a lo largo del presente estudio, se ha sugerido que los bajos niveles séricos de MBL pueden estar relacionados con alguna ventaja biológica (Garred P *et al*, 1994; Ezekowitz RA, 2003; Casanova JL y Abel J, 2004). Al estudiar pacientes infectados por micobacterias, resulta de interés la hipótesis que sugiere que, los bajos niveles de MBL, pueden conferir una ventaja selectiva contra la infección por patógenos intracelulares (Garred P *et al*, 1994; Ezekowitz RA, 2003).

En este estudio hemos analizado la asociación de los alelos y genotipos del gen *MBL2* con la susceptibilidad a infección por el VIH y el *M. tuberculosis*, y con el desarrollo de TBC activa, tanto en pacientes con VIH como sin él.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y controles.

La población de pacientes con VIH incluye 615 pacientes españoles infectados por el VIH atendidos en el Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín” entre 1998 y 2002 ($38,84 \pm 10,01$ años, 18,54% mujeres). Ciento seis de estos pacientes también fueron diagnosticados de TBC (VIH-TBC) ($39,96 \pm 8,53$ años, 15,09%

mujeres), mientras que 414 no padecieron TBC (VIH no TBC) ($39,18 \pm 9,45$ años, 19,08% hombres). En 95 individuos el dato de TBC no estaba disponible. La población con TBC sin VIH incluye 127 pacientes españoles con TBC ($42,10 \pm 15,88$ años, 40,95% mujeres) diagnosticados en Gran Canaria entre 1998 y 2001, los cuales tenían confirmación bacteriológica mediante cultivo y microscopía. Los archivos médicos fueron revisados para obtener los datos demográficos y epidemiológicos, incluyendo la edad al diagnóstico, el sexo y el o los factores de riesgo para infección por VIH (tabla VI.1). El grupo control lo formaron 730 individuos sanos españoles no relacionados entre sí, los cuales fueron voluntarios en el Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín (grupo de población canaria descrito en el apartado 1 del capítulo III). La edad media de este grupo control fue de $35,40 \pm 10,68$ años (56,71% mujeres). Además, se analizaron 142 contactos familiares de los pacientes con TBC ($40,68 \pm 16,20$ años, 70,92% mujeres). En base a la prueba cutánea de la tuberculina (TST), 73 de estos contactos estaban infectados con *M. tuberculosis*, mientras que 69 de ellos no lo estaban. El TST se realizó mediante la prueba de Mantoux, usando 2 UT (unidades de tuberculina) de RT-23 (Staten Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca), siendo medidos los diámetros de induración 48 horas después. Los sujetos se clasificaron como tuberculín-positivos si tenían una induración mayor de 5 mm. Ni los pacientes ni los contactos familiares habían sido vacunados previamente con el bacilo de Calmette-Guérin.

Tabla VI.1. Características clínicas de los pacientes con VIH.

Características clínicas	Frecuencia ^a	Individuos total ^b
Edad media	38,84	613
Vía de transmisión		
Sexual	364 (59,17)	615
ADVP	133 (21,63)	615
Sexual y ADVP^c	64 (10,41)	615
Hemofilia/transfusión	23 (3,74)	615
Hijo de madre VIH⁺	7 (1,14)	615
Accidente sanitario	1 (0,16)	615
Desconocida	23 (3,74)	615
Tuberculosis	106 (20,38)	520
Mantoux positivo	74 (20,05)	369

^a Los valores son el número (%), excepto para la edad, que es la media en años.

^b Número de individuos con dato válido para la característica analizada.

^c ADVP: adicción a drogas por vía parenteral.

Análisis genético.

La extracción del ADN así como el genotipaje se realizaron tal como se describe en el capítulo III.

Análisis estadístico.

Para comparar la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* para dos grupos, se empleó la prueba de Chi-cuadrado, o el test exacto de Fisher cuando fue necesario. El riesgo de enfermedad asociado con los genotipos *MBL2* como factor genético se estimó usando el cálculo del *odds ratio* (OR) con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

Se emplearon los test de Kruskal-Wallis o Mann-Whitney para comparar las diferencias de medias de la edad al diagnóstico de la infección por VIH en relación con los genotipos *MBL2*.

(Para una descripción más detallada del análisis estadístico ver el apartado 6 del capítulo III).

RESULTADOS

Distribución de los polimorfismos del gen *MBL2* en controles sanos y pacientes con VIH.

No se encontraron diferencias significativas al comparar las frecuencias de los genotipos estructurales entre los pacientes con VIH y los controles (tabla VI.2). Tampoco al tener en cuenta los polimorfismos del promotor, donde observamos un aumento no significativo de los genotipos insuficientemente productores (*XA/O* + *O/O*) en los controles respecto a los pacientes con VIH (17,12% vs. 13,66% respectivamente; $p = 0,095$, OR = 0,77, IC 95% 0,56-1,04) (tabla VI.2). Las frecuencias genotípicas se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos grupos.

Para averiguar si un aumento en la mortalidad asociado a los genotipos *XA/O* y *O/O* podría relacionarse con las bajas frecuencias de estos genotipos observadas en nuestra población con VIH, analizamos sólo aquellos 173 pacientes con VIH diagnosticados durante el período del estudio. No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas ni genotípicas entre los controles y estos 173 pacientes con VIH.

Para excluir un sesgo debido a las prácticas de riesgo para la transmisión del VIH, los pacientes con VIH fueron agrupados y comparados en base a dichas prácticas. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos.

Tabla VI.2. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* entre 615 pacientes con VIH y 730 individuos de población control.

Alelos y genotipos <i>MBL2</i>	Controles	VIH
Alelos estructurales		
A total	1.089 (74,59)	938 (76,26)
O total	371 (25,41)	292 (23,74)
Genotipos		
A/A total	407 (55,75)	352 (57,24)
YA/YA	232 (31,78)	201 (32,68)
XA/YA	153 (20,96)	127 (20,65)
XA/XA	22 (3,01)	24 (3,90)
A/O total	275 (37,67)	234 (38,05)
YA/O	198 (27,12)	179 (29,11)
XA/O	77 (10,55)	55 (8,94)
O/O total	48 (6,58)	29 (4,72)
A/O + O/O	323 (44,25)	263 (42,76)
A/A + YA/O	605 (82,88)	531 (86,34)
XA/O + O/O	125 (17,12)	84 (13,66)

Los valores son el número de individuos (%).

A designa el alelo salvaje y O designa los alelos mutados B, C y D.

Ninguna de las comparaciones mostró diferencias estadísticamente significativas.

Rangos de edad al diagnóstico y mortalidad de los pacientes con VIH respecto al genotipo de *MBL2*.

La edad media al diagnóstico de infección por el VIH fue significativamente mayor en relación a los alelos A que a los O ($33,04 \pm 11,53$ años vs. $30,76 \pm 10,75$ respectivamente, $p = 0,034$) (figura VI.1A). Lo mismo se observó en pacientes con genotipos A/A respecto a aquellos con genotipos A/O o O/O ($34,4 \pm 11,7$ años vs. $31,5 \pm 10,5$ respectivamente; $p = 0,022$) (figura VI.1A). Además, se observó una tendencia no significativa hacia una menor edad media al diagnóstico de la enfermedad en relación al número de alelos no productores presentes: edad media de $34,4 \pm 11,7$ años para los genotipos A/A, $31,6 \pm 10,3$ años para los genotipos A/O, y $30,9 \pm 11,9$ años para los genotipos O/O ($p = 0,071$), aunque la diferencia entre los genotipos A/A y A/O sí fue significativa ($p = 0,030$) (figura VI.1B). De igual modo, la diferencia observada entre los genotipos A/A + YA/O y XA/O + O/O no fue significativa ($32,74 \pm 11,52$ vs. $31,01 \pm 10,47$ respectivamente) (figura VI.1C).

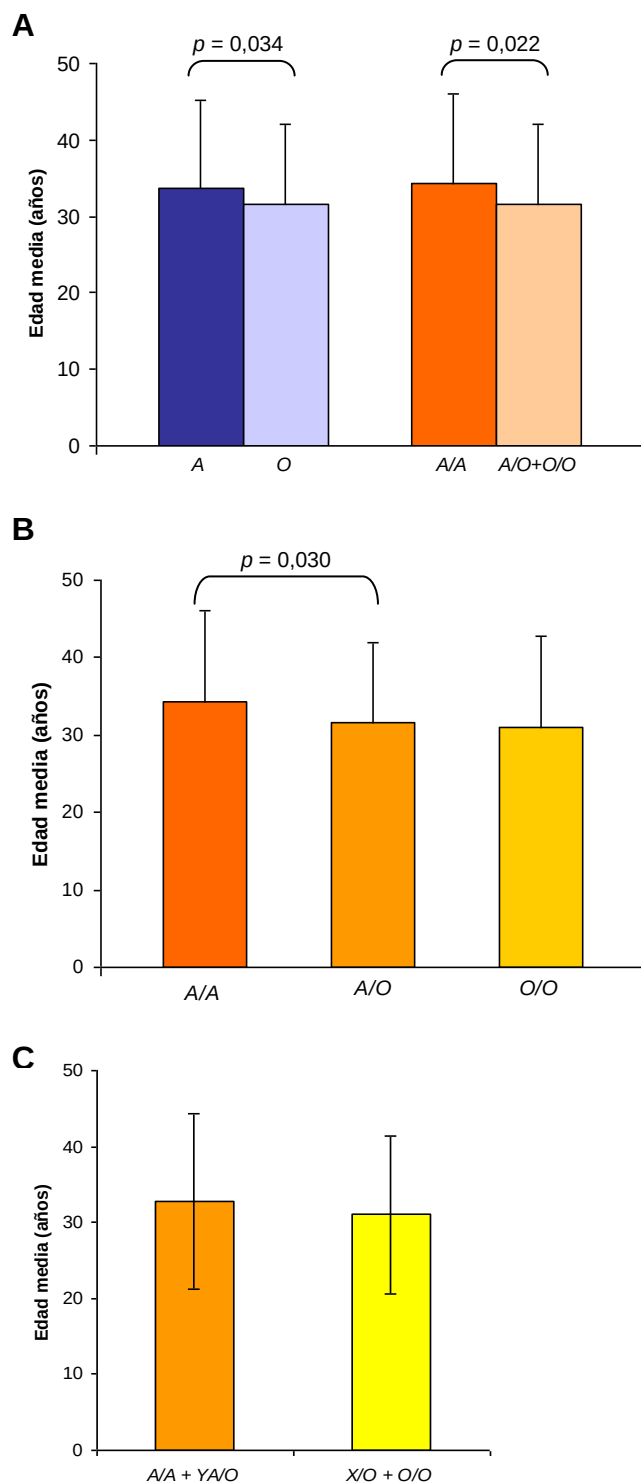


Figura VI.1. Edades medias al diagnóstico de VIH en función de los alelos y genotipos del gen *MBL2*.

Cuando evaluamos el riesgo de muerte observamos que 18 (5,1%) pacientes de los 352 con genotipo A/A, 8 (4,5%) de los 179 pacientes YA/O, y 1 (1,2%) de los 84 pacientes con genotipo XA/O o O/O, murieron entre 1998 y 2004. Estas diferencias no

alcanzaron significación estadística. Hallazgos similares se observaron al analizar sólo los 7 pacientes fallecidos que habían sido diagnosticados después de 1998: 6 (6,1%) de los 98 pacientes *A/A*, 1 (1,9%) de los 54 pacientes con genotipos *YA/O* y ninguno de los 21 pacientes con genotipo *XA/O* o *O/O*.

Polimorfismos del gen *MBL2* y susceptibilidad a TBC en pacientes con VIH.

Cuando se tuvo en cuenta la TBC en los pacientes con VIH y se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* entre los tres grupos de individuos (controles, pacientes VIH-TBC y pacientes VIH no TBC), encontramos que la distribución general de la frecuencia de los alelos *O* no difería significativamente ($\chi^2 = 4,97$, 2 grados de libertad; $p = 0,083$), como tampoco lo hacía la frecuencia de los genotipos *XA/O* + *O/O* ($\chi^2 = 3,85$, 2 grados de libertad; $p = 0,146$) (tabla VI.3). Por otra parte, el análisis de los alelos *O* entre los grupos mostró una frecuencia menor de estos alelos en pacientes VIH-TBC en comparación con controles ($p = 0,033$, OR = 0,66, IC 95% 0,45-0,96), así como con pacientes VIH no TBC, aunque esta última diferencia no alcanzó significación estadística ($p = 0,054$, OR = 0,68, 95% IC 0,45-1,01). Los pacientes VIH-TBC también presentaron frecuencias menores, aunque no significativamente, de genotipos *XA/O* + *O/O* que los controles ($p = 0,106$). El porcentaje de individuos con genotipos insuficientes también fue menor en pacientes VIH-TBC que en los pacientes VIH no TBC, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística. Además, se encontró una menor frecuencia, de nuevo no significativa, de genotipos portadores de al menos un alelo *O* (*A/O* + *O/O*) en pacientes VIH-TBC que en los VIH no TBC ($p = 0,066$, OR = 0,64, IC 95% 0,40-1,03) y en los controles ($p = 0,058$, OR = 0,65, IC 95% 0,41-1,01).

Polimorfismos del gen *MBL2* y susceptibilidad a TBC en pacientes sin VIH.

En un grupo de 127 pacientes con TBC negativos para el VIH observamos una frecuencia menor de alelos *O*, así como de genotipos bajo o nulo productores, que en el grupo de controles, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística (tabla VI.4). Las frecuencias genotípicas se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos grupos.

Tabla VI.3. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* entre pacientes con VIH con y sin tuberculosis (VIH-TBC y VIH no TBC respectivamente) y población control. **A**, frecuencias alélicas y genotípicas observadas del gen *MBL2*. **B**, análisis estadístico de las principales diferencias de las frecuencias alélicas y genotípicas entre los distintos grupos de **A**.

A.

Alelos y genotipos <i>MBL2</i>	Controles (N = 730)	VIH-TBC (N = 106)	VIH no TBC (N = 414)
Alelos estructurales			
A total	1.089 (74,59)	173 (81,60)	621 (75,00)
O total	371 (25,41)	39 (18,40)	207 (25,00)
Genotipos			
A/A total	407 (55,75)	70 (66,04)	230 (55,56)
YA/YA	232 (31,78)	39 (36,79)	137 (33,09)
XA/YA	153 (20,96)	23 (21,70)	79 (19,08)
XA/XA	22 (3,01)	8 (7,55)	14 (3,38)
A/O total	275 (37,67)	33 (31,13)	161 (38,89)
YA/O	198 (27,12)	25 (23,58)	124 (29,95)
XA/O	77 (10,55)	8 (7,55)	37 (8,94)
O/O total	48 (6,58)	3 (2,83)	23 (5,56)
A/O + O/O	323 (44,25)	36 (33,96)	184 (44,44)
A/A + YA/O	605 (82,88)	95 (89,62)	354 (85,51)
XA/O + O/O	125 (17,12)	11 (10,38)	60 (14,49)

B.

	p OR (IC 95%)		
	alelos O	genotipos A/O + O/O	genotipos X/O + O/O
Controles vs. VIH no TBC vs. VIH-TBC	0,083 4,97	0,120 4,24	0,146 3,85
VIH no TBC vs. VIH-TBC	0,054 0,68 (0,45-1,00)	0,066 0,64 (0,40-1,03)	0,346 0,68 (0,31-1,38)
Controles vs. VIH-TBC	0,033 0,66 (0,45-0,96)	0,058 0,65 (0,41-1,01)	0,106 0,56 (0,26-1,09)
Controles vs. VIH no TBC	0,867 0,98 (0,80-1,20)	0,998 1,01 (0,78-1,29)	0,281 0,82 (0,58-1,16)

Los valores son el número de cromosomas (%) para los alelos, y el número de individuos (%) para los genotipos.

A designa el alelo salvaje y O designa los alelos mutados B, C y D.

Tabla VI.4. Frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* en 127 pacientes con tuberculosis (negativos para el VIH) y 730 individuos de población control.

Alelos y genotipos <i>MBL2</i>	Controles	TBC
Alelos estructurales		
A total	1.089 (74,59)	194 (76,38)
O total	371 (25,41)	60 (23,62)
Genotipos		
A/A total	407 (55,75)	74 (58,27)
YA/YA	232 (31,78)	41 (32,28)
XA/YA	153 (20,96)	25 (19,69)
XA/XA	22 (3,01)	8 (6,30)
A/O total	275 (37,67)	46 (36,22)
YA/O	198 (27,12)	34 (26,77)
XA/O	77 (10,55)	12 (9,45)
O/O total	48 (6,58)	7 (5,51)
A/O + O/O	323 (44,25)	53 (41,73)
A/A + YA/O	605 (82,88)	108 (85,04)
XA/O + O/O	125 (17,12)	19 (14,96)

Los valores son el número de cromosomas (%) para los alelos, y el número de individuos (%) para los genotipos.

A designa el alelo salvaje y O designa los alelos mutados B, C y D.

Además, analizamos un grupo de 142 contactos familiares de estos pacientes con TBC. No encontramos ninguna diferencia significativa entre los contactos y los pacientes con TBC, ni con el grupo control, así como tampoco cuando realizamos la comparación separando el grupo de contactos en infectados (73 individuos) y no infectados (69 individuos) en base a la prueba cutánea de la tuberculina.

DISCUSIÓN

El presente estudio aporta evidencias de que los alelos y genotipos de producción insuficiente de MBL no son un factor de riesgo para la infección por el VIH en nuestra población. Por el contrario, nuestros datos de 615 pacientes españoles infectados por el VIH atendidos en nuestro hospital entre 1998 y 2002, muestran incluso una mayor frecuencia de los genotipos de producción insuficiente de MBL en el grupo control que en el de pacientes con VIH, si bien esta diferencia no es significativa.

Los datos previos sobre la influencia de la MBL en la susceptibilidad a infección por VIH y la progresión de la enfermedad son controvertidos. Se ha demostrado en

estudios *in vitro* que la MBL puede unirse de manera eficiente a la glicoproteína gp-120 de la envoltura del VIH-1 (Ezekowitz RA *et al*, 1989). Esta observación ha llevado a sugerir que los niveles séricos bajos podrían resultar en una susceptibilidad aumentada de la infección por VIH. Además, se ha mostrado que la MBL podría inhibir la infección por VIH de las células T mediada por DC-SIGN, una lectina de unión a manosa presente en células dendríticas que actúa en el reconocimiento e internalización de los patógenos (Ji X *et al*, 2005).

Sin embargo, el papel del complemento en la infección del VIH es complejo. El complemento puede inducir virolisis del VIH *in vitro*, aunque su eficacia *in vivo* no está clara (Sullivan BL *et al*, 1996; Stoiber H *et al*, 2001). En contraste, la infectividad del VIH *in vitro* puede ser aumentada por la opsonización mediada por complemento. En este sentido, se ha visto que el VIH es relativamente resistente *in vitro* a la neutralización por los niveles de MBL presentes normalmente en suero, mientras que la MBL opsoniza al VIH eficientemente para su captación por las células monocíticas (Ying H *et al*, 2004). Es posible que la activación del complemento sea más relevante a determinadas concentraciones del virus, o en distintos estados del ciclo de vida del VIH o de la enfermedad (Stoiber H *et al*, 1997). Así, el efecto general del complemento en la infección por el VIH puede ser un equilibrio entre un efecto positivo y negativo para el hospedador, el cual puede variar entre distintos individuos y poblaciones dependiendo de factores ambientales particulares y variaciones alélicas en otros genes implicados en la respuesta inmunológica (Ezekowitz RA, 2003). Estas diferencias podrían explicar parcialmente la disparidad de resultados obtenidos hasta la fecha. También es posible que algunos estudios poblacionales no tengan el suficiente poder estadístico para detectar el impacto o no de la deficiencia de MBL en la infección por el VIH.

Otro dato interesante son las menores edades al diagnóstico de VIH encontradas en nuestro estudio en asociación con los alelos y genotipos variantes de *MBL2*. Estos resultados parecen apoyar un papel de la deficiencia de MBL en la infección por el VIH. Sin embargo, también podrían estar reflejando un aumento de susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas que llevan a un diagnóstico temprano de la infección por el VIH en pacientes deficientes de MBL (Garred P *et al*, 1997; Hundt M *et al*, 2000). La deficiencia de MBL no se asoció con mortalidad aumentada en nuestros pacientes con VIH.

