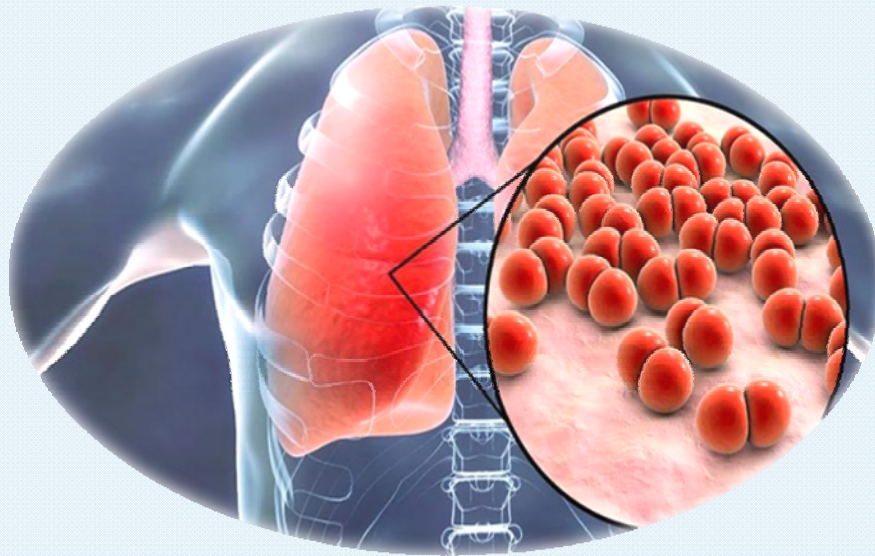


**SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN  
NEUMOCÓCICA EN NIÑOS Y EN  
ADULTOS: DE LOS DEFECTOS  
MENDELIANOS DE LA INMUNIDAD A LOS  
ESTUDIOS GENÉTICOS POBLACIONALES**



**ELISA HERNÁNDEZ BRITO**

2020



**ULPGC • UNIVERSIDAD DE  
LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

PROGRAMA DE DOCTORADO DE INVESTIGACIÓN EN BIOMEDICINA













Hospital Universitario de  
Gran Canaria Doctor Negrín



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Ciencias Médicas  
y Quirúrgicas

El trabajo experimental de la presente memoria fue desarrollado por Dña. Elisa Hernández Brito en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín (HUGCDN).

Este trabajo en su conjunto ha sido desarrollado gracias a las siguientes ayudas públicas: Contrato de personal predoctoral en formación por la ULPGC (BOULPGC 2014.VII. nº 11) y los proyectos de investigación PI13/01456 y PI16/00759 (Ministerio de Economía y Competitividad) y OA18/017 (Fundación Disa).







*A mis padres*

*A Yoni,*



*“Hermoso es lo que vemos. Más hermoso es lo que sabemos. Pero mucho más hermoso es lo que no conocemos”*

*Niels Steensen*



## AGRADECIMIENTOS

Han sido muchas personas las que han hecho posible la realización de esta tesis. Por ello, quiero dejar constancia y agradecer la contribución de todas ellas en este espacio.

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis, Carlos y Felipe, el haberme dado la oportunidad de formar parte de este gran equipo. A Felipe, gracias por estar ahí siempre que lo necesitaba y por todo el apoyo. A Carlos, gracias por contagiarme su pasión y entusiasmo en todo proyecto que se proponía, por animarme siempre a perseguir todas las metas, por las reuniones en su despacho que se convertían en consejos y opiniones sobre la vida. Más que un jefe es un ejemplo a seguir, una persona que admirar repleta de valores y virtudes.

Agradecer a mi tutor, Félix López Blanco, el aceptar la tutela de forma desinteresada y estar al pie del cañón.

A Florentino, jefe del Servicio de Inmunología, por abrirme las puertas del Servicio, preocuparse por mi formación y estar siempre dispuesto a resolver cualquier duda o problema que surgiese.

Agradecer al personal de Inmunología todo su apoyo, charlas en el office y de pasillo: Ana, Pino, Adelaida, JJ, Belén, Isabel Molina, Verónica, Ruth y Maika. En especial a Ana y Pino por ofrecerme siempre una mano cuando la he necesitado. A Adelaida, compañera codo con codo. A Nereida y Maite, aunque ya no estén por ahí, fueron pilares fundamentales, las tardes e incluso madrugadas se hicieron más amenas con su compañía, gracias por enseñarme y estar dispuestas a todo.

Como no, agradecer también al Servicio de Hematología (Cristina, Yanira, Santi, Elena, Marinieves...), mi tercera residencia, por estar siempre ahí, poder usar el comodín de la llamada y acogerme desde el primer día.

Al Servicio de Investigación por dejarme ir “de ocupa” a realizar western blot, ELISAS...en especial a Fran por todos los consejos, apoyo y ánimos. A Jesús María “Josu” por hacer que la bioestadística sea más fácil. Y, cómo no, a Isabel García por compartir conmigo su sabiduría y experiencia, por los buenos ratos, por los gabinetes de crisis para sacar ánimos cuando flaqueaban, por estar siempre ahí.

Por supuesto, agradecer a Jordi Solé, de UMI, Fernando Artilés, de Microbiología, Elena Colino y Milagrosa Santana, de Pediatría, su colaboración y ayuda inestimable: aun sin tiempo y con la soga al cuello buscaban un hueco para dedicar a la investigación y colaborar con nosotros, reflejo de su profesionalidad y vocación.

Gracias a Vladi, compañero de doctorado, por estar en continuo contacto “chivándonos” de lo que nos íbamos enterando para cumplimentar todos los plazos y requisitos del doctorado.

Al ITER y al Servicio de Investigación del hospital La Candelaria dirigida por Carlos Flores (Luis, Ana, Adrián, Alex, Jose, Rafa, Tamara...) por hacer sentirme como en casa, acogerme tan bien durante todo el periodo de aprendizaje de análisis de secuenciación de exomas, sólo me llevo de ellos buenos recuerdos. Gracias a Carlos Flores por acogerme y darme la oportunidad de aprender.

Por su puesto gracias a todos los participantes tanto controles como pacientes, sin ellos estos proyectos no hubiesen sido posibles.

Por último, pero para nada menos importante, agradecer el apoyo incondicional de mi familia. A mis padres, por confiar siempre en mí, por apoyarme y animarme en todo momento y sobre todo por inculcarme que querer es poder y con esfuerzo y perseverancia no hay meta que se resista. Sin estos valores estoy segura que hubiese tirado la toalla a medio camino de lograr la tesis. A mis hermanos, sobrinas y amigos por hacerlo todo más llevadero, por los buenos momentos.

A Chicharrolandia y Lagarteros