También hemos analizado el papel de los polimorfismos del gen *MBL2* en la susceptibilidad a TBC. La MBL reconoce residuos de manosa sobre la superficie de las

micobacterias (Polotsky VY *et al*, 1997). Mediante la unión a receptores sobre la superficie de los fagocitos y la generación de opsoninas derivadas de complemento (Petersen SV *et al*, 2001), la MBL puede ayudar a la micobacteria a invadir la célula hospedadora (Garred P *et al*, 1994; Polotsky VY *et al*, 1997). Para averiguar si los polimorfismos de *MBL2* juegan un papel en la susceptibilidad a TBC, realizamos dos estudios. Primero, al comparar los pacientes VIH-TBC frente a controles y a pacientes VIH sin TBC, observamos un descenso no significativo de aquellos genotipos que portaban al menos un alelo O (genotipos *XA/O*, *YA/O* y *O/O*) en el grupo VIH-TBC. Segundo, en nuestro estudio de 127 pacientes españoles con TBC sin VIH, la disminución que observamos de genotipos insuficientes (*XA/O* + *O/O*) en comparación a los controles no fue significativa. Las diferencias observadas entre ambos estudios pueden estar relacionadas con el hecho de que el riesgo de TBC está muy incrementado cuando hay infección por VIH (Davies PD y Grange JM, 2001). Así, los factores de riesgo para el desarrollo de TBC pueden hacerse más significativos en pacientes infectados por VIH. Diversos autores apoyan que la predisposición a infección asociada al defecto de MBL, se hace más evidente en el contexto de otro defecto inmunológico, ya sea por una inmunodeficiencia primaria, o secundaria (como es el caso del SIDA), o durante el periodo de vulnerabilidad en la infancia temprana, o bien en individuos inmunocomprometidos por quimioterapia. Lo mismo podría suceder para el caso de un mayor riesgo de TBC asociado, no a genotipos insuficientes de MBL, sino a genotipos suficientes.

Nuestros hallazgos están de acuerdo con estudios previos en pacientes con TBC (Garred P *et al*, 1997b; Bellamy R *et al*, 1998; Soborg C *et al*, 2007). Por el contrario, un estudio ha señalado que los homocigotos mutados están asociados a una mayor susceptibilidad a TBC pulmonar en la India (Selvaraj P *et al*, 1999). Un estudio en 59 pacientes blancos de Dinamarca con TBC (Soborg C *et al*, 2003) ha observado que los genotipos de baja producción *XA/O*, pero no otros genotipos, se asocian con protección frente a TBC clínica. Se pueden proponer muchas causas para estas discrepancias entre nuestro estudio y este, el otro único estudio llevado a cabo en población europea. En primer lugar, se ha sugerido durante mucho tiempo que múltiples factores ambientales y genéticos del hospedador, así como las interacciones de estos factores, están relacionados con la infección micobacteriana, así como con la progresión desde enfermedad latente a TBC (Bellamy R *et al*, 2000; Davies PD y Grange JM, 2001; Lienhardt C *et al*, 2003). Además, se ha visto que la asociación entre polimorfismos genéticos y la susceptibilidad

a TBC puede diferir en función del origen étnico (Delgado JC *et al*, 2002). En segundo lugar, las diferencias en las consecuencias clínicas y epidemiológicas de la infección con *M. tuberculosis* también están relacionadas con la variabilidad genética de la bacteria (Kato-Maeda M *et al*, 2001; Lopez B *et al*, 2003). Diferencias dependientes de la cepa en los oligosacáridos de superficie entre cepas prevalentes de *M. tuberculosis* en distintas poblaciones pueden conducir a diferencias en los niveles óptimos de MBL asociados con protección contra TBC (Schlesinger LS, 1993; Cywes C *et al*, 1997). En este sentido, una cepa del genotipo Beijing, más virulenta y con mayor transmisibilidad que otras cepas de *M. tuberculosis*, fue introducida en nuestra población hace unos 15 años, convirtiéndose en el genotipo más común en la isla (Caminero JA *et al*, 2001; Pena MJ *et al*, 2003).

Los factores genéticos contribuyen no sólo a la susceptibilidad a la enfermedad, sino también a diferencias en la susceptibilidad del hospedador a la infección (Lienhardt C *et al*, 2003). Nosotros analizamos los polimorfismos del gen *MBL2* en contactos familiares de nuestros pacientes con TBC sin VIH. Ni los contactos infectados (positividad para el TST) ni los no infectados (TST negativo) mostraron diferencias significativas en comparación con los controles o el grupo de pacientes con TBC, sugiriendo que la MBL no se asocia con la protección frente a la transmisión directa, aunque serían necesarios estudios más amplios para corroborar este resultado.

La isla de Gran Canaria es una comunidad reciente, con una migración de población relativamente restringida, y con una de las mayores incidencias de TBC de la Europa occidental (Caminero JA *et al*, 2001b; Pena MJ *et al*, 2003) y una de las mayores frecuencias de los alelos O del gen *MBL2* de las poblaciones euroasiáticas descritas hasta el momento. De manera similar a la selección equilibrada observada para la anemia falciforme y su correlación positiva con la incidencia de malaria (Haldane JBS, 1949), los polimorfismos del gen *MBL2* podrían haber sido mantenidos en una frecuencia elevada por un equilibrio de fuerzas selectivas positivas y negativas. Las enfermedades infecciosas han sido las principales fuerzas selectivas que han afectado a la selección natural durante los pasados 5.000 años (Haldane JBS, 1949). La deficiencia de MBL predispone, de una manera no mendeliana, a infecciones recurrentes en la infancia (Petersen SV *et al*, 2001; Casanova JL y Abel J, 2004). La frecuencia elevada de alelos variantes de *MBL2* encontrada en la mayoría de las poblaciones, principalmente en poblaciones subsaharianas, podría entonces ser sorprendente, porque las infecciones son una causa frecuente de muerte prematura en África, como ocurrió también en Europa en la época pre-antibiótica. Por otro lado, la actual pandemia de TBC probablemente se

originó en Europa hace 200 años, causando una elevada proporción de muertes (Wright AF *et al*, 1999). Por lo tanto, esperaríamos que el *M. tuberculosis* hubiera ejercido una presión selectiva favoreciendo aquellos polimorfismos genéticos que confieren resistencia contra la infección o la enfermedad activa. Así, a pesar de su efecto negativo en la susceptibilidad a la infección, los alelos deficientes de MBL se habrían seleccionado en distintas poblaciones como consecuencia de su ventaja selectiva frente a patógenos intracelulares, como el *M. tuberculosis*. Sin embargo, los resultados del presente estudio no arrojan demasiada luz a este respecto.

Los genes de infección y susceptibilidad pueden ser tan numerosos, y sus interacciones tan variadas y dependientes del contexto (patógeno y ambiente) que puede ser que haya un grupo de alelos de susceptibilidad a enfermedad para cada población (Wright AF *et al*, 1999). Esto puede hacer a cada gen contribuyente más difícil de identificar, y hacer esenciales estudios mayores en distintas poblaciones. Nuestro estudio, realizado en el mayor grupo de pacientes con VIH hasta la fecha para polimorfismos del gen *MBL2*, indica que la insuficiencia de MBL no es un factor de riesgo frente a la infección por VIH en nuestra población. Por otra parte, los genotipos de MBL insuficientes parecen ser un factor débil de protección frente a TBC, pero sólo cuando otros factores para predisposición a TBC, como la infección por VIH, están presentes. Estos resultados no respaldan rotundamente la teoría de selección equilibrada para el caso de la MBL, pero sí apoyan que el defecto de esta proteína pueda jugar un papel en individuos inmunocomprometidos. Queda así bierta la posibilidad de un papel menor del gen en la susceptibilidad a la TBC, de modo dicho que papel sólo es detectable cuando concurre otro factor (como la infección por VIH, en este caso).

Las diferencias observadas en el presente estudio respecto a nuestro estudio previo (García-Laorden MI *et al*, 2006), se deben a dos cuestiones. La primera es el aumento del tamaño de la población de controles. La segunda es el empleo en la publicación del año 2006 de valores de p sin corrección (χ^2 de Pearson), una práctica relativamente habitual, y que se hacía constar con toda claridad en el correspondiente apartado de materiales y métodos. Ambas modificaciones en el presente estudio le aportan una mayor representabilidad y robustez a los resultados obtenidos.

ANEXO VI.1. Publicaciones más relevantes sobre la asociación entre polimorfismos del gen *MBL2* y el VIH y la tuberculosis (TBC).

Autor, año	Población	Nº pacientes	Características	Hallazgos
Nielsen SL <i>et al</i> , 1995	Danese	80	VIH	No asociación de los niveles de MBL con infección por VIH ni progresión de SIDA.
Garred P <i>et al</i> , 1997	Danese	96	VIH. Hombres homosexuales	Mayor porcentaje de O/O en VIH+ que en controles. Supervivencia menor tras diagnóstico de SIDA de los A/O+O/O.
Garred P <i>et al</i> , 1997b	Tanzania	173 VIH 94 TBC	VIH con (150) y sin TBC. TBC	Mayor porcentaje de defecto de MBL en VIH+ que en controles; no diferencia TBC sin VIH vs. controles. Mayores niveles en TBC sin VIH que en VIH y controles.
Prohaszka Z <i>et al</i> , 1997	No indicado (Húngara)	67	VIH	Menor concentración MBL en VIH+ que en controles.
Pastinen T <i>et al</i> , 1998	Finlandesa	> 300 casos + controles	VIH	Mayor porcentaje de O/O en VIH+ que en controles.
Maas J <i>et al</i> , 1998	No indicado (Holanda)	131	VIH. Hombres homosexuales	No significativo.
McBride MO <i>et al</i> , 1998	Inglesa	138	VIH. 12% no caucásicos	No asociación de concentración ni genotipos con progresión de la enfermedad. Mayor tasa de infección bacteriana en A/A.
Amoroso A <i>et al</i> , 1999	No indicado (Italiana)	52	VIH. Niños (transmisión vertical)	Asociación del alelo B con progresión rápida a SIDA.
Boniotto M <i>et al</i> , 2000	Italiana	90	VIH. Niños (transmisión vertical)	Papel del polimorfismo H/L en el riesgo de infección por VIH y la progresión a SIDA.
Malik S <i>et al</i> , 2003	Colombiana	138	VIH	No asociación del defecto de MBL con susceptibilidad a VIH.
Mombo LE <i>et al</i> , 2003	Africana subsahariana	188 VIH 626 TBC	VIH. TBC	Correlación entre prevalencia de alelos O e incidencia TBC. Asociación del alelo C con susceptibilidad a VIH.
Boniotto M <i>et al</i> , 2003	Brasileña	114	VIH. Niños. Mezcla étnica.	Mayor frecuencia de O en VIH+ que en controles. Mayor frecuencia de A/A en controles.
Lian YC <i>et al</i> , 2004	Brasileña	127	VIH Niños (transmisión vertical)	La MBL no es un factor de riesgo de infección por VIH.
Vallinoto ACR <i>et al</i> , 2005	Brasileña	145	VIH	B/B es más frecuente en VIH+ que en controles y A/D es el más frecuente en controles.
Bellamy R <i>et al</i> , 1998	Gambia	397	TBC	Asociación débil entre el alelo C y la resistencia a TBC
Hoal-Van Helden EG <i>et al</i> , 1999	Sudafricana	91+64	TBC	Disminución del alelo B en TBC pulmonar y meningitis tuberculosa. Menor concentración de MBL en controles.
Selvaraj P <i>et al</i> , 2000	Indú	202	TBC	Mayor porcentaje de O/O en TBC pulmonar que en controles.
Soborg C <i>et al</i> , 2003	Residentes en Dinamarca	109	TBC. Blancos y no blancos	Menor frecuencia de genotipos MBL de baja producción en blancos con TBC.
El Sahli HM <i>et al</i> , 2004	Estadounidense	487	TBC. De 3 orígenes étnicos	Mayor frecuencia de alelo B en afroamericanos con TBC.
Soborg C <i>et al</i> , 2007	Tanzania	443	TBC	No asociación de polimorfismos estructurales de MBL con TBC.
Alagarasu K <i>et al</i> , 2007	Indú	151 VIH, 109 VIH y TBC, 148 TBC, 146 controles	VIH. TBC. VIH con TBC	Mayor frecuencia de O/O en TBC no VIH que en controles. Mayor porcentaje de YA/YA en VIH con TBC que en controles. Menor frecuencia de X/X e YA/YO en VIH con TBC que en controles y que en VIH no TBC.

CAPÍTULO VII

RELEVANCIA DE LA LECTINA DE UNIÓN A MANOSA (MBL) EN LA SUSCEPTIBILIDAD, SEVERIDAD Y PRONÓSTICO DE LA NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

RELEVANCIA DE LA LECTINA DE UNIÓN A MANOSA (MBL) EN LA SUSCEPTIBILIDAD, SEVERIDAD Y PRONÓSTICO DE LA NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

RESUMEN.

Antecedentes. La NAC es la causa principal de muerte por infección en los países desarrollados. La MBL media la fagocitosis y activa la VL de activación del sistema del complemento. Su defecto es una inmunodeficiencia primaria común cuya penetrancia clínica genera controversia.

Objetivos. Determinar si los polimorfismos del gen *MBL2* se asocian con la susceptibilidad a padecer NAC en población española, así como a una mayor gravedad y un peor pronóstico de la enfermedad.

Materiales y métodos. Hemos analizado polimorfismos estructurales y de promotor del gen *MBL2* en 848 pacientes con NAC, así como en 1.447 controles sanos y un grupo control de 519 pacientes sin enfermedades infecciosas relevantes. La gravedad y el pronóstico fueron evaluados en un estudio prospectivo de los 848 pacientes.

Resultados. Encontramos frecuencias similares de los alelos y genotipos del gen *MBL2* en pacientes y controles. Sin embargo, tanto en análisis bivalente como multivariante, la insuficiencia de MBL se asoció significativamente con el desarrollo de las formas más severas de sepsis, fallo respiratorio agudo, disfunción multiorgánica, ingreso en la unidad de cuidados intensivos y muerte.

Conclusiones. Nuestro amplio estudio sugiere que la MBL juega un papel redundante en las defensas humanas frente a la infección primaria en adultos con NAC, pero proporciona, por primera vez, evidencias de que la insuficiencia de MBL predispone a una mayor gravedad y un peor desenlace de la NAC, independientemente de los microorganismos causantes.

INTRODUCCIÓN

La NAC sigue siendo la causa principal de muerte por enfermedad infecciosa en los países desarrollados. La incidencia de NAC es mayor en aquellos pacientes menores de cinco años de edad y en la vejez (Mandell LA *et al*, 2007). Muchos microorganismos pueden ser el agente causante de la NAC, siendo el *S. pneumoniae* la causa más común (Mandell LA *et al*, 2007). La severidad de la NAC varía ampliamente, desde un proceso leve y autolimitado hasta el shock séptico (ShS), el fallo multiorgánico (FMO), e incluso la muerte y, a pesar de los efectivos tratamientos antimicrobianos existentes, la tasa de mortalidad en los pacientes hospitalizados oscila entre el 2 y el 30% (Liu J *et al*, 2005). La presentación clínica de la NAC, así como su evolución, son el resultado de una interacción compleja entre los distintos factores relacionados, tanto con el microorganismo causante de la enfermedad, como con la intervención terapéutica y con factores dependientes del hospedador. Las variables relacionadas con el patógeno y con la adecuación de la intervención terapéutica han sido ampliamente estudiadas, y pueden explicar en parte la heterogeneidad que existe tanto en la predisposición a la infección como en la posterior respuesta frente a ella. Por otra parte, la variabilidad genética que afecta a la respuesta del hospedador, también puede influir en la susceptibilidad a la infección, así como en la gravedad y el pronóstico de ésta.

Estudios epidemiológicos han sugerido que el defecto de MBL es un factor débil de susceptibilidad para enfermedades infecciosas, estando su papel aún en debate (Yang IA *et al*, 2003; Garred P *et al*, 2003; Nuytinck L y Shapiro F, 2004; Casanova JL y Abel J, 2004).

En el presente estudio hemos analizado el significado de la variabilidad del gen *MBL2* en la susceptibilidad a y en la gravedad y progresión de la NAC en un amplio grupo de adultos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y controles.

Se estudiaron de manera prospectiva 848 pacientes españoles con NAC hospitalizados en tres hospitales españoles (Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín”, Hospital Universitario de la Princesa (Madrid) y Hospital Clínico Universitario de Valencia). La edad media de los pacientes fue de $65,11 \pm 17,54$ años, siendo la proporción de hombres y mujeres 65,6 / 34,4%.

El diagnóstico de neumonía se basó en la presencia de signos y síntomas sugerentes de infección de vías aéreas inferiores en el ingreso, junto con la aparición de evidencia radiológica de infiltrado pulmonar nuevo que carece de otra causa conocida. Pacientes con inmunosupresión grave definida, como inmunodeficiencias primarias clásicas, neutropenia grave, infección por el VIH, trasplante de médula ósea o de órgano sólido, o tratado con inmunosupresores, y pacientes con TBC, neumonía obstructiva causada por neoplasia o neumonía como evento terminal de enfermedad crónica y progresiva, fueron excluidos del estudio.

Quinientos diecinueve pacientes españoles procedentes de los mismos hospitales, sin historia previa o presente de enfermedad infecciosa relevante, no relacionados entre sí, y apareados por edad ($61,41 \pm 14,12$ años) y sexo (171 mujeres, 32,95%) sirvieron como grupo control (denominados “controles pacientes”). Además, se empleó un grupo control sano de 1.447 individuos voluntarios sanos no relacionados ($40,30 \pm 14,72$ años, 51,2% mujeres) (formado por los grupos de población de Gran Canaria, Madrid y Valencia descritos en el apartado 1 del capítulo III).

Sepsis, sepsis grave (SG), ShS y FMO se definieron usando los criterios del “*American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*” (Bone RC *et al*, 1992). El índice de gravedad de la neumonía (IGN) se midió mediante la escala de Fine (Fine MJ *et al*, 1997). El fallo respiratorio agudo se definió como una saturación de oxígeno menor del 90% en aire ambiente, o una PaO_2 menor de 60 mmHg. El síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) se definió usando los criterios de la “*American European Consensus Conference Definition*” (Bernard GR *et al*, 1994).

Análisis genético.

La extracción del ADN así como el genotipaje se realizaron tal como se describe en el capítulo III.

Análisis estadístico.

Las comparaciones de la distribución de los genotipos *MBL2* en función de la susceptibilidad, gravedad y progresión o resultado final, se realizaron mediante el test de Chi-cuadrado, o el test exacto de Fisher cuando fue necesario, calculándose los OR con un IC del 95%. La relación entre la gravedad o el pronóstico y los genotipos se evaluó también mediante modelos de regresión logística binarios, incluyéndose la edad, el sexo, el hospital de origen y las comorbilidades como variables independientes. El agente

etiológico de la NAC se incluyó como variable independiente en algunos análisis. Las tasas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier, y su comparación en relación a los genotipos se realizó con un test de long-rank. El análisis multivariante de la supervivencia ajustando por edad, sexo, hospital de origen y comorbilidades se realizó con el modelo de riesgo proporcional de Cox.

(Para una descripción más detallada del análisis estadístico ver el apartado 6 del capítulo III).

RESULTADOS

Entre enero de 2002 y marzo de 2006 los pacientes ingresados en los tres hospitales fueron evaluados para el diagnóstico de NAC. Tras excluir a aquellos pacientes sin consentimiento informado, con etnicidad distinta a la española, y aquellos que cumplían alguno de los criterios de exclusión, un total de 848 pacientes fueron finalmente incluidos en el estudio. Las principales variables demográficas y clínicas se muestran en la tabla VII.1. El principal agente etiológico aislado fue el *S. pneumoniae* (195, 22,99% del total de pacientes; 58,73% de los pacientes con microorganismo conocido). *Pseudomonas aeruginosa* fue aislada en 24 pacientes (7,23%), *Legionella pneumophila* en 16 (4,82 %), *Haemophilus influenzae* en 16 (4,82%), *Chlamydia pneumoniae* en 12 (3,61 %) e infección viral en 9 (2,71%) (% calculados sobre el total de individuos con microorganismo causal conocido). Otros microorganismos fueron identificados en 60 pacientes (18,07% de los pacientes infectados).

El 95% de los pacientes recibieron tratamiento antibiótico inicial de acuerdo a las guías de la “*American Thoracic Society*” (ATS) (Niederman MS *et al*, 2001). No se observaron diferencias en el uso antibiótico de acuerdo a dichas recomendaciones al estratificar los pacientes en base a la gravedad ni al pronóstico: SG y ShS 92,6% y 93,8% respectivamente, fallo respiratorio agudo 95,1%, SDRA 97,3% y mortalidad a los 90 días 97%.

Tabla VII.1. Características clínicas y demográficas de los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad.

Características ^a	N (%)
Edad (848)	65,16 ± 17,55 ^b
Sexo (848)	
Hombres	556 (65,57)
Mujeres	292 (34,43)
Ingreso en UCI (848)	
No	661 (77,95)
Sí	187 (22,05)
Sepsis (848)	
No-sepsis grave	593 (69,93)
Sepsis grave	137 (16,16)
Shock séptico	118 (13,92)
FMO (848)	
No	761 (89,74)
Sí	87 (10,26)
Insuficiencia respiratoria aguda (848)	
No	247 (29,13)
Sí	601 (70,87)
SDRA (848)	
No	809 (95,40)
Sí	39 (4,60)
Bacteriemia (848)	
No	783 (92,31)
Sí	65 (7,69)
Exitus a 90 días (848)	
No	776 (91,51)
Sí	72 (8,49)
Comorbilidad (844) ^c	
No	250 (29,62)
EPOC	249 (29,50)
Asma	49 (5,81)
Neoplasia	95 (11,26)
Cardiopatía isquémica	97 (11,49)
Diabetes	198 (23,46)
Insuficiencia renal	68 (8,06)
Insuficiencia hepática	55 (6,52)
Patología neurológica	135 (16,00)
Patología autoinmune	19 (2,25)
Patología psiquiátrica	6 (0,71)
IGN (822)	
I-III (bajo)	337 (41,00)
IV-V (moderado-alto)	485 (59,00)
Agente etiológico identificado (848)	
No	516 (60,85)
Sí	332 (39,15)

^aEntre paréntesis el número de pacientes con dato disponible.^bPara la edad el valor es la media ± la desviación estándar.^cAlgunos pacientes tenían más de una comorbilidad.

UCI: unidad de cuidados intensivos. No sepsis severa: pacientes sin sepsis grave ni shock séptico; FMO: Fallo multiorgánico; SDRA: Síndrome de distrés respiratorio agudo; EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. IGN: Índice de Gravedad de la Neumonía.

Para evaluar el impacto de la MBL en la susceptibilidad a la NAC, los genotipos del gen *MBL2* fueron comparados entre el grupo de pacientes y los dos grupos controles. Cuando se analizaron los alelos salvaje (A) y mutado (O) del exón 1 del gen, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas ni genotípicas (tabla VII.2). Se constató una asociación débil al comparar la frecuencia del alelo de promotor X entre pacientes con NAC y pacientes controles ($p = 0.041$, OR = 0.82, IC 95% 0.67-0.99), si bien esta diferencia no se mantuvo al comparar los pacientes con NAC frente a los controles sanos. Al tener en cuenta tanto las variantes exónicas como los polimorfismos de promotor X/Y, no se observaron diferencias en las frecuencias de los genotipos insuficientes de MBL (XA/O + O/O) (tabla VII.2)

Tabla VII.2. Alelos y genotipos *MBL2* en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) y controles.

	NAC	Controles pacientes	Controles sanos
Alelos <i>MBL2</i>	N = 1.696	N = 1.038	N = 2.894
Alelos estructurales			
A total	1.311 (77,30)	815 (78,52)	2.229 (77,02)
O total	385 (22,70)	223 (21,48)	665 (22,98)
B	269 (15,86)	144 (13,87)	412 (14,24)
C	37 (2,18)	32 (3,08)	83 (2,87)
D	79 (4,66)	47 (4,53)	170 (5,87)
Alelos de promotor			
X	329 (19,40)	236 (22,74)	596 (20,59)
Y	1.367 (80,60)	802 (77,26)	2.298 (79,41)
Genotipos <i>MBL2</i>	N = 848	N = 519	N = 1447
Genotipos estructurales			
A/A	510 (60,14)	319 (61,46)	861 (59,50)
A/O	291 (34,32)	177 (34,10)	506 (34,97)
O/O	47 (5,54)	23 (4,43)	80 (5,53)
Genotipos estructurales y de promotor			
A/A+YA/O	732 (86,32)	439 (84,59)	1.224 (84,59)
XA/O+O/O	116 (13,68)	80 (15,41)	223 (15,41)

Los valores son el número de cromosomas (%) para los alelos, y el número de individuos (%) para los genotipos.

O designa a los alelos variantes B, C y D del gen *MBL2*.

Cuando se comparó con los grupos controles, la NAC secundaria a neumococo, o a bacterias Gram-negativas, o aquellos pacientes sin confirmación etiológica, tampoco se observaron diferencias (tabla VII.3).

Tabla VII.3. Genotipos *MBL2* en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad en relación al agente etiológico.

	<i>S. pneumoniae</i> (N = 195)	Gram-positivo (N = 216)	Gram-negativo (N = 96)	No patógeno (N = 516)	Controles sanos (N = 1.447)
A/A+YA/O	173 (88,72)	193 (89,35)	78 (81,25)	444 (86,05)	1.224 (84,59)
XA/O+O/O	22 (11,28)	23 (10,65)	18 (18,75)	72 (13,95)	223 (15,41)

Los valores son el número (%).

A/A+YA/O: genotipos suficientes de MBL. XA/O+O/O: genotipos insuficientes de MBL.

Los individuos infectados simultáneamente por patógenos Gram-positivos y Gram-negativos han sido excluidos.

La relevancia de las variantes *MBL2* en la gravedad de la NAC se evaluó mediante el análisis del desarrollo de las formas más graves de sepsis (SG y ShS) como variables primarias (tabla VII.4). Aquellos pacientes sin sepsis o con formas no graves de sepsis presentaron frecuencias genotípicas similares, de manera que fueron agrupadas en la variable “no sepsis grave” (NSG). La frecuencia de genotipos insuficientes de MBL fue mayor en pacientes con ShS (21,19%) que en aquellos con SG (16,79%) o NSG (11,47%) (χ^2 para tendencia lineal: 9,21; $p = 0,01$). Del mismo modo, pacientes con las formas más graves de sepsis tuvieron mayores frecuencias de genotipos insuficientes de MBL (18,82%) que aquellos con NSG ($p = 0,006$; OR = 1,79, IC 95% 1,17-2,73). Además, la insuficiencia de MBL también se asoció con la necesidad de ingreso en la UCI ($p = 0,008$, OR = 1,82, IC 95% 1,15-2,84), con el desarrollo de insuficiencia respiratoria aguda (IRA) ($p = 0,041$, OR = 1,68, IC 95% 1,03-2,83), SDRA ($p = 0,047$, OR = 2,29, IC 95% 0,96-4,99) y FMO ($p = 0,030$, OR = 1,91, IC 95% 1,04-3,38) (tabla VII.4), pero no con bacteriemia ni con el IGN. Sin embargo, se observó un aumento no significativo de genotipos O/O y XA/O + O/O en pacientes con NAC con bacteriemia neumocócica (9,8% y 17,1% respectivamente; $N = 41$) respecto a los pacientes con NAC neumocócica sin bacteriemia (3,3% y 9,2% respectivamente; $N = 153$).

Tabla VII.4. Gravedad y pronóstico en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad en relación a los genotipos *MBL2*.

Característica	A/A+YA/O N (%)	XA/O+O/O N (%)	p^a OR (IC 95%)	p^b multivariante OR (IC 95%)	p^c multivariante OR (IC 95%)
NSG	525 (88,53)	68 (11,47)			
SG	114 (83,21)	23 (16,79)	0,006 ^{d, e} 1,79 (1,17-2,73)	0,007 ^d 1,86 (1,19-2,9)	0,005 2,00 (1,24-3,25)
ShS	93 (78,81)	25 (21,19)			
Planta	582 (88,05)	79 (11,95)	0,008	0,020	0,024
UCI	150 (80,81)	37 (19,79)	1,82 (1,15-2,84)	1,78 (1,10-2,90)	1,82 (1,08-3,06)
No Bacteriemia	677 (86,68)	104 (13,32)	0,531	0,640	0,292
Bacteriemia	54 (83,08)	11 (16,92)	1,33 (0,61-2,67)	1,19 (0,57-2,47)	1,53 (0,69-3,40)
No IRA	222 (90,24)	24 (9,76)	0,041	0,009	0,005
IRA	506 (84,62)	92 (15,38)	1,68 (1,03-2,83)	1,93 (1,18-3,18)	2,17 (1,27-3,72)
No SDRA	703 (86,90)	106 (13,10)	0,047	0,205	0,152
SDRA	29 (74,36)	10 (25,64)	2,29 (0,96-4,99)	1,70 (0,75-3,89)	1,92 (0,79-4,67)
No FMO	663 (87,24)	97 (12,76)	0,030	0,036	0,137
FMO	68 (78,16)	19 (21,84)	1,91 (1,04-3,38)	1,90 (1,04-3,45)	1,64 (0,86-3,14)
IGN I-III	298 (88,43)	39 (11,57)	0,185	0,166	0,26
IGN IV-V	412 (84,95)	73 (15,05)	1,35 (0,88-2,11)	1,35 (0,88-2,05)	1,29 (0,83-2,02)
No <i>exitus</i> a 90 días	678 (87,37)	98 (12,63)	0,006	0,003	0,008
<i>Exitus</i> a 90 días	54 (75,0)	18 (25,0)	2,31 (1,22-4,19)	2,34 (1,32-4,14)	2,30 (1,25-4,23)

^a p para la comparación bivalente. ^b p para el análisis multivariante incluyendo las variables edad, sexo, población de origen y comorbilidades, excepto para el análisis del IGN, que sólo incluye la población de origen. ^c p para el análisis multivariante incluyendo las variables edad, sexo, población de origen, comorbilidades y patógeno (*S. pneumoniae*, Gram-negativo y no patógeno identificado), excepto para el análisis del IGN, que sólo incluye la población de origen, y el análisis de la bacteriemia, que no incluye la variable no patógeno identificado. ^dAnálisis de NSG vs. SG+ShS. ^eNSG vs. SG vs. ShS: $p = 0,010$, $\chi^2=9,21$.

NSG: no-sepsis grave, incluye pacientes sin sepsis grave ni shock séptico; SG: sepsis grave; ShS: shock séptico; FMO: fracaso multiorgánico; IRA: insuficiencia respiratoria aguda; SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo; IGN: índice de gravedad de la neumonía.

Es interesante señalar que, al incluirse como variables independientes en un análisis multivariante el hospital de origen, la edad, el sexo y las comorbilidades, la insuficiencia de MBL se asoció con el desarrollo de las formas más graves de sepsis (SG y ShS; $p = 0,007$, OR = 1,86, IC 95% 1,19-2,9), así como con IRA ($p = 0,009$, OR = 1,94, IC 95% 1,18-3,19) y FMO ($p = 0,035$, OR = 1,91, IC 95% 1,05-3,47), y también con una mayor tasa de ingreso en la UCI ($p = 0,020$, OR = 1,78, IC 95% 1,10-2,90) (tabla VII.4).

No se observaron diferencias significativas al estudiar el IGN y el desarrollo de bacteriemia o de SDRA.

No se observaron diferencias significativas al analizar el riesgo de muerte a los 28 días. Sin embargo, al evaluar la mortalidad a 90 días, se encontró que los pacientes que morían tenían una mayor frecuencia de genotipos insuficientes de MBL. Esta asociación fue independiente de la edad, el sexo, la población de origen y las comorbilidades ($p = 0,003$, OR = 2,34, IC 95% 1,32-4,14) (tabla VII.4).

El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier (figura VII.1) mostró que la supervivencia difería significativamente entre los pacientes con genotipos insuficientes y suficientes (χ^2 long rank: 5,65; $p = 0,017$). La regresión de Cox para la supervivencia a los 90 días, ajustada para las variables independientes edad, sexo, población de origen y comorbilidades, también fue significativa ($p = 0,007$, HR = 2,19, IC 95% 1,23-3,87).

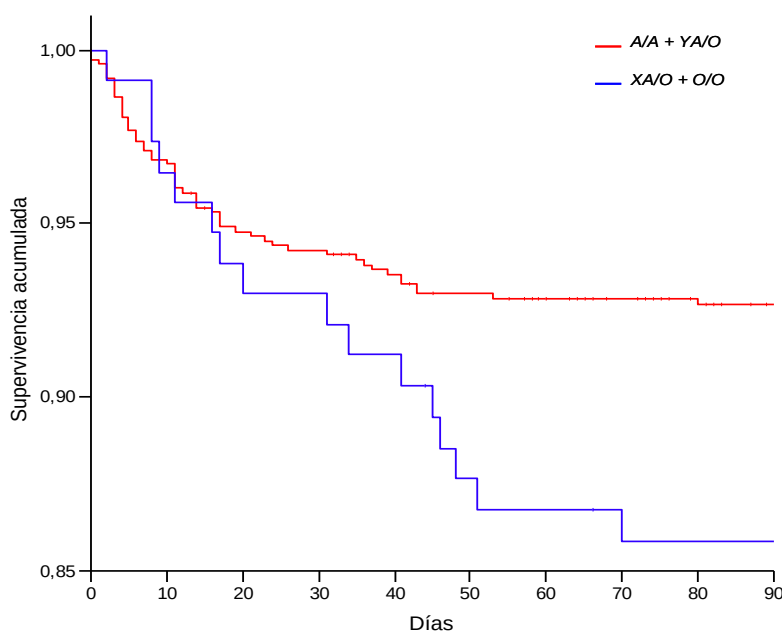


Figura VII.1. Estimación de Kaplan-Meier de la supervivencia a los 90 días en función de los genotipos *MBL2* de suficiencia de MBL (A/A + YA/O) o insuficiencia de MBL (XA/O + O/O). χ^2 de long rank: 5,65; $p = 0,017$. Hazard ratio 2,19 (IC 95% 1,23-3,87; $p = 0,007$) en un modelo proporcional de riesgo de Cox, corregido para edad, sexo, población de origen y comorbilidades.

Es de destacar que también se encontró una tendencia no significativa hacia un aumento de la frecuencia de genotipos insuficientes de MBL entre los pacientes con mayor gravedad de la enfermedad y mayor tasa de mortalidad al estudiar a los pacientes en base al microorganismo causal (NAC secundaria a *S. pneumoniae*, bacterias Gram-negativas, o no patógeno identificado). Un análisis multivariante mostró que la

insuficiencia de MBL predispone a formas graves de sepsis ($p = 0,005$; OR = 2,00, IC 95% 1,24-3,25), necesidad de ingreso en UCI ($p = 0,024$, OR = 1,82, IC 95% 1,08-3,06), desarrollo de IRA ($p = 0,005$, OR = 2,17, IC 95% 1,27-3,72) y mortalidad a 90 días aumentada ($p = 0,008$, OR = 2,30, IC 95% 1,25-4,32), independientemente del microorganismo causante, la edad, el sexo, la población de origen y las comorbilidades (tabla VII.4).

DISCUSIÓN

Nuestro estudio prospectivo muestra, por primera vez, evidencias de que la insuficiencia de MBL predispone a formas más graves de sepsis y a desenlace fatal en pacientes con NAC. Sin embargo, el estudio caso-control comparando las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* entre pacientes y controles, no apoya que la insuficiencia de MBL tenga un papel en la susceptibilidad a la NAC.

Diversos factores influyen en la susceptibilidad y en la gravedad de la infección, pudiendo ser uno de ellos la variabilidad genética, que afectaría a la respuesta del hospedador. Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) son el ejemplo más obvio. La deficiencia de MBL no es una IDP en el sentido clásico del término, dado que su penetrancia clínica es extremadamente baja (Casanova JL y Abel J, 2004; Klein NJ *et al*, 2005; Eisen DP *et al*, 2003). Nosotros no observamos diferencias en las frecuencias de los genotipos de *MBL2* insuficientes entre dos grupos de controles de gran tamaño muestral y 848 pacientes adultos con NAC, incluso cuando se evaluó la NAC secundaria a bacterias Gram-positivas (mayoritariamente *S. pneumoniae*) o Gram-negativas de forma separada. Nuestros resultados difieren de los de Roy *et al* (2002), los cuales encuentran un aumento significativo del genotipo de *MBL2* O/O en pacientes con infección neumocócica invasiva, en comparación con los controles sanos. Otros dos estudios previos no encontraron asociación (Kronborg G *et al*, 2002; Moens L *et al*, 2006) aunque un meta-análisis de los tres dio un aumento significativo de la prevalencia de los genotipos O/O en pacientes con enfermedad neumocócica invasiva respecto a controles sanos (Moens L *et al*, 2006).

Tampoco encontramos diferencias significativas en las frecuencias de genotipos de MBL insuficiente o O/O entre pacientes con y sin bacteriemia, incluso al analizar la NAC neumocócica. Sin embargo, nosotros estudiamos pacientes con NAC, mientras que los estudios antes mencionados analizaban pacientes con enfermedad neumocócica invasiva, no exclusivamente neumonía, y no especificado si se trataba de NAC,

nosocomial, o de ambas. Hasta la fecha sólo se han realizado otros dos estudios de MBL en NAC (Pérez-Castellano M *et al*, 2006; Endeman H *et al*, 2008). De acuerdo con nuestros resultados, Pérez-Castellano *et al* (2006), (N = 100), no observaron asociación alguna entre el defecto de MBL y la NAC neumocócica, e incluso observaron un riesgo elevado de bacteriemia en pacientes (88%) con el genotipo salvaje de *MBL2*. Por su parte, Endeman *et al* (2008) (N = 199) tampoco encuentran diferencias en las frecuencias genotípicas entre los pacientes con NAC en general, la neumonía causada por neumococo o por *H. Influenzae*, y los controles.

La ausencia de asociación entre la insuficiencia de MBL y la NAC neumocócica no sería sorprendente si se confirmara la baja o nula unión de la MBL al *S. pneumoniae*. Algunos autores han encontrado mediante citometría de flujo (Rodríguez JA *et al*, 2004) que la MBL no es capaz de unirse a distintas cepas de *S. pneumoniae*, o que se une muy poco (Neth O *et al*, 2000), mientras otros encuentran una capacidad intermedia de unión a neumococo en ensayos con radiomarcaje (van Emerik LC *et al*, 1994), o unión a polisacárido capsular purificado de ciertos serotipos de *S. pneumoniae*, pero no de otros serotipos (Moller CH *et al*, 2007). Otros muchos mecanismos del sistema inmunológico innato pueden aportar suficiente protección frente al neumococo y otras bacterias en ausencia de la MBL. De hecho, la VC, y en una menor medida, la VA, son las vías dominantes de complemento durante la inmunidad innata en humanos y en ratones, de modo que la pérdida de la vía por MBL no afecta, o lo hace mínimamente, a la primera línea de defensa (Brown JS *et al*, 2002; Jonsson G *et al*, 2006). Además, experimentos en ratones nulos (knock out: KO) para MBL han mostrado que la vía del complemento mediada por MBL es redundante en la primera línea de defensa frente a inyección intraperitoneal de *S. aureus* (Shi L *et al*, 2004). A pesar del papel clave de la VC en la defensa frente a neumococo y otras bacterias encapsuladas, sólo un 50% de los pacientes con IDP del componente C2 de la VC (la deficiencia más común de la VC de complemento en los países occidentales) muestra una susceptibilidad aumentada de infección recurrente (Sullivan KE *et al*, 2007), y la deficiencia de MBL juega sólo un papel menor en la susceptibilidad a infección en estos pacientes (Jonsson G *et al*, 2006). Por tanto, nuestros resultados refuerzan el concepto de que la MBL juega un papel redundante en las defensas humanas frente a la infección primaria.

Los genotipos *MBL2* insuficientes fueron, no obstante, significativamente más prevalentes entre pacientes con formas más graves de la enfermedad cuando se analizaron las variables primarias y la mayoría de las secundarias. La asociación seguía

siendo significativa al realizar un análisis multivariante corrigiendo no sólo por la edad, el sexo y las comorbilidades, sino también por el hospital de origen, controlando así cualquier diferencia en políticas de admisión y de manejo terapéutico entre los hospitales y las UCIs, así como en diferencias genéticas putativas entre las tres poblaciones. El análisis multivariante también confirmó que la insuficiencia de MBL predispone a formas más graves de la enfermedad, así como a un peor pronóstico, independientemente de los microorganismos causantes.

No se observaron diferencias en la mortalidad por cualquier causa a los 28 días. Sin embargo, los genotipos insuficientes de MBL se asociaron con una supervivencia a 90 días disminuida, independientemente de edad, sexo, hospital de origen y comorbilidades. A primera vista, este hallazgo parece sorprendente, dado que en sepsis generalmente se considera la tasa de mortalidad a los 28 días como el criterio de valoración apropiado. Es difícil definir la causa de muerte en enfermos críticos, especialmente en aquellos con sepsis. Actualmente, con unos tratamientos de soporte vital disponibles cada vez más efectivos y amplios, la retirada de dicha terapia de soporte es el evento terminal más común en pacientes ingresados en la UCI (Vincent JL, 2004). Así, en la evaluación de la mortalidad por sepsis, es difícil especificar la medida en que la muerte está directamente relacionada con la sepsis. Esta es la causa que apoya un análisis de mortalidad a más largo plazo, incluso de un año. Esto ha sido puesto de manifiesto recientemente en un estudio que muestra que, la tasa de mortalidad al año en pacientes ancianos con NAC, es cuatro veces mayor que la tasa de mortalidad hospitalaria, y por esa causa uno de cada tres supervivientes de NAC muere en el año posterior a su alta hospitalaria (Niederman MS, 2007). En nuestro estudio, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier durante un periodo de seguimiento de tres meses, mostró una menor supervivencia de pacientes con insuficiencia de MBL, con una separación progresiva de las dos curvas a partir de los 15 días.

Se ha señalado una asociación entre las variantes alélicas del gen *MBL2* con un peor pronóstico de los enfermos críticos que requieren cuidados intensivos en algunos (Garred P *et al*, 2003b; Fidler KJ *et al*, 2004; Gordon AC *et al*, 2006) pero no en todos (Kronborg G *et al*, 2002; Sutherland AM *et al*, 2005) los estudios previos. En un estudio en pacientes de UCI con SDRA se encontró una asociación significativa entre el genotipo B/B y una gravedad y mortalidad a 60 días aumentadas (Gong MN *et al*, 2007). Sin embargo, estos resultados deben tomarse con cautela, dado que, al analizar juntos los alelos O (B, C y D), no se encontró ninguna asociación. Por otra parte, un estudio

reciente (Eisen DP *et al*, 2008) reanaliza conjuntamente los datos de seis estudios previos (N = 675) sobre el papel de la MBL en la infección bacteriana severa, encontrando un riesgo de mortalidad aumentado entre los pacientes deficientes de MBL con infección neumocócica.

Las razones de los efectos observados para la MBL sobre la gravedad y un mal pronóstico en NAC siguen sin ser claras, pero pueden estar implicados diversos mecanismos mediados por la MBL, mutuamente no excluyentes. En primer lugar, la MBL puede ser capaz de limitar la dispersión sistémica de los patógenos. Modelos experimentales en ratón sugieren que, cuando otros factores concomitantes de predisposición a infección, como la neutropenia o quemaduras graves, están presentes, los ratones KO de MBL infectados con *S. aureus* o *P. aeruginosa* son más propensos a infección bacteriana sistémica y a muerte que los ratones “wild type” (Shi L *et al*, 2004; Moller-Kristensen M *et al*, 2006). Sin embargo, la vía dependiente de MBL del complemento no fue redundante frente a la infección sanguínea, en el mismo modelo experimental. La MBL se ha encontrado presente en fluido de lavado broncoalveolar de pacientes con neumonía, pero no en el de individuos sanos, lo cual indica que la MBL puede filtrarse desde la circulación sistémica al sitio de inflamación en los pulmones para contener la propagación de la infección (Gomi K *et al*, 2004). En segundo lugar, se ha visto que la MBL aporta señales a las células mononucleares de la sangre periférica humana, llevando a la supresión de citocinas pro-inflamatorias inducidas por LPS (Fraser DA *et al*, 2006). Además, la MBL modula la producción de citocinas pro-inflamatorias frente a *N. meningitidis* en ensayos en sangre completa humana deficiente de MBL, aumentando la producción de TNF- α , IL-6 e IL-1 a concentraciones bajas, pero disminuyéndolas a concentraciones elevadas (Jack DL *et al*, 2001), o lo que es lo mismo, de una manera dependiente de dosis. En modelos experimentales de sepsis con ratones KO para MBL también se observó un patrón alterado de producción de citocinas pro-inflamatorias (Shi L *et al*, 2004; Moller-Kristensen M *et al*, 2006). En tercer lugar, la MBL se une con una gran afinidad al principal componente de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, el peptidoglicano (PGN), en forma tanto soluble como insoluble (Jack DL *et al*, 2001). Durante el ciclo de vida bacteriano se libera PGN, y los antibióticos activos frente a la pared celular causan una liberación rápida y significativa de PGN (Nau R y Eiffert H, 2002). El PGN suscita una respuesta inflamatoria que contribuye al shock y al FMO (Kengatharan KM *et al*, 1998). Se ha observado que la unión de la MBL al PGN inhibe la producción por los macrófagos de citocinas pro-

inflamatorias inducida por PGN (Nadesalingam J *et al*, 2005). En cuarto lugar, experimentos *in vitro* y en ratones KO de MBL han demostrado que la MBL reconoce estructuras propias alteradas en células necróticas y apoptóticas, facilitando su aclaramiento por los macrófagos (Ogden CA *et al*, 2001; Nauta AJ *et al*, 2003; Stuart LM *et al*, 2005). Este mecanismo podría, teóricamente, volverse clínicamente relevante para la progresión del síndrome de sepsis (Hotchkiss RS *et al*, 2006). Es interesante observar que los dos últimos mecanismos conectarían con nuestras observaciones de formas más graves de sepsis en pacientes deficientes de MBL, particularmente en aquellos con NAC por bacterias Gram-positivas capsuladas, a pesar de la ausencia de unión de la MBL a *S. pneumoniae* y *S. aureus* capsuladas (Brown JS *et al*, 2002).

Diversos puntos de solidez de nuestro estudio minimizan las limitaciones de los estudios genéticos de asociación. Primero, nuestro estudio prospectivo en una amplia cohorte de pacientes reduce la posibilidad de asociaciones espurias (error de tipo I). Segundo, al haber incluido sólo caucásicos de origen español en nuestro grupo de pacientes, se limita la probabilidad de estratificación de la población debido a heterogeneidad étnica. Tercero, hemos analizado pacientes con NAC como única infección en el momento de ingreso, mientras que otros estudios previos sobre la variabilidad genética de *MBL2* y la sepsis, estaban limitados a poblaciones heterogéneas de UCI. Cuarto, el riesgo elevado de formas graves de sepsis y de peor desenlace en los individuos insuficientes de MBL fue independiente de edad, sexo, población de origen y comorbilidades.

Evidentemente, hay otros factores clínicos que complican la interpretación de los estudios de asociación. La etiología específica del proceso infeccioso, la virulencia del microorganismo, el retraso en el diagnóstico y en el tratamiento, pueden, indudablemente, actuar como variables de confusión. Si bien en nuestra serie se aplicaron las recomendaciones actuales para el tratamiento de la sepsis y el ShS, no se empleó un protocolo común específico.

Finalmente, el identificar factores únicos del hospedador que predisponen a ciertos individuos a manifestaciones más graves de enfermedades infecciosas sigue siendo, sin lugar a dudas, una meta importante, particularmente en el contexto de la terapia inmunomoduladora. Nuestros resultados pueden tener implicaciones clínicas. El uso de MBL recombinante humana (rhMBL) está en desarrollo como nuevo enfoque terapéutico. Se ha visto que infusiones de MBL tienen un buen perfil de seguridad en ensayos en fase I, y la terapia de reemplazamiento de MBL aporta perspectivas

interesantes para el futuro (Valdimarsson H *et al*, 2004; Petersen KA *et al*, 2006). Actualmente hay en desarrollo ensayos en fase II en pacientes inmunosuprimidos (www.enzon.com). Sin embargo, se necesitan conocimientos adicionales del papel pro- y anti-inflamatorio de la vía de activación de complemento dependiente de MBL en sepsis, antes de que el potencial de esta intervención merezca ser evaluado.

CAPÍTULO VIII

RELEVANCIA DEL DEFECTO DE LA SERINA-PROTEASA-2 ASOCIADA A LA MBL (*MASP-2*)

RELEVANCIA DEL DEFECTO DE LA SERINA-PROTEASA-2 ASOCIADA A LA MBL (MASP-2)

RESUMEN

Antecedentes. La VL del sistema del complemento se activa mediante la unión de la MBL, o de ficolinas, a carbohidratos específicos en las superficies microbianas, activándose las MASPs. La MASP-2 actúa sobre C4 y C2, generando la convertasa de C3. En 2003 se describió un paciente homocigoto para la mutación *D105G* del gen *MASP2*, el cual presentaba desórdenes inflamatorios y autoinmunes, e infecciones graves por *S. pneumoniae*. Esta mutación impide la unión de la MASP-2 a la MBL y a las ficolinas, no permitiendo la activación de la VL.

Objetivo. Determinar la frecuencia de la mutación *D105G* del gen *MASP2* en población española y en bereberes del Atlas, así como si dicha mutación se asocia con la susceptibilidad a diversas patologías autoinmunes e infecciosas, o a un peor pronóstico de estas enfermedades.

Materiales y métodos. Se analizó la mutación *D105G*, mediante PCR-RFLP, en 4 grupos geográficos de población española sana (1.083 individuos en total), 67 bereberes del Atlas, 967 adultos con NAC y 130 pacientes con LES. Los genotipos se confirmaron mediante secuenciación directa. En todos los individuos se conocía el genotipo *MBL2*. También se analizaron la actividad de la VL y la concentración sérica de MASP-2 en un grupo de controles sanos.

Resultados. La frecuencia alélica de *D105G* en el total de controles españoles fue 0,025 (homocigosis esperada = 0,00062). No se observó la mutación en población bereber. Encontramos 3 individuos homocigotos mutados, todos del grupo de controles sanos, sin historial relevante de infecciones, autoinmunidad u otras patologías. Las frecuencias alélicas y genotípicas no difirieron significativamente entre los distintos grupos analizados.

Conclusiones. No existe asociación del defecto de MASP-2 con la susceptibilidad a NAC o a LES. El hecho de que los individuos adultos deficientes de MASP-2 que presentamos no muestren infecciones relevantes, ni desórdenes autoinmunes o inflamatorios detectables, indica una baja penetrancia clínica del defecto de MASP-2. Estos resultados muestran la necesidad de estudios adicionales para establecer definitivamente la relevancia clínica de esta alteración.

INTRODUCCIÓN

El sistema del complemento juega un papel clave en las respuestas de la inmunidad innata. Las deficiencias de complemento de componentes tempranos de la VC o de la VA se asocian a un aumento en la susceptibilidad a infecciones piógenas por bacterias capsuladas y a desórdenes inflamatorios, particularmente LES (Walport MJ, 2001). Una tercera vía, la VL, es activada mediante la unión de la MBL u otras lectinas, como las ficolinas L, H y M, a patrones moleculares específicos asociados a patógenos sobre las superficies microbianas. A continuación, la MASP-2 fragmenta los factores de complemento C4 y C2, generando la convertasa de C3, C4bC2a. La MASP-1, la MASP-3 y la Map-19 también están implicados en la activación de la VL, aunque su función permanece aún por definir (Sorensen R *et al*, 2005).

En el año 2003 fue descrito el caso de un individuo adulto que padecía desórdenes autoinmunes e inflamatorios desde los 15 años de edad, así como infecciones graves por *S. pneumoniae* durante la edad adulta (Stengaard-Pedersen K *et al*, 2003). Este individuo tenía una mutación en homocigosis en el exón 3 del gen *MASP2*, la cual conducía a un cambio de ácido aspártico (GAC) a glicina (GGC) en el aminoácido en posición 105 (*D105G*) de la proteína madura (*D120G* en la proteína sin procesar). La mutación resultaba en niveles séricos menores de MASP-2 y Map-19, e impedía la asociación de la MASP-2 a la MBL y las ficolinas, revocando la activación de la VL. El paciente también presentaba anticuerpos anti-C1q, resultando en unos niveles séricos de C1q muy reducidos, así como un deterioro severo de la función de la VC. La deficiencia de MASP-2 debida a la homocigosis de la mutación *D105G* se encontró posteriormente en dos niños. El primero fue un niño alérgico de un grupo de 335 niños con infecciones respiratorias recurrentes sin anormalidades conocidas del sistema inmunológico (Cedzynski M *et al*, 2004). La segunda fue una niña de un grupo de 109 pacientes con fibrosis quística (Olesen HV *et al*, 2006); esta niña, carente de otros factores que precipitaran la enfermedad, presentaba una enfermedad pulmonar extremadamente grave, empezando con manifestaciones clínicas durante el periodo neonatal, teniendo tos productiva e infecciones pulmonares crónicas, y muriendo a los nueve años y medio de fallo respiratorio. Además, en un estudio en pacientes con soriasis y sus familiares (894 individuos en total), se encontró un individuo homocigoto *D105G* (Stover C *et al* 2005). Recientemente se ha citado también la existencia de otros 3 homocigotos, dos pacientes tratados en consulta de neumología, y un paciente con cáncer de colon (Thiel S *et al*,

2007), si bien de estos 3 casos, así como de el del estudio de soriasis, no se han aportado detalles.

Se ha visto que el alelo *D105G* es común en poblaciones danesa (0,036) (Sorensen R *et al*, 2005), española (0,014) (Lozano F *et al*, 2005), y norteafricana (0,02) (Lozano F *et al*, 2005). Sin embargo, la mutación no ha sido encontrada en subsaharianos (Sorensen R *et al*, 2005; Lozano F *et al*, 2005) ni chinos (Sorensen R *et al*, 2005). Recientemente, Thiel *et al* (2007) han analizado la presencia de la mutación *D105G* en diversas poblaciones, encontrándola sólo en caucásicos (0,039) y en inuits del oeste de Groenlandia (0,037), pero no en chinos, africanos, amerindios, ni inuits del este de Groenlandia (los cuales parecen tener menor mezcla caucásica que los del oeste).

Respecto al posible papel de esta mutación en el desarrollo de enfermedad, desde su descubrimiento en 2003, diversos estudios han analizado la relación del defecto genético de la MASP-2 con diversas patologías, sin encontrar ninguna asociación relevante. Así, ha sido estudiado su papel en la fibrosis quística, no viéndose que afecte a la evolución clínica (Carlsson M *et al*, 2005) ni a la función pulmonar (Olesen HV *et al*, 2006). Tampoco se ha encontrado que la mutación *D105G* tenga algún papel en la soriasis (Stover C *et al*, 2005), aunque sí parece ser un factor predictivo de infección fúngica invasiva tras trasplante alogénico de células madre (Granell M *et al*, 2006). Sin embargo, varios estudios han encontrado resultados significativos al analizar los niveles séricos de MASP-2 en pacientes con cáncer: Ytting *et al* (2005) encuentran niveles significativamente mayores de MASP-2 en pacientes con cáncer colorrectal que en controles, así como que los niveles elevados de dicha serina-proteasa son un marcador pronóstico de recurrencia y peor supervivencia en estos pacientes (Ytting H *et al*, 2005b); por otra parte, Verma *et al* (2006) muestran expresión de MASP-2 en tumor sólido y sugieren su asociación con un comportamiento agresivo del tumor, mientras que Schlapbach *et al* (2007) asocian la deficiencia sérica de MASP-2 con un aumento del riesgo de fiebre y neutropenia severa inducida por quimioterapia en pacientes pediátricos con cáncer.

En el gen *MASP2* se han descrito otras mutaciones de sentido erróneo (mutaciones *missense*, que producen un cambio de aminoácido), así como una duplicación. Estas variantes del gen se presentan en distintas frecuencias en diversas poblaciones, y se asocian con diferencias en los niveles séricos de la proteína, si bien la sustitución *D105G* es la causa principal de los niveles bajos de MASP-2 en caucásicos (Thiel S *et al*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y controles.

La población de individuos estudiada incluyó un grupo de 1.083 españoles sanos voluntarios procedentes de cuatro poblaciones españolas (445 individuos sanos de Gran Canaria, 337 donantes de sangre de Madrid, 188 donantes de sangre de Valencia y 113 donantes de sangre de Huesca, todos ellos pertenecientes a los grupos de población sana descritos en el apartado 1.1 del capítulo III), 67 individuos bereberes de la región del Atlas (descritos en el apartado 1.1 del capítulo III), 961 pacientes adultos con NAC (pertenecientes al grupo analizado en el capítulo VII provenientes de el Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín”, el Hospital Universitario de la Princesa (Madrid) y el Hospital Clínico Universitario de Valencia, y ampliado con 113 pacientes del Hospital San Jorge (Huesca) (73,21% mujeres, $42,04 \pm 9,83$ años) y 130 pacientes con LES (pertenecientes al grupo estudiado en el capítulo V y ampliado con más pacientes femeninas).

Niveles séricos de MASP-2.

Los niveles séricos de la MASP-2 se analizaron mediante el sistema “ELISA kit for human MASP-2” (Hycult biotechnology, Uden, Holanda), tal como se describe en el capítulo III.

Actividad de la vía de las lectinas dependiente de MBL.

La actividad de la vía dependiente de MBL se analizó en suero mediante el sistema “Wieslab Complement System MBL pathway” (Wieslab, Lund, Suecia), del modo que se describe en el capítulo III.

Análisis genético.

La extracción del ADN así como el genotipaje se realizaron tal como se describe en el capítulo III.

Análisis estadístico.

Las comparaciones de la distribución de los alelos y genotipos *MASP2* entre los distintos grupos de individuos se realizaron mediante el test de Chi cuadrado, o el test exacto de Fisher cuando fue necesario, calculándose los OR con un IC del 95 %.

Las diferencias en los niveles séricos de MASP-2 y de la actividad de la VL respecto a los genotipos analizados se compararon mediante el test de Mann-Whitney, o el test de Kruskal-Wallis cuando estaban presentes más de dos genotipos.

(Para una descripción más detallada del análisis estadístico ver el apartado 6 del capítulo III).

RESULTADOS

Caracterización de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MASP2* en poblaciones sanas.

La frecuencia alélica de la mutación *D105G* en controles sanos de Gran Canaria fue de 0,28 (tabla VIII.1), lo cual nos lleva a una frecuencia esperada de homocigosis para la mutación *D105G* de 0,00079 en canarios.

La frecuencia alélica de la población española total (Gran Canaria, Madrid, Valencia y Huesca, N = 1.083) fue de 0,025 (tabla VIII.1) (frecuencia esperada de homocigosis de 0.00062).

Por otra parte, en ninguno de los 67 bereberes de la región del Atlas, en Marruecos, se encontró el alelo mutado *D105G* (tabla VIII.1).

Tabla VIII.1. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación *D105G* del gen *MASP2* en las diversas poblaciones españolas analizadas y en población africana del Atlas.

Alelos o genotipos	Gran Canaria (N = 445)	España (N = 1.083)	Atlas (N = 67)
G	25 (2,81)	54 (2,49)	0
A/A	421 (94,61)	1.032 (95,29)	67 (100)
A/G	23 (5,17)	48 (4,43)	0
G/G	1 (0,22)	3 (0,27)	0

Los valores son el número de cromosomas (%) para los alelos y el número de individuos (%) para los genotipos.

G: alelo mutado *D105G*. A/A, A/G y G/G: homocigotos salvajes, heterocigotos portadores y homocigotos para la mutación *D105G*, respectivamente.

No hubo diferencias significativas en la frecuencia del alelo mutado entre canarios, ni total de españoles, respecto a bereberes. La diferencia observada al analizar las frecuencias de los genotipos portadores de alelo mutado *D105G* (A/G + G/G) entre la población Gran Canaria y los bereberes del Atlas (tabla VIII.1), debida a la ausencia de

alelo *D105G* en bereberes, no alcanzó la significación estadística ($p = 0,058$). Tampoco fue significativa la diferencia observada al comparar el total de españoles y los bereberes. Los tres grupos de poblaciones se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Entre los individuos sanos españoles encontramos tres individuos homocigotos *D105G*: una mujer de 39 años del personal hospitalario (caso 1), una mujer de 39 años donante de sangre (caso 2) y un hombre de 49 años donante de sangre (caso 3). El genotipo fue confirmado mediante secuenciación directa con una pareja de oligonucleótidos distinta a la utilizada para el análisis por PCR-RFLP (Figura VIII.1).

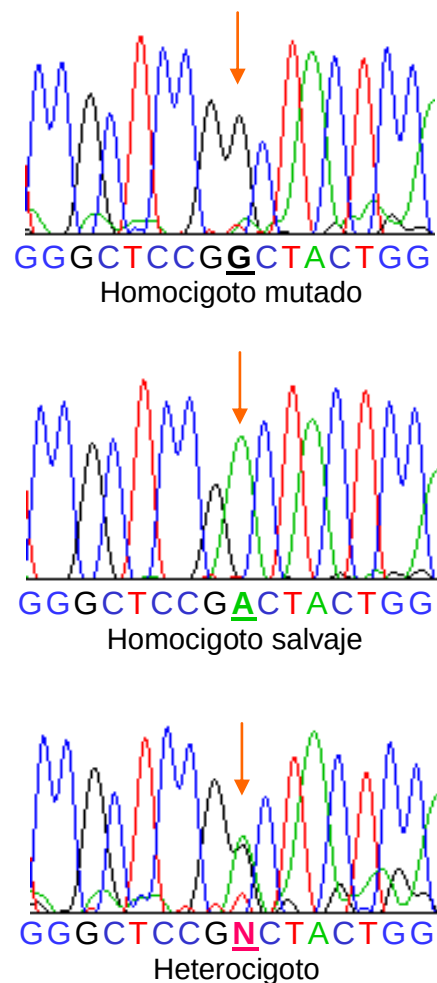


Figura VIII.1. Análisis por secuenciación de la mutación *D105G* en el exón 3 del gen *MASP2*. Electroferogramas mostrando la región de la mutación *D105G* en un homocigoto mutado (G/G), un homocigoto salvaje (A/A) y un portador heterocigoto (A/G).

No se encontraron infecciones o desórdenes autoinmunes recurrentes o relevantes en ninguno de los tres casos, y los análisis bioquímicos e inmunológicos (incluido de un

amplio grupo de autoanticuerpos) realizados al caso 1 y 2 también fueron negativos. En el caso 3 no se pudieron realizar estos análisis por no disponer de muestra de suero.

Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MASP2* entre población canaria y española, y otras poblaciones.

Se compararon nuestros datos con las frecuencias alélicas y genotípicas publicadas en otros grupos poblacionales (tabla VIII.2). Entre las poblaciones europeas analizadas, se observó una frecuencia ligeramente mayor de genotipos portadores de la mutación en población danesa (Thiel S *et al*, 2007) que en la población española total (7,71% vs. 4,43%; $p = 0,043$, OR = 1,03, IC 95% 1-1,01), mientras que esta frecuencia fue menor, aunque no significativamente, en población sueca (2,50%) (Carlsson M *et al*, 2005).

No se encontraron homocigotos mutados en otros grupos en los que sí se observó el alelo mutado *D105G* (tabla VIII.2).

Tabla VIII.2. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación *D105G* del gen *MASP2* entre población española y canaria, y otras poblaciones previamente publicadas.

	Alelo	Genotipos		
	G	A/A	A/G	G/G
España (N = 1.083)	54 (2,49%)	1.032 (95,29%)	48 (4,43%)	3 (0,29%)
Canarios (N = 445)	25 (2,81%)	421 (94,61%)	23 (5,17%)	1 (0,22%)
Africanos de Zambia (N = 194) ^a	0	194 (100%)	0	0
Chinos de Hong Kong (N = 573) ^a	0	573 (100%)	0	0
Daneses (N = 350) ^a	27 (3,86%)	323 (92,29%)	27 (7,71%)	0
Esquimales de Groenlandia (O) (N = 41) ^a	3 (3,66%)	38 (92,68%)	3 (7,32%)	0
Esquimales de Groenlandia (E) (N = 96) ^a	0	96 (100%)	0	0
Amerindios de Brasil (N = 324) ^a	0	324 (100%)	0	0
Suecos (N = 200) ^b	5 (1,25%)	195 (97,50%)	5 (2,50%)	0

G: alelo mutado *D105G*. A/A, A/G y G/G: homocigotos salvajes, heterocigotos portadores y homocigotos para la mutación *D105G*, respectivamente.

Los valores son el número de cromosomas (%) para los alelos y el número de individuos (%) para los genotipos. Para los alelos el valor total de N de las poblaciones es Nx2.

^aThiel S *et al* 2007.

^bCarlsson M *et al* 2005.

Estudio de los niveles séricos de MASP-2 en población canaria sana. Correlación entre el genotipo y la concentración sérica de MASP-2.

Evalúamos el significado funcional de las variantes de *MASP2* en individuos sanos de Gran Canaria. La distribución de los niveles séricos de MASP-2 correlacionó significativamente con los genotipos *MASP2*, observándose una disminución marcada en dichos niveles en individuos portadores del alelo mutado *D105G* (figura VIII.2): la comparación entre los tres grupos dio una significación de $p < 0,001$, los individuos heterocigotos mostraron unos niveles séricos de MASP-2 menores que los individuos homocigotos salvajes ($188,45 \pm 31,77$ ng/ml vs. $438,60 \pm 25,32$ ng/ml; $p = 0,002$), estando muy reducidos en los homocigotos mutados ($19,00 \pm 6,00$ ng/ml) ($p = 0,033$ para la comparación homocigotos salvajes vs. homocigotos mutados).

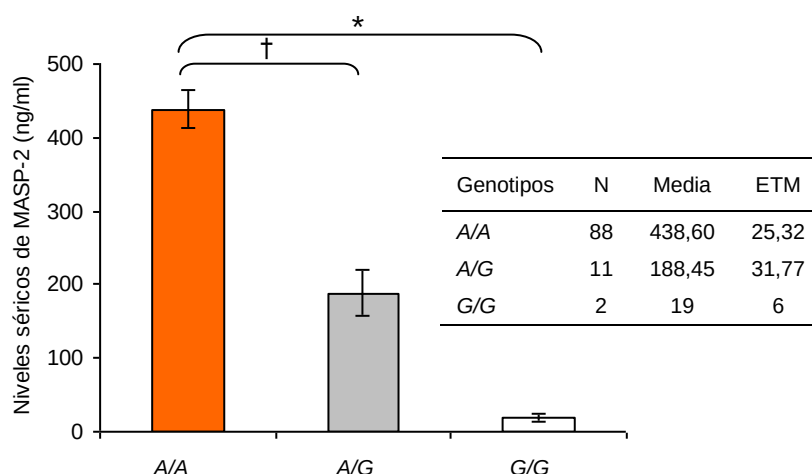


Figura VIII.2. Niveles séricos de MASP-2 (ng/ml) en controles sanos en función de su genotipo *MASP2*. Homocigotos salvajes (A/A) vs. heterocigotos (A/G) vs. homocigotos *D105G* (G/G). Comparación entre los tres grupos: $p < 0,001$; $*p = 0,033$, $^{\dagger}p = 0,002$. A/G vs. G/G = no significativo. Los gráficos muestran la media aritmética y el error estándar de la media.

Actividad en suero del sistema del complemento dependiente de MBL. Correspondencia entre el genotipo de la MASP-2 y la actividad de la vía dependiente de MBL.

Al medir la actividad de la VL dependiente de MBL en función de los genotipos *MASP2* y *MBL2* (figura VIII.3), se observó un descenso marcado de la actividad de la VL en los sujetos insuficientes para MBL respecto a los suficientes; esta diferencia fue significativa en los individuos homocigotos salvajes para el gen *MASP2* ($2,04\% \pm 0,81$ vs. $33,75\% \pm 7,13$ respectivamente, $p < 0,001$), pero no lo fue en los heterocigotos *MASP2*, posiblemente debido al pequeño tamaño muestral de este grupo ($1,67\% \pm 0,88$

vs. $30,50\% \pm 13,98$). La heterocigosidad para el alelo *D105G* de *MASP2*, no mostró tener efecto en la actividad de la VL (figura VIII.3). Los homocigotos *D105G* sí mostraron una actividad de la VL casi nula, como ya ha sido descrito (tabla VIII.3).

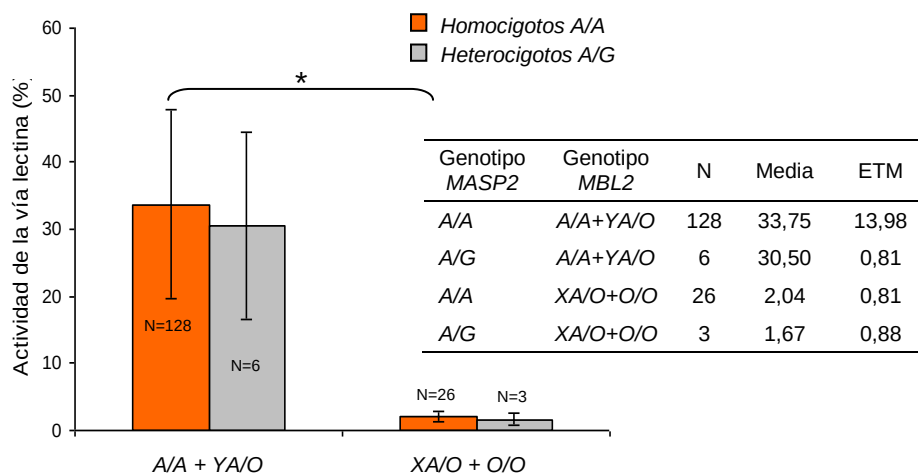


Figura VIII.3. Activación MBL-dependiente de la vía lectina de complemento en controles sanos en función de su genotipo *MBL2* (A/A + YA/O vs. XA/O + O/O) y *MASP2* (homocigotos salvajes, A/A, vs. heterocigotos *D105G*, A/G). * $p < 0,001$. El resto de las comparaciones no difirió significativamente. Los gráficos muestran la media aritmética y el error estándar de la media.

Tabla VIII.3. Genotipos *MBL2* y *MASP2*, niveles séricos de MBL, de *MASP-2* y actividad de la vía de las lectinas dependiente de MBL, de los homocigotos mutados del gen *MASP2*. Los casos 1-3 son los encontrados en el presente estudio; los casos A-C son los publicados por otros grupos hasta la fecha^a.

	Genotipo <i>MBL2</i>	Genotipo <i>MASP2</i>	Niveles séricos de MBL (ng/ml)	Niveles séricos de <i>MASP2</i> (ng/ml)	Actividad LP
Caso 1	YA/YO	G/G	39	13	0%
Caso 2	YA/YA	G/G	2763	25	1,12%
Caso 3 ^b	YA/YA	G/G	D.N.D.	D.N.D.	D.N.D.
Caso A ^c	A/B	G/G	700	<10% niveles normales	<10 mU/μg
Caso B ^d	YA/XA	G/G	1398	D.N.D.	No detectable
Caso C ^e	YA/XA	G/G	2845	43	No actividad

G/G: homocigotos para la mutación *D105G*. D.N.D.: dato no disponible.

^a Existen otros 4 casos citados, pero sin datos (Stover C *et al*, 2005; Thiel S *et al*, 2007).

^b Las determinaciones en suero no pudieron ser realizadas por no disponerse de muestra.

^c Stengaard-Pedersen K *et al*, 2003.

^d Cedzynski M *et al*, 2004.

^e Olesen HV *et al*, 2006.

La tabla VIII.3 muestra el genotipo *MBL2*, así como los niveles séricos de MBL y de MASP-2, y la actividad de la VL de los individuos homocigotos *D105G*. Los tres casos presentaban además niveles normales de C1q, C3 y C4. En los casos 1 y 2 se midió también la función de la VC y la VA, siendo ambas normales en los dos casos.

Asociación de la mutación *D105G* con susceptibilidad a patología.

No se observaron diferencias en las frecuencias alélicas ni genotípicas entre los grupos de pacientes analizados y la población sana (tabla VIII.4). Tampoco se observó ningún individuo homocigoto mutado entre los pacientes. Al analizar diferentes parámetros de gravedad y pronóstico tanto en el grupo de pacientes con NAC, como en un grupo de 89 pacientes con LES, no se encontró asociación con los genotipos *MASP2*.

Tabla VIII.4. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación *D105G* del gen *MASP2* en las diferentes patologías estudiadas. Comparación con individuos sanos.

Genotipos o alelos	Españoles sanos (N=1.083)	Canarios sanos (N=445)	NAC (N=961)	LES (N=130)
A/A	1.032 (95,29)	421 (94,61)	908 (94,48)	120 (92,31)
A/G	48 (4,43)	23 (5,17)	53 (5,51)	10 (7,69)
G/G	3 (0,29)	1 (0,22)	0	0
.....				
G	54 (2,49)	25 (2,81)	53 (2,76)	10 (3,85)

Los valores son el número de cromosomas (%) para los alelos y el número de individuos (%) para los genotipos. Para los alelos el valor total de N de las poblaciones es Nx2.

NAC: pacientes con neumonía adquirida en la comunidad. LES: pacientes con lupus eritematoso sistémico.

DISCUSIÓN

Dada la participación de la MASP-2 en la activación del sistema del complemento, tanto mediada por la MBL, como por las ficolinas L, H y M, el descubrimiento en 2003 (Stengaard-Pedersen K *et al*) de una mutación en el gen *MASP2* que reducía los niveles séricos de esta serina-proteasa, e impedía su asociación a la MBL y las ficolinas, junto con el hecho de que se describiera en un paciente con trastornos autoinmunes e inflamatorios e infecciones graves, en el que la causa aparente era la presencia de esta mutación en homocigosis, suscitó ciertas expectativas sobre la relevancia de esta mutación. En el presente estudio hemos analizado el citado polimorfismo (*D105G*), tanto en relación con su distribución poblacional como en su

posible papel en ciertas enfermedades, así como su efecto en los niveles séricos de MASP-2 y en la actividad de la VL a través de la MBL.

En comparación a otras poblaciones europeas previamente descritas, la frecuencia del alelo *D105G* es ligeramente menor en las poblaciones españolas analizadas que en la ampliamente descrita población danesa, pero la nuestra es mayor (no significativamente) que la otra descrita en un grupo de 104 españoles de Barcelona (0,014) (Lozano F *et al*, 2005). Por otro lado, al igual que ocurre para las variantes exónicas del gen *MBL2*, la frecuencia del alelo variante *D105G* es mayor en canarios que en el resto de las poblaciones españolas estudiadas. La ausencia del alelo mutado *D105G* que observamos en población bereber del Atlas, estaría en concordancia con la aparente exclusividad de esta mutación observada para la población caucásica europea. Si bien Thiel *et al* (2007) encuentran tres alelos mutados en un grupo de 41 esquimales del oeste de Groenlandia, ellos mismos concluyen que ésto puede deberse a una mezcla con genes caucásicos, y que el pequeño tamaño muestral no permite llegar a conclusiones firmes. Por otra parte, Lozano *et al* (2005) encuentran dos alelos *D105G* en 50 árabes norteafricanos, de origen no definido, atendidos en su hospital, pudiendo tratarse de un caso similar al de los esquimales. Esto, junto con la ausencia de esta mutación en las poblaciones africanas sub-saharianas estudiadas (Lozano F *et al*, 2005; Thiel S *et al*, 2007), así como en asiáticos, amerindios e inuits (Thiel S *et al*, 2007), parece indicar que la mutación surgió no sólo después de la divergencia de los caucásicos y los africanos, sino que apareció en los caucásicos europeos después de separarse esta población del resto. Lo que sí queda patente es que esta variante, al igual que ocurre con otras del gen *MASP2* (Lozano F *et al*, 2005; Thiel S *et al*, 2007) presenta una clara distribución geográfica, producto, bien de diferencias genéticas étnicas, de presiones selectivas, o de ambas.

En relación a la homocigosidad *D105G*, en el caso descrito por Stengaard-Pedersen *et al* (2003) los autores proponen que las infecciones graves en este paciente son debidas a la deficiencia de MASP-2, dado que esta deficiencia debería ser más grave que la de la MBL por verse afectada la activación del complemento tanto por la vía de las ficolinas, como por la vía de la MBL (Sorensen R *et al*, 2005; Stengaard-Pedersen K *et al*, 2003). Sin embargo, este paciente presentaba además bajos niveles de C3 y C4 y una función reducida de la VA. Estas disminuciones de la función de la VC y de la VA pueden haber contribuido a su mayor susceptibilidad a infecciones neumocócicas graves. La niña con fibrosis quística descrita por Olesen *et al* (2006) tuvo un grado de enfermedad pulmonar extremadamente grave, sin presentar ninguno de los factores de

riesgo comunes para semejante gravedad (presentaba ausencia de determinadas infecciones crónicas, aparente ausencia de otras inmunodeficiencias, y unas condiciones socio-familiares excelentes, entre otras). Todo esto hizo sugerir a los autores que el defecto de MASP-2 era la causa principal de la gravedad de la enfermedad pulmonar de la paciente, si bien también apuntaron que pudiera requerir la concurrencia de otros factores que deteriorasen el sistema inmunológico. De hecho, ni este ni otro estudio en fibrosis quística (Carlsson M *et al*, 2005) encontraron asociación entre la mutación y la enfermedad. Cabe resaltar que el resto de los casos descritos de los que se poseen datos publicados, no parecen presentar una enfermedad asociada al defecto de la MASP-2, sino más bien ser el resultado de una simple distribución estadística. De hecho, al niño alérgico descrito por Cedzynski *et al* (2004) se le analizó el gen *MASP2*, junto con otros ocho niños de dicho estudio, por tener una actividad de la VL inesperadamente baja, no por tener una presentación más grave que el resto del grupo.

El análisis funcional de la mutación *D105G* confirmó una relación de los niveles séricos de la MASP-2 con la presencia del alelo mutado, siendo la concentración prácticamente nula en individuos homocigotos mutados. Por otra parte, la heterocigosidad para *D105G* demostró no tener influencia sobre la actividad de la VL dependiente de MBL. Las diferencias en dicha actividad estaban marcadas por los genotipos *MBL*. Sin embargo, la homocigosis para *D105G* mostró en nuestros casos, al igual que en los previamente publicados, tener un efecto drástico en la habilidad de activar la VL. Thiel *et al* (2007) interpretan la no correlación entre la concentración de la MASP-2 y la actividad, con la salvedad de los homocigotos mutados, como un indicador de que la MASP-2 está presente en exceso, al menos en caucásicos.

La deficiencia de MASP-2 y de MBL son actualmente consideradas IDPs (Notarangelo L *et al*, 2006; Geha RS *et al*, 2007). La deficiencia de MBL ha sido incluida como una IDP que predispone a infecciones piógenas, aunque con una penetrancia muy baja, advirtiendo que los estudios poblacionales realizados revelan incrementos no detectables de infección en adultos deficientes de MBL (Notarangelo L *et al*, 2006; Geha RS *et al*, 2007). La deficiencia de MASP-2, por otra parte, ha sido incluida en las últimas actualizaciones completas de IDPs como un trastorno del sistema del complemento asociado con infecciones piógenas y con LES (Notarangelo L *et al*, 2006; Geha RS *et al*, 2007). Sin embargo, el hecho de que los tres individuos deficientes de MASP-2 que nosotros hemos encontrado no presenten infecciones relevantes, ni

trastornos autoinmunes ni inflamatorios, indica una baja penetrancia clínica del defecto de MASP-2.

Queda de manifiesto que sería necesario identificar más individuos deficientes de MASP-2 para establecer definitivamente el significado clínico de esta alteración genética del sistema del complemento, que se estima afecta entre 0,4 a 1 individuos de cada mil europeos.

CAPÍTULO IX

RESUMEN Y DISCUSIÓN GENERAL

RESUMEN Y DISCUSIÓN GENERAL

Niveles séricos, funcionalidad y frecuencias génicas de la MBL/gen *MBL2* en la población general.

La considerable variación de la frecuencia de los polimorfismos del gen *MBL2* en diversas poblaciones, y la influencia que dichos polimorfismos tienen en los niveles séricos de la proteína, hacen necesario establecer las frecuencias alélicas y genotípicas en las distintas poblaciones, así como corroborar la correspondencia existente entre el genotipo *MBL2* y los niveles séricos de MBL y la actividad sérica de la VL dependiente de MBL, como paso previo a cualquier estudio de asociación con enfermedad.

El **capítulo IV** de esta memoria confirma la asociación gradual que existe entre los genotipos *MBL2* y los niveles séricos de MBL, así como con la actividad de la VL mediada por MBL. Esta asociación nos permite realizar estudios de este gen agrupando los diversos genotipos existentes, en base a su funcionalidad, como genotipos suficientes e insuficientes. Por otra parte, en dicho capítulo se establecen las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* en población española (incluida la canaria) y bereber, mostrando la concordancia de estas frecuencias con el origen étnico de las poblaciones y permitiendo, además, los posteriores estudios de susceptibilidad a enfermedad.

MBL y el lupus eritematoso sistémico.

El LES es una enfermedad autoinmune multifactorial y poligénica, cuya etiología precisa permanece desconocida. Dada la implicación de la MBL en la activación del sistema del complemento, diversos estudios han tratado de relacionar su defecto con un riesgo aumentado de LES, así como con diversas manifestaciones clínicas de esta enfermedad, si bien los resultados obtenidos han sido contradictorios.

La gran similitud observada en las frecuencias génicas de *MBL2* entre pacientes con LES y controles, tal como se muestra en el **capítulo V**, indica que el defecto de MBL no es un factor de riesgo para el desarrollo de LES en nuestra población. Por otra parte, la menor frecuencia observada de ciertos autoanticuerpos en pacientes con alelos mutados o con genotipos de producción deficiente de MBL, indica que el defecto de MBL sí se asocia con una menor prevalencia de autoanticuerpos en pacientes con LES. Así mismo, la media de edad significativamente mayor que se observó, tanto al inicio de la enfermedad como al diagnóstico de LES, en pacientes con genotipos de producción defectiva, indica que el defecto de MBL también se asocia con una edad más tardía del

comienzo y del diagnóstico de la enfermedad. Conjuntamente, estos resultados sugieren que la deficiencia de MBL es un factor modulador de la enfermedad.

MBL e infección por el VIH.

El papel del complemento en la infección por el VIH es complejo. Los datos previos sobre el papel de la MBL en la susceptibilidad a infección por el VIH y la progresión de la enfermedad son controvertidos. Por un lado, estudios *in vitro* han demostrado que la MBL puede unirse de manera eficiente a la glicoproteína gp-120 de la envoltura del VIH-1, pero por otra parte, se ha visto que el VIH es relativamente resistente *in vitro* a la neutralización por los niveles de MBL presentes normalmente en suero.

El **capítulo VI** muestra los resultados del estudio para polimorfismos del gen *MBL2* realizado en el mayor grupo homogéneo de pacientes con VIH publicado hasta la fecha. Dichos resultados indican que la insuficiencia de MBL no es un factor protector frente a la infección por VIH en nuestra población. La disminución observada en las edades al diagnóstico de VIH en asociación con los alelos y genotipos variantes de *MBL2*, apoyaría un papel de la deficiencia de MBL en la infección por VIH; sin embargo, estos hallazgos podrían explicarse simplemente por un aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas, las cuales llevan a un diagnóstico más temprano de la infección por el VIH en pacientes deficientes de MBL.

MBL y tuberculosis.

La MBL juega un papel en la fagocitosis y en la activación del complemento. Su deficiencia se ha asociado con una susceptibilidad aumentada a enfermedades infecciosas, a pesar de lo cual, los alelos no productores de MBL son comunes en la mayoría de las poblaciones, sugiriendo alguna ventaja selectiva para estos alelos. Una de estas ventajas podría ser una mayor resistencia a patógenos intracelulares, como el *M. tuberculosis*, por lo cual cabría esperar una menor frecuencia del defecto de MBL entre los pacientes con tuberculosis.

Sin embargo, en el estudio presentado en el **capítulo VI**, las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* de los pacientes con TBC sin VIH no difirieron significativamente de las del grupo control. Esto es indicativo de una ausencia de asociación entre las variantes del gen *MBL2* y la TBC, al menos en individuos no inmunocomprometidos.

MBL y tuberculosis en individuos con VIH.

En muchas poblaciones, gran parte del resurgimiento de la TBC puede ser atribuido a la epidemia de infección por el VIH, el cual aumenta considerablemente el riesgo tanto de TBC primaria como de reactivación. Diversos estudios llevan a pensar que, el papel que el defecto de MBL pueda tener en el riesgo de infección, se hace más evidente en el contexto de otro defecto inmunológico, ya sea por una inmunodeficiencia primaria, o secundaria (como es el caso del SIDA), o durante el periodo de vulnerabilidad en la infancia temprana, así como en individuos inmunocomprometidos por quimioterapia.

En el **capítulo VI** se estudia la asociación de las variantes del gen *MBL2* con la TBC en individuos infectados por el VIH. Los resultados muestran una menor frecuencia de alelos y genotipos insuficientes de MBL (en unos casos significativa y en otros no) en estos pacientes con TBC VIH+, que en aquellos VIH sin TBC y que en el grupo control. Esto indica que, los alelos y genotipos insuficientes para MBL, pueden ser un factor débil de protección frente a la TBC en el caso de individuos en los que coexisten otros factores de predisposición que comprometen su sistema inmunológico, como es el caso de los pacientes infectados por el VIH.

MBL y neumonía comunitaria.

La NAC es la causa principal de muerte por infección en los países desarrollados. Su presentación clínica y su evolución resultan de una interacción compleja entre distintos factores, tanto del microorganismo causante, como de la intervención terapéutica y de factores del hospedador. La MBL, debido a su mediación en la fagocitosis y en la activación de la VL del sistema del complemento, ha sido relacionada con diversas patologías infecciosas.

En el **capítulo VII** del presente estudio, se analiza el significado de la variabilidad del gen *MBL2* en la susceptibilidad a y en la gravedad y progresión de la NAC en un amplio grupo de adultos. En primer lugar, la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MBL2* entre pacientes y controles, no apoya que la insuficiencia de MBL tenga un papel en la susceptibilidad a NAC, sino que sugiere que la MBL juega un papel redundante en las defensas humanas frente a la infección primaria en adultos con NAC. Por otra parte, este estudio muestra, por primera vez, evidencias de que la insuficiencia de MBL predispone a formas más graves de sepsis y a desenlace fatal en pacientes con NAC, independientemente de los microorganismos causantes.

Relevancia del defecto de MASP-2.

La mutación *D105G* del gen *MASP2*, descrita en homocigosis en 2003 en un paciente que presentaba trastornos inflamatorios y autoinmunes, e infecciones graves por *S. pneumoniae*, impide la unión de la MASP-2 a la MBL y las ficolinas, no permitiendo la activación de la VL. La deficiencia de MASP-2 y de MBL son actualmente consideradas IDPs, y han sido incluidas en las dos últimas actualizaciones (2006 y 2007) como IDPs que predisponen a infecciones piógenas y, en el caso de la de MASP-2, también a LES.

En la presente memoria, en el **capítulo VIII**, se analiza el citado polimorfismo (*D105G*), tanto en relación con su distribución poblacional, como en su posible papel en enfermedades autoinmune e infecciosas, así como su efecto en los niveles séricos de MASP-2 y en la actividad de la VL a través de la MBL. Se establece una homocigosis esperada para la mutación *D105G* en población española de 6,2 individuos por cada 10.000, y se encuentran tres individuos adultos deficientes de MASP-2 pero, sorprendentemente, los tres son individuos sanos que no muestran infecciones relevantes, ni trastornos autoinmunes o inflamatorios detectables. Por otra parte, tampoco se observa una asociación de la mutación *D105G* con la NAC o el LES. Los resultados de este estudio indican una baja penetrancia clínica del defecto de MASP-2, y muestran la necesidad de estudios adicionales para establecer definitivamente la relevancia clínica de esta alteración.

Hasta la fecha, gran número de estudios han señalado la influencia del defecto de la MBL, tanto en la infección, como en la autoinmunidad. Por una parte, está bien documentada la capacidad de la MBL para unirse a un amplio rango de bacterias, virus, hongos y protozoos. Por otra parte, han sido identificados diversos ligandos endógenos de la MBL (células apoptóticas y necróticas, tejidos isquémicos, células endoteliales anóxicas, células cancerígenas, inmunoglobulinas, ácidos nucleicos, fosfolípidos) (Takahashi K *et al*, 2006).

Artículos de revisión recientes (Garred P *et al*, 2006; Dommett RM *et al*, 2006) exponen diversas ideas interesantes respecto a la evolución y selección de la MBL y los polimorfismos de su gen. La MBL es una molécula muy antigua que, a lo largo de toda la historia de la evolución humana, ha estado sometida a múltiples cambios en las presiones selectivas, debido a diversas causas, como los cambios en el tipo de vida de los homínidos (de nómadas a asentamientos poblados, hábitos alimenticios, etc), en el espectro de enfermedades y, más recientemente, la introducción de los antibióticos y la aparición de terapias inmunosupresivas (si bien estos dos últimos aspectos difícilmente han tenido tiempo de dejar su huella a nivel evolutivo). A pesar de todo esto, las variantes del gen *MBL2* no productoras de proteína, persisten en frecuencias elevadas, con pocas excepciones, a lo largo de todo el planeta. Esto ha llevado inevitablemente a pensar en la existencia de fuerzas selectivas que favorecieran la supervivencia de los portadores de estos alelos, de manera que estos polimorfismos del gen se habrían mantenido por heterosis (ventaja asociada a los individuos heterocigotos). La existencia de ciertas poblaciones con frecuencias de alelos variantes muy elevadas, podrían justificarse debido a efectos fundadores, solos o conjuntamente con el efecto de la deriva genética, lo cual supondría que la MBL no juega ningún papel y su función defectuosa es reemplazada por otras proteínas. Esta idea estaría apoyada por los resultados obtenidos por Verdu *et al* (2006) y Boldt *et al* (2006), como ya se discutió en el capítulo IV. Sin embargo, estas teorías neutralistas dejarían un cabo suelto: la aparición de eventos moleculares distintos, como son las mutaciones del exón 1 del gen *MBL2* en distintos lugares geográficos, lo cual nos vuelve a llevar al concepto de selección, y a las dos teorías, no mutuamente excluyentes, sobre las posibles fuerzas selectivas que han podido mantener en elevada frecuencia estos polimorfismos (defensa frente a patógenos intracelulares y reducción de posibles daños por exceso de activación del complemento). A pesar de todo esto, esas posibles fuerzas selectivas siguen siendo meras hipótesis que ningún estudio hasta la fecha, incluido el presente, han podido confirmar.

Las formas clásicas de herencia mendeliana de inmunodeficiencia son importantes, pero cada vez resulta más evidente que son muchos los genes que participan en la primera línea de defensa del hospedador, y que sus patrones de herencia no siguen necesariamente las reglas de la genética mendeliana.

Un estudio realizado en 2004 (Dahl M *et al*) monitoriza 9245 adultos daneses caucásicos e investiga la asociación del defecto de MBL con el riesgo de infección, otras enfermedades comunes y muerte, durante un periodo de años, no encontrando diferencias significativas en relación a las enfermedades infecciosas o a la mortalidad en individuos deficientes de MBL respecto a no portadores de mutación estructural. Por otra parte, un estudio previo (Tach AN *et al*, 2003) encuentra resultados similares en adultos hospitalizados con fiebre de nueva aparición. A pesar de lo contundente de estos resultados, otros muchos estudios sugieren que la MBL es un factor de predisposición a ciertas enfermedades, o un factor modulador de éstas.

Resulta de utilidad analizar los resultados de otros autores obtenidos en modelos de enfermedad deficientes de MBL, realizados en ratones KO de MBL y sin actividad de la vía MBL-MASP. En un modelo de ratón KO de MBL inoculado con *S. aureus* (Shi L *et al*, 2004) por vía intravenosa, el ratón resultó ser mucho más susceptible a la infección sistémica; cuando el inóculo fue por vía intraperitoneal, no causó un efecto adverso, a menos que al ratón KO se le hubiera inducido también una neutropenia. En otro modelo de KO de MBL (Moller-Kristensen M *et al*, 2006) en que, tras quemadura, se realizó un inóculo de *P. aeruginosa* en el sitio de la herida, todos los ratones KO murieron por septicemia, mientras que sólo un tercio de los de genotipo normal lo hizo; si bien no se observaron diferencias entre ambos grupos respecto a la defensa frente a la bacteria en el lugar del inóculo, sí se observaron diferencias en la contención de la diseminación de la infección. Así pues, estos resultados muestran, al menos en modelos murinos, que la ausencia de MBL favorece la infección bacteriana sistémica y la muerte sólo cuando hay otro factor de predisposición a la infección concomitante, como la neutropenia o la quemadura grave. Estos resultados no hacen más que apoyar una idea ya propuesta por diversos autores desde hace tiempo, y es que el papel de la MBL se aprecia de manera significativa cuando coexiste otro defecto relevante. De hecho, como ya se ha citado a lo largo de esta memoria, son diversas las evidencias que sugieren que la deficiencia de MBL es más relevante cuando la inmunidad está comprometida, ya sea como consecuencia de inmadurez inmunológica, o debido a comorbilidades o

tratamientos médicos. Los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre el desarrollo de TBC en individuos infectados por el VIH, estarían de acuerdo con esta idea.

Respecto a la autoinmunidad, el ratón nulo en MBL (Stuart LM *et al*, 2005) ha mostrado un efecto en el aclaramiento de las células apoptóticas, pero no desarrolla espontáneamente enfermedades autoinmunes, linfoproliferación o expansión de los centros germinales. Así pues, por sí solo, el fallo en el aclaramiento de las células apoptóticas no se asocia directamente con el desarrollo de autoinmunidad en este modelo; la autoinmunidad sería un proceso en el que estarían implicados múltiples genes y la MBL sería, como mucho, un factor modificador del fenotipo autoinmune, como parecen indicar también nuestros resultados.

Desde hace unos cuantos años, diversos grupos se han planteado la posibilidad del uso de MBL como terapia en ciertas situaciones clínicas. Ya en el año 1998 (Valdimarsson H *et al*) se testaron infusiones de MBL purificada de plasma en individuos deficientes de MBL, observándose un reestablecimiento de la MBL sérica y de la opsonización, y sin objetivarse efectos adversos. Ensayos clínicos posteriores en fase I (Valdimarsson H, 2003; Valdimarsson H *et al*, 2004; Petersen KA *et al*, 2006) mostraron, en individuos sanos deficientes de MBL, que esta terapia era segura y útil. Estos ensayos no sólo obtuvieron resultados prometedores, sino que también plantearon ciertas cuestiones. En primer lugar, la vida media de la MBL empleada es corta (entre 18 y 115 horas), de manera que, para mantener los niveles suficientes de MBL en suero, se debería administrar 2 o 3 veces a la semana, convirtiendo esta terapia en costosa y ardua. Por otra parte, si bien no se ha descrito ningún proceso adverso hasta la fecha, la infusión de MBL en individuos deficientes tendría el potencial de inducir efectos negativos, por ejemplo, procesos autoinmunes, o realzar el daño mediado por complemento. Si se confirmara la ausencia de efectos adversos, la terapia con rhMBL podría ser usada eficientemente en individuos con haplotipos de baja producción. Quedaría por esclarecer los candidatos teóricos para beneficiarse de esta terapia. En principio, deberían ser individuos bien definidos, a ser tratados durante periodos cortos, por ejemplo, para profilaxis frente a infección en el contexto de individuos neutropénicos por quimioterapia. El tratamiento de trastornos crónicos sería más complejo. Así, a pesar de lo prometedor de la terapia de reemplazamiento, de momento no es más que un campo de investigación y no una herramienta terapéutica. Se necesitan, en primer lugar, estudios rigurosos de genotipaje de MBL en largas cohortes de pacientes para establecer las asociaciones más importantes con enfermedad e identificar aquellos grupos de pacientes

en los que esta terapia sería más beneficiosa, y posteriores ensayos en estas enfermedades, de manera que la investigación sobre la MBL llegue a su fin último de poder ser útil, pasando de ser una posible herramienta diagnóstica, a ser una herramienta terapéutica en determinados grupos de pacientes.

Finalmente, hay señalar que, si bien desde el primer estudio de las implicaciones clínicas de la deficiencia de MBL hasta la fecha, nuestro conocimiento de la VL ha crecido enormemente, hasta el punto de poderse proponer diversos mecanismos mediante los cuales la MBL puede jugar un papel en la gravedad de distintas enfermedades, queda aún mucho por conocer sobre esta proteína y los procesos en los que está implicada. Desafortunadamente, en base a los conocimientos actuales, no podemos establecer el mecanismo definitivo por el que la insuficiencia de MBL se relaciona con un peor pronóstico en las enfermedades estudiadas en el presente trabajo. Por otra parte, cabe resaltar que el descubrimiento de otros componentes de la VL ha mostrado lo complejo de esta vía del sistema inmunológico, que se extiende más allá de la MBL. Un ejemplo claro fue el descubrimiento en 2003 de la mutación *D105G* del gen *MASP2*, que en homocigosis pasó a ser considerada una IDP. Esto nos lleva a plantearnos la necesidad de más estudios, no sólo en el ámbito de la MBL, sino de las demás MASPs y de las ficolinas, con el fin de averiguar el papel de todas ellas en la VL, así como otras posibles funciones. A la vista de los resultados, la medición funcional de la VL sería tanto o más relevante clínicamente que la mera medición de los niveles de MBL.

CAPÍTULO X

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En base a todo lo previamente expuesto, se llega a las siguientes conclusiones:

A.1. La distribución de los alelos estructurales del gen *MBL2* en población canaria es similar a la de otras poblaciones europeas, si bien, en nuestra población, la frecuencia del alelo *O*, de individuos *O/O* y la heterocigosidad media, son algo mayores que en el resto de las poblaciones europeas y asiáticas estudiadas.

A.2. La distribución de los haplotipos de *MBL2* en la población canaria y en el total de la población española, difiere significativamente de la de población bereber, esquimal, japonesa, africana subsahariana y sudamericana, y de las poblaciones europeas checa y danesa, no difiriendo significativamente de otras poblaciones europeas (alemana, noruega, ni del Reino Unido).

A.3. La población bereber difiere significativamente de la canaria en la frecuencia del alelo estructural *D* y de los haplotipos *LYPA* y *LXPA*, y en la frecuencia del genotipo *A/D*, mientras que se diferencia del conjunto de la población española en la frecuencia del alelo *D*, del haplotipo *LXPA* y del genotipo *A/D*.

A.4. Los niveles séricos de MBL y la actividad de la VL dependiente de MBL varían en función del genotipo *MBL2*, asociándose una menor producción de proteína y una menor actividad a los alelos *X* y *O*. Esto nos permite agrupar los múltiples genotipos de *MBL2* como *genotipos suficientes* y *genotipos insuficientes*.

B.1. Los alelos y genotipos del gen *MBL2* asociados a la producción insuficiente de proteína no son un factor de susceptibilidad de padecer LES.

B.2. El defecto de MBL se asocia a una menor prevalencia de autoanticuerpos y a una edad más tardía del comienzo de la enfermedad y del diagnóstico de LES, lo cual sugiere que la deficiencia de MBL es un factor modulador de la enfermedad.

C.1. El defecto de MBL no es un factor de riesgo de infección por el VIH.

C.2. El defecto de MBL no es un factor protector de padecer TBC activa en individuos VIH-negativos, si bien sí puede ser un factor débil de protección frente a TBC

en individuos VIH-positivos, lo que sugiere que pueda tener un papel en individuos con otros factores para predisposición a TBC, o inmunocomprometidos.

D.1. La insuficiencia de MBL no es un factor de riesgo frente a la infección primaria en adultos con NAC.

D.2. La insuficiencia de MBL predispone a una mayor gravedad (como desarrollar formas más graves de sepsis, fallo respiratorio agudo, fallo multiorgánico, y necesidad de ingreso en UCI) y a un peor pronóstico (muerte en un período de 90 días), independientemente de los microorganismos causantes.

E.1. Las frecuencias alélicas y genotípicas del alelo mutado *D105G* del gen *MASP2* no varían significativamente entre canarios, ni entre el conjunto de españoles, respecto a bereberes. Respecto a la población europea, la frecuencia de genotipos portadores de la mutación es ligeramente mayor en población danesa que en la población española total y que en la canaria en particular, mientras que esta frecuencia es menor, aunque no significativamente, en población sueca.

E.2. Los niveles séricos de MASP-2 varían en función del genotipo *MASP2*, mientras que la actividad de la VL dependiente de MBL, si bien es prácticamente nula en los homocigotos *D105G*, no se ve afectada por la heterocigosidad para dicho alelo.

E.3. La presencia del alelo *D105G* del gen *MASP2* no se asocia con la susceptibilidad ni con la gravedad de enfermedades autoinmunes e infecciosas, como son el LES y la NAC en adultos.

E.4. El hallazgo de tres individuos sanos deficientes de MASP-2, sin infecciones relevantes, ni trastornos autoinmunes o inflamatorios, indica una baja penetrancia clínica del defecto de MASP-2.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. II. Predictor variables for mortality. *J Rheumatol* 1995; 22 (7): 1265-70.

Alagarasu K, Selvaraj P, Swaminathan S, Raghavan S, Narendran G, Narayanan PR. Mannose binding lectin gene variants and susceptibility to tuberculosis in HIV-1 infected patients of South India. *Tuberculosis* 2007; 87 (6): 535-43.

Arai T, Tabona P, Summerfield JA. Human mannose-binding protein gene is regulated by interleukins, dexamethasone and heat shock. *Q J Med* 1993; 86 (9): 575-82.

Bellamy R, Ruwende C, McAdam KPWJ, Thursz M, Sumiya M, Summerfield J, Gilbert SC, Corrah T, Kwiatkowski D, Whittle HC, Hil, AV. MBP deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. *Q J M* 1998; 91 (1): 13-18.

Bellamy R, Beyers N, McAdam KP, Ruwende C, Gie R, Samaai P, Bester D, Meyer M, Corrah T, Collin M, Camidge DR, Wilkinson D, Hoal-Van Helden E, Whittle HC, Amo, W, van Helden P, Hill AV. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (14), 8005-9.

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 (3 Pt 1): 818-24.

Bernig T, Taylor JG, Foster CB, Staats B, Yeager M, Chanock SJ. Sequence analysis of the mannose-binding lectin (MBL2) gene reveals a high degree of heterozygosity with evidence of selection. *Genes Immun* 2004; 5 (6): 461-76.

Bernig T, Breunis W, Brouwer N, Hutchinson A, Welch R, Roos D, Kuijpers T, Chanock S. An analysis of genetic variation across the MBL2 locus in Dutch Caucasians indicates that 3' haplotypes could modify circulating levels of mannose-binding lectin. *Hum Genet* 2005; 118 3-4): 404-15.

Bertoli AM, Fernández M, McGwin G Jr, Alarcón GS, Tan FK, Reveille JD, Vilá LM. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXVI. Influence of mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms in disease manifestations, course, and outcome. *Arthritis Rheum*. 2006; 54 (5): 1703-4.

Blin N and Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 1976; 3 (9): 2303-8.

Bohlson SS, Fraser DA, Tenner AJ. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol Immunol* 2007; 44 (1-3): 33-43.

Boldt AB, Culpi L, Tsuneto LT, de Souza IR, Kun JF, Petzl-Erler ML. Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus. *Hum Immunol* 2006; 67 (9): 722-34.

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 (6): 1644-55.

Bouwman LH, Roep BO, Roos A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Hum Immunol* 2006; 67 (4-5): 247-56.

Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, Walport MJ, Botto M. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to streptococcus pneumoniae infection in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99 (26): 16969-74.

Bultink IE, Hamann D, Seelen MA, Hart MH, Dijkmans BA, Daha MR, Voskuyl AE. Deficiency of functional mannose-binding lectin is not associated with infections in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 (6): R183.

Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, Garcia I, Cabrera P, Lafoz C, Samper S, Takiff H, Afonso O, Pavon JM, Torres MJ, van Soelingen D, Enarson DA, Martin C. Epidemiological

evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164 (7): 1165-70.

Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodriguez JC, Afonso O, Martin C, Pavon JM, Torres MJ, Burgos M, Cabrera P, Small PM, Enarson DA. Exogenous reinfection with tuberculosis on a European Island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001b; 163 (3 Pt 1): 717-20.

Carlsson M, Sjöholm AG, Eriksson L, Thiel S, Jensenius JC, Segelmark M, Truedsson L. Deficiency of the mannan-binding lectin pathway of complement and poor outcome in cystic fibrosis: bacterial colonization may be decisive for a relationship. *Clin Exp Immunol* 2005; 139 (2): 306-13.

Carmona L. Prevalencia e impacto de las enfermedades reumáticas en la población adulta española. 2001. Capítulo VII: 93-100 dentro de "EPISER 2000 Prevalencia e impacto de las enfermedades reumáticas en población adulta española".

Casanova JL, Abel L. Human mannose-binding lectin in immunity: friend, foe or both? *J Exp Med* 2004; 199 (10): 1295-9.

Cedzynski M, Szemraj J, Swierzko AS, Bak-Romaniszyn L, Banasik M, Zeman K. Mannan-binding lectin deficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. *Clin Exp Immunol* 2004; 136 (2): 304-11.

Comstock GW. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the prophet survey. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117 (4): 621-5.

Cywes C, Hoppe HC, Daffe M, Ehlers MR. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect Immun* 1997; 65 (10): 4258-66.

Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. A population-based study of morbidity and mortality in mannose-binding lectin deficiency. *J Exp Med* 2004; 199 (10): 1391-9.

Davies EJ, Snowden N, Hillarby MC, Carthy D, Grennan DM, Thomson W, Ollier WE. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995; 38 (1): 110-4.

Davies EJ, Teh LS, Ordi-Ros J, Snowden N, Hillarby MC, Hajeer A, Donn R, Perez-Pemen P, Vilardell-Tarres M, Ollier WE. A disfunctional allele of the mannose binding protein gene associates with systemic lupus erythematosus in a Spanish population. *J Rheumatol* 1997; 24 (3): 485-8.

Davies EJ, Tikly M, Wordsworth BP, Ollier WER. Mannose-binding Protein gene polymorphism in South African systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1998; 37 (4): 465-6.

Davies PD, Grange JM.. Factors affecting susceptibility and resistance to tuberculosis. *Thorax* 2001; 56 Suppl 2: ii23-9.

Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, Walker A, Mack TM. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992; 35 (3): 311-8.

Delgado JC, Baena A, Thim S, Goldfield AE. Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2002; 186 (10): 1463-8.

Deng SE, Thiel S, Jensenius JC. New perspectives on mannann-binding lectin-mediated complement activation. *Immunobiol* 2007; 212 (4-5):301-11.

Dommett RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 2006; 68 (3): 193-209.

Dossou-Yovo OP, Lapoumeroulie C, Hauchecorne M, Zaccaria I, Ducrocq R, Krishnamoorthy R, Rahimy MC, Elion J. Variants of the mannose-binding lectin gene in the Benin population: heterozygosity for the p.G57E allele may confer a selective advantage. *Hum Biol* 2007; 79 (6): 687-97.

Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2003; 37 (11): 1496-505.

Endeman H, Herpers BL, de Jong BA, Voorn GP, Grutters JC, van Velzen-Blad H, Biesma DH. Mannose-binding lectin genotypes in susceptibility to community acquired pneumonia. *Chest* 2008 (publicado online 18 julio).

Ezekowitz RA, Kuhlman M, Groopman JE, Byrn RA. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *J Exp Med* 1989; 169 (1): 185-96.

- Ezekowitz RA. Role of the mannose-binding lectin in innate immunity. *J Infect Dis* 2003; 187 (Suppl 2): S335-9.
- Fidler KJ, Wilson P, Davies JC, Turner MW, Peters MJ, Klein NJ. Increased incidence and severity of the systemic inflammatory response syndrome in patients deficient in mannose-binding lectin. *Intensive Care Med* 2004; 30 (7): 1438-45.
- 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 (4): 243-50.
- Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Malema S, Crampin AC, Fine PE, Hill AV. Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71 (3): 341-9.
- Font J, Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Nardi N, Ibañez A, Suarez B, Jiménez S, Tàssies D, García-Criado A, Ros E, Sentís J, Reverter JC, Lozano F. Association of mannose-binding lectin gene polymorphisms with antiphospholipid syndrome, cardiovascular disease and chronic damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2007; 46 (1): 76-80.
- Fortin A, Abel L, Casanova JL, Gros P. Host genetics of Mycobacterial diseases in mice and men: forward genetics studies of BCG-osis and tuberculosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007; 8: 163-92.
- Fraser DA, Bohlson SS, Jasinskiene N, Rawal N, Palmarini G, Ruiz S, Rochford R, Tenner AJ. C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression. *J Leukoc Biol* 2006; 80 (1): 107-16.
- Fujita T, Matsushita M, Endo Y. The lectin-complement pathway - its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev* 2004; 198: 185-202.
- Gadjeva M, Kazue T, Thiel S. Mannan-binding lectin_a soluble pattern recognition molecule. *Mol Immunol* 2004; 41 (2-3): 113-21.
- Gaffney PM, Kearns GM, Shark KB, Ortmann WA, Selby SA, Malmgren ML, Rohlf KE, Ockenden TC, Messner RP, King RA, Rich SS, Behrens TW. A genome-wide search for susceptibility genes in human systemic lupus erythematosus sib-pairs families. *PNAS* 1998; 95 (25): 14875-9.
- Garcia-Laorden MI, Manzanedo A, Figuerola A, Sanchez-Garcia F, Rodríguez-Gallego C. Mannose-binding lectin polymorphisms in a Canary Islands (Spain) population. *Genes Immun* 2001; 2 (5): 292-4.
- Garcia-Laorden MI, Rua-Figueroa I, Perez-Aciego P, Rodríguez-Perez JC, Citores MJ, Alamo F, Erausquin C, Rodríguez-Gallego C. Relevance of mannose binding lectin (MBL) polymorphisms as a disease-modulating factor in female systemic lupus erythematosus (SLE) patients from Canary Islands. *J Rheumatol* 2003; 30 (4): 740-6.
- Garcia-Laorden MI, Garcia-Saavedra A, de Castro FR, Violan JS, Rajas O, Blanquer J, Borderias L, Rodriguez-Gallego C. Low clinical penetrance of mannose-binding lectin-associated serine protease 2 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118 (6): 1383-6.
- Garred P, Harboe M, Oettinger T, Koch C, Svejgaard A. Dual role of mannose-binding protein in infections: another case of heterosis?. *Eur J Immunogenet* 1994; 21 (2): 125-31.
- Garred P, Madsen HO, Balslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J, Svejgaard A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of MBL. *Lancet* 1997; 349 (9047): 236-40.
- Garred P, Richter C, Andersen AB, Madsen HO, Mtoni I, Svejgaard A, Shao J. MBL in the Sub-Saharan HIV and tuberculosis epidemics. *Scand J Immunol* 1997b; 46 (2): 204-8.
- Garred P, Madsen HO, Halberg P, Petersen J, Kronborg G, Svejgaard A, Andersen V, Jacobsen S. Mannose-binding Lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42 (10): 2145-52.
- Garred P, Madsen HO, Marquart H, Hansen TM, Sørensen SF, Petersen J, Volck B, Svejgaard A, Graudal NA, Rudd PM, Dwek RA, Sim RB, Andersen V. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. *J Rheumatol* 2000; 27 (1): 26-34.
- Garred P, Voss A, Madsen HO, Junker P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun* 2001; 2 (8): 442-50.

Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. *Mol Immunol* 2003; 40 (2-4): 73–84.

Garred P, Strom JJ, Quist L, Taaning E, Madsen HO. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Dis* 2003b; 188 (9): 1394–403.

Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun* 2006; 7 (2): 85-94.

Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, Hammarström L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck JM, Roifman C, Seger R, Wedgwood J; International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120 (4): 776-94.

Ginzler EM, Diamond HS, Weiner M, Schlesinger M, Fries JF, Wasner C et al. A multicenter study of outcome in systemic lupus erythematosus. I. Entry variables as predictors of prognosis. *Arthritis Rheum* 1982; 25 (6): 601-11.

Gomi K, Tokue Y, Kobayashi T, Takahashi H, Watanabe A, Fujita T, Nukiwa T. Mannose-binding lectin gene polymorphism is a modulating factor in repeated respiratory infections. *Chest* 2004; 126 (1): 95–9.

Gong MN, Zhou W, Williams PL, Thompson BT, Pothier L, Christiani DC. Polymorphisms in the mannose binding lectin-2 gene and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2007; 35 (1): 48–56.

Gordon AC, Waheed U, Hansen TK, Hitman GA, Garrard CS, Turner MW, Klein NJ, Brett SJ, Hinds CJ. Mannose-binding lectin polymorphisms in severe sepsis: relationship to levels, incidence, and outcome. *Shock* 2006; 25 (1): 88–93.

Granell M, Urbano-Ispizua A, Suarez B, Rovira M, Fernández-Avilés F, Martínez C, Ortega M, Uriburu C, Gaya A, Roncero JM, Navarro A, Carreras E, Mensa J, Vives J, Rozman C, Montserrat E, Lozano F. Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2006; 34 (10): 1435-41.

Hajela K, Kojima M, Ambrus G, Wong KH, Moffatt BE, Ferluga J, Hajela S, Gál P, Sim RB. The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs). *Immunobiology* 2002; 205 (4-5): 467-75.

Haldane JBS. Disease and evolution. *La Ricerca Scientifica* 1949; 19: 68-76.

Hansen TK, Thiel S, Dall R, Rosenfalck AM, Trainer P, Flyvbjerg A, Jørgensen JO, Christiansen JS. GH strongly affects serum concentrations of mannan-binding lectin: evidence for a new IGF-I independent immunomodulatory effect of GH. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (11): 5383-8.

Hart ML, Saifuddin M, Spear GT. Glycosylation inhibitors and neuraminidase enhance human immunodeficiency virus type 1 binding and neutralization by mannose-binding lectin. *J Gen Virol.* 2003; 84 (Pt 2):353-60.

Havlic DV, Barnes PF. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1999; 340 (5): 367-73.

Hibberd ML, Sumiya M, Summerfield JA, Booy R, Levin M. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. *Lancet* 1999; 353 (9158): 1049-53.

Hoal-Van Helden EG, Epstein J, Victor TC, Hon D, Lewis LA, Beyers N, Zurakowski D, Ezekowitz AB, Van Helden PD. Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. *Pediatr Res* 1999; 45 (4 Pt 1): 459-64.

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (9): 1725.

Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immuno.* 2003; 21: 547-78.

Horiuchi T, Tsukamoto H, Morita C, Sawabe T, Harashima S, Nakashima H, Miyahara H, Hashimura C, Kondo M. Mannose binding lectin (MBL) gene mutation is not a risk factor for systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) in Japanese. *Genes Immun* 2000; 1 (7): 464-6.

- Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2006; 6 (11): 813–22.
- Huang YF, Wang W, Han JY, Wu XW, Zhang ST, Liu CJ, Hu QG, Xiong P, Hamvas RM, Wood N, Gong FL, Bittles AH. Increased frequency of the mannose-binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients. *Eur J Immunogenet* 2003; 30 (2): 121–4.
- Hundt M, Heiken H, Schmidt RE. Association of low MBL serum concentrations and bacterial pneumonia in HIV infection. *AIDS* 2000; 14 (12): 1853–76.
- Ip WK, Chan SY, Lau CS, Lau YL. Association of systemic lupus erythematosus with promoter polymorphisms of the Mannose-binding Lectin gene. *Arthritis Rheum* 1998; 41 (9): 1663–8.
- Ip WK, Chan KH, Law HK, Tso GH, Kong EK, Wong WH, To YF, Yung RW, Chow EY, Au KL, Chan EY, Lim W, Jensenius JC, Turner MW, Peiris JS, Lau YL. Mannose-binding lectin in severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Infect Dis* 2005; 191 (10): 1697–704.
- Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 2001; 180: 86–99.
- Jakab L, Laki J, Sallai K, Temesszentandrás G, Pozsonyi T, Kalabay L, Varga L, Gombos T, Blaskó B, Bíró A, Madsen HO, Radics J, Gergely P, Füst G, Czirájk L, Garred P, Fekete B. Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene. *Clin Immunol* 2007; 125 (3): 230–6.
- Ji X, Gewurz H, Spear GT. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol Immunol* 2005; 42 (2): 145–52.
- Jonsen A, Bengtsson AA, Sturfelt G and Truedsson L. Analysis of HLA DR, HLA DQ, C4A, FcγRIIa, FcγRIIIa, MBL, and IL-1Ra allelic variants in Caucasian systemic lupus erythematosus patients suggests an effect of the combined FcγRIIa R/R and IL-1Ra 2/2 genotypes on disease susceptibility. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: R557–62.
- Jönsen A, Gullstrand B, Güner N, Bengtsson AA, Nived O, Truedsson L, Sturfelt G. Genetically determined mannan-binding lectin deficiency is of minor importance in determining susceptibility to severe infections and vascular organ damage in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2007; 16 (4): 245–53.
- Jonsson G, Oxelius VA, Truedsson L, Braconier JH, Sturfelt G, Sjöholm AG. Homozygosity for the IgG2 subclass allotype G2M(n) protects against severe infection in hereditary C2 deficiency. *J Immunol* 2006; 177 (1): 722–8.
- Kato-Maeda M, Bifani PJ, Kreiswirth BN, Small PM. The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 2001; 107 (5): 533–7.
- Kelly JA, Moser KL, Harley JB. The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. *Genes Immun* 2002; 3 Suppl 1: S71–S85.
- Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiernemann C. Mechanism of Gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med* 1998; 188 (2): 305–15.
- Klein NJ. Mannose-binding lectin: do we need it? *Mol Immunol* 2005; 42 (8): 919–24.
- Koch A, Melbye M, Sørensen P, Homøe P, Madsen HO, Mølbak K, Hansen CH, Andersen LH, Hahn GW, Garred P. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 2001; 285 (10): 1316–21.
- Kronborg G, Weis N, Madsen HO, Pedersen SS, Wejse C, Nielsen H, Skinhoj P, Garred P. Variant mannose-binding lectin alleles are not associated with susceptibility to or outcome of invasive pneumococcal infection in randomly included patients. *J Infect Dis* 2002; 185 (10): 1517–20.
- Lama J, Planelles V. Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression. *Retrovirology* 2007; 4: 52.
- Lau YL, Lau CS, Chan SY, Karlberg J, Turner MW. Mannose-binding Protein in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39 (4): 706–8.
- Lee SG, Yum JS, Moon HM, Kim HJ, Yang YJ, Kim HL, Yoon Y, Lee S, Song K. Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population. *Mol Immunol* 2005; 42 (8): 969–77.

Lee YH, Witte T, Momot T, Schmidt RE, Kaufman KM, Harley JB, Sestak AL. The mannose-binding lectin gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52 (12): 3966-74.

Lienhardt C, Fielding K, Sillah J, Tunkara A, Donkor S, Manneh K, Warndorff D, McAdam KP, Bennett S. Risk factors for tuberculosis infection in sub-Saharan Africa: a contact study in The Gambia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168 (4): 448-55.

Lindqvist AK, Alarcón-Riquelme ME. The genetics of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1999; 50 (6): 562-71.

Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, Turner MW. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1 (9): 709-15.

Lipscombe RJ, Beatty DW, Ganczakowski M, Goddard EA, Jenkins T, Lau YL, Spurdle AB, Sumiya M, Summerfield JA, Turner MW. Mutations in the human mannose-binding protein gene: frequencies in several population groups. *Eur J Hum Genet* 1996; 4 (1): 13-9.

Liu Y, Endo Y, Iwaki D, Nakata M, Matsushita M, Wada I, Inoue K, Munakata M, Fujita T. Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. *J Immunol* 2005; 175 (5): 3150-6.

Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernandez-Pando R, Huygen K, van Soolingen D. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003; 133 (1): 30-7.

Lozano F, Suarez B, Muñoz A, Jensenius JC, Mensa J, Vives J, Horcajada JP. Novel MASP2 variants detected among North African and Sub-Saharan individuals. *Tissue Antigens* 2005; 66 (2): 131-6.

Maas J, Roda Husman AM, Brouwer M, Krol A, Coutinho R, Keet I, van Leeuwen R, Schuitemaker H. Presence of the variant MBL alleles associated with slower progression to AIDS. *AIDS* 1998; 12 (17): 2275-80.

Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, Svejgaard A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 1994; 40 (1): 37-44.

Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum levels of Mannan-binding protein. *J Immunol* 1995 (6); 155: 3013-20.

Madsen HO, Satz ML, Høgh B, Svejgaard A, Garred P. Different molecular events result in low protein levels of Mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America. *J Immunol* 1998; 161 (6): 3169-75.

Madsen HO, Videm V, Svejgaard A, Svennevig JL, Garred P. Association of mannose-binding lectin deficiency with severe atherosclerosis. *Lancet* 1998b; 352 (9132): 959-60.

Malik S, Arias M, Di Flumeri C, Garcia LF, Schurr E. Absence of association between mannose-binding lectin gene polymorphisms and HIV-1 infection in a Colombian population. *Immunogenetics* 2003; 55 (1): 49-52.

Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, 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. 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: S27-72.

Matsushita M, Hijikata M, Matsushita M, Ohta Y, Mishiro S. Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPA and LYPB with interferon-resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients. *J Hepatol* 1998; 29 (5): 695-700.

Matsushita M, Fujita T. The role of ficolins in innate immunity. *Immunobiol* 2002; 205 (4-5): 490-7.

McBride MO, Fischer PB, Sumiya M, McClure MO, Turner MW, Skinner CJ, Weber JN, Summerfield JA. MBP in HIV-seropositive patients does not contribute to disease progression or bacterial infections. *Int J STD AIDS* 1998; 9 (11): 683-8.

McShane H. Susceptibility to tuberculosis-the importance of the pathogen as well as the host. *Clin Exp Immunol* 2003; 133 (1): 20-1.

Mead R, Jack D, Pembrey M, Tyfield L, Turner M. Mannose-binding lectin alleles in a prospectively recruited UK population. The ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. *Lancet* 1997; 349 (9066): 1669-70.

Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heathley S, Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol* 2002; 56 (6): 630-41.

Moens L, Van Hoeyveld E, Peetermans WE, De Boeck C, Verhaegen J, Bossuyt X. Mannose-binding lectin genotype and invasive pneumococcal infection. *Hum Immunol* 2006; 67 (8): 605-11.

Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003; 56 (7): 481-90.

Moller CH, Svendsen A, Jakobsen L, Sorensen US, Jensenius JC, Thiel S. Binding of MBL, L-ficolin and H-ficolin to purified capsular polysaccharides from *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Immunol.* 2007; 44 (1-3): 216-7.

Moller-Kristensen M, Ip WK, Shi L, Gowda LD, Hamblin MR, Thiel S, Jensenius JC, Ezekowitz RA, Takahashi K. Deficiency of mannose-binding lectin greatly increases susceptibility to postburn infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* 2006; 176 (3): 1769-75.

Mombo LE, Lu CY, Ossari S, Bedjabaga I, Sica L, Krishnamoorthy R, Lapoumeroulie C. Mannose-binding lectin alleles in sub-Saharan Africans and relation with susceptibility to infections. *Genes Immun* 2003; 4 (5): 362-7.

Momot T, Ahmadi-Simab K, Gause A, Gross WL, Gromnica-Ihle E, Peter HH, Manger K, Zeidler H, Schmidt RE, Witte T. Lack of association of mannose binding lectin variant alleles with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006; 65 (2): 278-9.

Motulsky AG. Metabolic polymorphism and the role of infectious diseases in human evolution. *Hum Biol* 1960; 32: 28-62.

Mullighan CG, Heatley S, Doherty K, Szabo F, Grigg A, Hughes TP, Schwarzer AP, Szer J, Tait BD, Bik To L, Bardy PG. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 99 (10): 3524-9.

Nadesalingam J, Dodds AW, Reid KBM, Palaniyar N. Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via the N-Acetyl glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. *J Immunol* 2005; 175 (3): 1785-94.

Nau R, Eiffert H. Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15 (1): 95-110.

Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha MR, Madsen HO, Borrias-Essers MC, Ryder LP, Koch C, Garred P. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33 (10): 2853-63.

Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun* 2000; 68 (2): 688-93.

Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, Bass JB, Broughton WA, Campbell GD, Dean N, File T, Fine MJ, Gross PA, Martinez F, Marrie TJ, Plouffe JF, Ramirez J, Sarosi GA, Torres A, Wilson R, Yu VL; American Thoracic Society. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163 (7): 1730-54.

Notarangelo L, Casanova J-L, Conley ME, Chapel H, Fischer A, Puck J, Roifman C, Seger R, Geha RS; International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. Primary immunodeficiency diseases: an update from the international union of immunological societies primary immunodeficiency diseases classification committee meeting in Budapest, 2005. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117 (4): 883-96.

Nuytinck L, Shapiro F. Mannose-binding lectin: laying the stepping stones from clinical research to personalized medicine. *Personalized Med* 2004; 1 (1): 35-52.

Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, Henson PM. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 2001; 194 (6): 781-95.

Olesen HV, Jensenius JC, Steffensen R, Thiel S, Schiotz PO. The mannan-binding lectin pathway and lung disease in cystic fibrosis-dysfunction of mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) may be a major modifier. *Clin Immunol* 2006; 121 (3): 324-31.

Pastinen T, Liitsola K, Niini P, Salminen M, Syvanen AC. Contribution of the CCR5 and MBL genes to susceptibility to HIV type 1 infection in the Finnish population. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14 (8): 695-8.

Pena MJ, Caminero JA, Campos-Herrero MI, Rodriguez-Gallego JC, Garcia-Laorden MI, Cabrera P, Torres MJ, Lafarga B, Rodriguez Castro F, Samper S, Canas F, Enarson DA, Martin C. Epidemiology of tuberculosis on Gran Canaria: a 4 year population study using traditional and molecular approaches. *Thorax* 2003; 58 (7): 1-6.

Pennycook A, Openshaw P, Hussell T. Partners in crime: co-infections in the developing world. *Clin Exp Immunol* 2000; 122 (3): 296-9.

Perez-Castellano M, Peñaranda M, Payeras A, Mila J, Riera M, Vidal J, Pujalte F, Pareja A, Villalonga C, Matamoros N. Mannose-binding lectin does not act as an acute-phase reactant in adults with community-acquired pneumococcal pneumonia. *Clin Exp Immunol* 2006; 145 (2): 228-34.

Petersen KA, Matthiesen F, Agger T, Kongerslev L, Thiel S, Cornelissen K, Axelsen M. Phase I safety, tolerability, and pharmacokinetic study of recombinant human mannan-binding lectin. *J Clin Immunol* 2006; 26 (5): 465-75.

Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol. Immunol.* 2001; 38 (2-3): 133-49.

Peterslund NA, Koch C, Jensenius JC, Thiel S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet.* 2001; 358 (9282): 637-8.

Piao W, Liu CC, Kao AH, Manzi S, Vogt MT, Ruffing MJ, Ahearn JM. Mannose-binding lectin is a disease-modifying factor in North American patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2007; 34 (7): 1506-13.

Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol* 2000; 76: 227-324.

Pinto F, Cabrera VM, González AM, Larruga JM, Noya A, Hernández M. Human enzyme polymorphism in the Canary Islands. VI. Northwest African influence. *Human Heredity* 1994; 44 (3): 156-61.

Polotsky VY, Belisle JT, Mikusova K, Ezekowitz RA, Joiner KA. Interaction of human mannose-binding protein with *Mycobacterium avium*. *J Infect Dis* 1997; 175 (5): 1159-68.

Rector A, Lemey P, Laffut W, Keyaerts E, Struyf F, Wollants E, Vermeire S, Rutgeerts P, Van Ranst M. Mannan-binding lectin (MBL) gene polymorphisms in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Genes Immun* 2001; 2 (6): 323-8.

Rodriguez JA, Salgado D, Saiz A. MBL deficiency does not associate with recurrent pneumococcal infections in a group of Colombian children. *J Trop Pediatr* 2004; 50 (6): 379-80.

Roy S, Knox K, Segal K, Griffiths D, Moore CE, Welsh KI, Smarason A, Day NP, McPheat WL, Crook DW, Hill AV; Oxford Pneumococcal Surveillance Group. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. *Lancet* 2002; 359 (9317): 1569-73.

Saevarsdottir S, Vikingsdottir T, Vikingsson A, Manfredsdottir V, Geirsson AJ, Valdimarsson H. Low mannose binding lectin predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study. *J Rheumatol* 2001; 28 (4): 728-34.

Schlapbach LJ, Aebi C, Otth M, Leibundgut K, Hirt A, Ammann RA. Deficiency of mannose-binding lectin-associated serine protease-2 with increased risk of fever and neutropenia in pediatric cancer patients. *Pediatr Infect Dis* 2007; 26 (11): 989-94.

Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* 1993; 150 (7): 2920-30.

Schwaeble W, Dahl MR, Thiel S, Stover C, Jensenius JC. The mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) and MASP19: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. *Immunobiology* 2002; 205 (4-5): 455-66.

- Seelen MA, Roos A, Wieslander J, Mollnes TE, Sjöholm AG, Wurzner R, Loos M, Tedesco F, Sim RB, Garred P, Alexopoulos E, Turner MW, Daha MR. Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Methods* 2005; 296 (1-2): 187-98.
- Seelen MA, van der Bijl EA, Trouw LA, Zuiverloon TC, Munoz JR, Fallaux-van den Houten FC, Schlagwein N, Daha MR, Huizinga TW, Roos A. A role for mannose-binding lectin dysfunction in generation of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2005b; 44 (1): 111-9.
- Selander B, Mårtensson U, Weintraub A, Holmström E, Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Truedsson L, Sjöholm AG. Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *J Clin Invest* 2006; 116 (5): 1425-34.
- Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM. Association of functional mutant homozygotes of the MBP gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis in India. *Tuber Lung Dis* 1999; 79 (4): 221-7.
- Seyfarth J, Garred P, Madsen HO. The 'involution' of mannose-binding lectin. *Hum Mol Genet* 2005; 14 (19): 2859-69.
- Shai R, Quismorio FP Jr, Li L, Kwon OJ, Morrison J, Wallace DJ, Neuwelt CM, Brautbar C, Gauderman WJ, Jacob CO. Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. *Hum Mol Genet* 1999; 8 (4): 639-44.
- Shi L, Takahashi K, Dundee J, Shahroor-Karni S, Thiel S, Jensenius JC, Gad F, Hamblin MR, Sastry KN, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin-deficient mice are susceptible to infection with *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* 2004; 199 (10): 1379-90.
- Skalníková H, Freiburger T, Chumchalová J, Grombířková H, Sedivá A. Cost-effective genotyping of human MBL2 gene mutations using multiplex PCR. *J Immunol Methods* 2004; 295 (1-2): 139-47.
- Soborg C, Madsen HO, Andersen AB, Lillebaek T, Kok-Jensen A, Garred P. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J Infect Dis* 2003; 188 (5): 777-82.
- Soborg C, Andersen AB, Range N, Malenganisho W, Friis H, Magnussen P, Temu MM, Changalucha J, Madsen HO, Garred P. Influence of candidate susceptibility genes on tuberculosis in a high endemic region. *Mol Immunol* 2007; 44(9): 2213-20.
- Sorensen R, Thiel S, Jensenius JC. Mannan-binding-lectin-associated serin proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunol* 2005; 27 (3): 299-319.
- Steffensen R, Thiel S, Varming K, Jersild C, Jensenius JC. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *J Immunol Methods* 2000; 241 (1-2): 33-42.
- Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Gadjeva M, Moller-Kristensen M, Sorensen R, Jensen LT, Sjöholm AG, Fugger L, Jensenius JC. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *N Engl J Med* 2003; 349 (6): 554-60.
- Stoiber H, Clivio A, Dierich MP. Role of complement in HIV infection. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 649-74.
- Stoiber H, Kacani L, Speth C, Wurzner R, Dierich MP. The supportive role of complement in HIV pathogenesis. *Immunol Rev* 2001; 180: 168-76.
- Stover C, Barrett S, Lynch NJ, Barker JN, Burden D, Trembath R, Schwaeble W, Veal C. Functional MASP2 single nucleotide polymorphism plays no role in psoriasis. *Br J Dermatol* 2005; 152 (6): 1313-5.
- Stuart LM, Takahashi K, Shi L, Savill J, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. *J Immunol* 2005; 174 (6): 3220-6.
- Sullivan BL, Knopoff EJ, Saifuddin M, Takefman DM, Saarlos MN, Sha BE, Spear GT. Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. Evidence for a role in clearance of virus in vivo. *J Immunol* 1996; 157 (4): 1791-8.
- Sullivan KE, Wooten C, Goldman D, Petri M. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39 (12): 2046-51.
- Sullivan KE, Winkelstein JA. Genetically determined deficiencies of the complement system. In Ochs H, Smith CIE and J Puck eds., *Primary immunodeficiencies: a molecular and genetic approach*. New York, Oxford University Press; 2007, 589-608.

Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW, Summerfield JA. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 1991; 337 (8757): 1569-70.

Summerfield JA, Sumiya M, Levin M, Turner MW. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ* 1997; 314 (7089): 1229-32.

Sutherland AM, Walley KR, Russell JA. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med* 2005; 33 (3): 638-44.

Tacx AN, Groeneveld AB, Hart MH, Aarden LA, Hack CE. Mannan binding lectin in febrile adults: no correlation with microbial infection and complement activation. *J Clin Pathol* 2003; 56 (12): 956-9.

Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Muraki Y, Goto D, Matsumoto I, Wakamiya N, Sumida T. Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005; 64 (2): 311-4.

Takahashi K, Ip WE, Michelow IC, Ezekowitz RA. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Curr Opin Immunol* 2006; 18 (1): 16-23.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25 (11): 1271-7.

Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol* 1992; 90 (1): 31-5.

Thiel S, Frederiksen PD, Jensenius JC. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. *Mol Immunol* 2006; 43 (1-2): 86-96.

Thiel S, Steffensen R, Christensen IJ, Ip WK, Lau YL, Reason IJ, Eiberg H, Gadjeva M, Ruseva M, Jensenius JC. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun* 2007; 8 (2): 154-63.

Tsao BP. Update on human systemic lupus erythematosus genetics. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16 (5): 513-21.

Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996; 17 (11): 532-40.

Turner MW. Mannose-binding lectin in health and disease. *Immunobiol* 1998; 199 (2): 327-39.

Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet* 2000; 2 (3): 305-22.

Valdimarsson H, Stefansson M, Vikingsdottir T, Arason GJ, Koch C, Thiel S, Jensenius JC. Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin (MBL) to MBL-deficient humans. *Scand J Immunol* 1998; 48 (2): 116-23.

Valdimarsson H. Infusion of plasma-derived mannan-binding lectin (MBL) into MBL-deficient humans. *Biochem Soc Trans* 2003; 31(Pt 4): 768-9.

Valdimarsson H, Vikingsdottir T, Bang P, Saevarsdottir S, Gudjonsson JE, Oskarsson O, Christiansen M, Blou L, Laursen I, Koch C. Human plasma-derived mannose-binding lectin: a acute phase I safety and pharmacokinetic study. *Scand J Immunol* 2004; 59 (1): 97-102.

van Emmerik LC, Kuijper EJ, Fijen CA, Dankert J, Thiel S. Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis. *Clin Exp Immunol* 1994; 97 (3): 411-6.

Verdu P, Barreiro LB, Patin E, Gessain A, Cassar O, Kidd JR, Kidd KK, Behar DM, Froment A, Heyer E, Sica L, Casanova JL, Abel L, Quintana-Murci L. Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of MBL2 deficiency alleles. *Hum Mol Genet* 2006; 15 (17): 2650-8.

Verma A, Matta A, Shukla NK, Deo SV, Gupta SD, Ralhan R. Clinical significance of mannose-binding lectin-associated serine protease-2 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2006; 118 (12): 2930-5.

Villarreal J, Crosdale D, Ollier W, Hajeer A, Thomson W, Ordi J, Balada E, Villardell M, Teh LS, Poulton K. Mannose binding lectin and FcγRIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology* 2001; 40 (9): 1009-12.

Vincent JL. Endpoints in sepsis trials: more than just 28-day mortality? *Crit Care Med* 2004; 32 (5 Suppl): S209–13.

Wallace DJ, Podell T, Klinenberg JR, Klinenberg JR, Forouzes S, Dubois EL. Systemic lupus erythematosus-survival patterns. *JAMA* 1981; 245 (9): 934-8.

Walport MJ. Complement deficiency and disease. *Br J Rheumatol* 1993; 32 (4): 269-73.

Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344 (14): 1058-66.

Walsh MC, Shaffer LA, Guikema BJ, Body SC, Shernan SK, Fox AA, Collard CD, Fung M, Taylor RP, Stahl GL. Fluorochrome-linked immunoassay for functional analysis of the mannose binding lectin complement pathway to the level of C3 cleavage. *J Immunol Meth* 2007; 323 (2): 147-59.

Ward MM, Pyun E, Studensky S. Long-term survival in systemic lupus erythematosus. Patient characteristics associated with poorer outcomes. *Arthritis Rheum* 1995; 38 (2): 274-83.

Worthley DL, Bardy PG, Mullighan CG. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Int Med J* 2005; 35 (9): 548-55.

Wright AF, Carothers AD, Pirastu M. Population choice in mapping genes for complex diseases. *Nat Genet* 1999; 23 (4): 397-404.

Yang IA, Seeney SL, Wolter JM, Anders EM, McCormack JG, Tunnicliffe AM, Rabnott GC, Shaw JG, Dent AG, Kim ST, Zimmerman PV, Fong KM. Mannose-binding lectin gene polymorphism predicts hospital admissions for COPD infections. *Genes Immun* 2003; 4 (4): 269-74.

Ying H, Ji X, Hart ML, Gupta K, Saifuddin M, Zariffard MR, Spear GT. Interaction of mannose-binding lectin with HIV type 1 is sufficient for virus opsonization but not neutralization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20 (3): 327-35.

Ytting H, Christensen IJ, Jensenius JC, Thiel S, Nielsen HJ. Preoperative mannan-binding lectin pathway and prognosis in colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54 (3): 265-72.

Ytting H, Christensen IJ, Thiel S, Jensenius JC, Nielsen HJ. Serum mannan-binding lectin-associated serine protease 2 levels in colorectal cancer: relation to recurrence and mortality. *Clin Cancer Res* 2005b; 11 (4): 1441-6.

ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS MÁS EMPLEADAS

ACR: American Collage of Rheumatology.

ANA: Anticuerpos antinucleares.

CRD: Dominio de reconocimiento de carbohidratos (Carbohydrate recognition domain)

dNTP: Deoxinucleótidos trifosfato

dsDNA: ADN de doble cadena.

ELISA: Enzimoinmunoanálisis de adsorción (Enzyme-linked immunoadsorbent assay).

ETM: Error típico de la media.

FMO: Fracaso multiorgánico.

g: Fuerza de la gravedad.

HR: Hazard ratio.

HRP: Peroxidasa del rábano (Horseradish peroxidase).

IC: Intervalo de confianza.

IDP: Inmunodeficiencia primaria.

IGN: Índice de gravedad de la neumonía.

KDa: KiloDalton.

KO (ratón): Ratón nulo (Knock out)

La/SSB: Ribonucleoproteína La.

LES: Lupus eritematoso sistémico.

LPS: Lipopolisacárido.

MASP: Serina-proteasa asociada a MBL (MBL-associated serine-protease).

MBL: Lectina de unión a manosa (Mannose-binding lectin).

NAC: Neumonía adquirida en la comunidad.

NSG: No sepsis grave.

OR: Odds ratio.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction).

PCR-SSP: PCR con oligonucleótidos específicos de secuencia (Sequence specific primers-PCR).

PGN: Peptidoglicano.

RFLP: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction fragment length polymorphisms).

rhMBL: MBL recombinante humana (recombinant human MBL).

Ro/SSA: Ribonucleoproteína Ro.

s: Segundo.

SDM-PCR: PCR con mutagénesis dirigida de sitio (Site directed mutagenesis-PCR).

SDRA: Síndrome de distrés respiratorio agudo.

SG: Sepsis grave.

ShS: Shock séptico.

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SIRS: Síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (Systemic inflammatory response syndrome).

SLAM: Medición de la actividad del lupus sistémico (Systemic lupus activity measure).

SLEDAI: Índice de actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico (Systemic lupus erythematosus disease activity index).

Sm: Antígeno Smith.

TBC: Tuberculosis.

TMB: Tetrametilbencidina.

U1RNP: Ribonucleoproteína U1.

UCI: Unidad de cuidados intensivos.

UT (región): región no traducida (Untranslated region).

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VA: Vía alternativa.

VC: Vía clásica.

VL: Vía de las lectinas.

vs.: *Versus*.

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES RESULTANTES DEL ESTUDIO

García-Laorden MI, Manzanedo A, Figuerola A, Sánchez-García F, Rodríguez-Gallego C. Mannose-binding lectin polymorphisms in a Canary Islands (Spain) population. *Genes Immun.* 2001 Aug;2(5):292-4.

García-Laorden MI, Rúa-Figueroa I, Pérez-Aciego P, Rodríguez-Pérez JC, Citores MJ, Alamo F, Erausquin C, Rodríguez-Gallego C. Mannose binding lectin polymorphisms as a disease-modulating factor in women with systemic lupus erythematosus from Canary Islands, Spain. *J Rheumatol.* 2003 Apr;30(4):740-6.

Garcia-Laorden MI, Pena MJ, Caminero JA, Garcia-Saavedra A, Campos-Herrero MI, Caballero A, Rodriguez-Gallego C. Influence of mannose-binding lectin on HIV infection and tuberculosis in a Western-European population. *Mol Immunol.* 2006 Jul;43(14):2143-50.

García-Laorden MI, García-Saavedra A, de Castro FR, Violán JS, Rajas O, Blanquer J, Borderías L, Rodríguez-Gallego C. Low clinical penetrance of mannose-binding lectin-associated serine protease 2 deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Dec;118(6):1383-6.

Garcia-Laorden MI, Sole-Violan J, Rodriguez de Castro F, Aspa J, Briones ML, Garcia-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 Aug;122(2):368-74, 374.e1-2.

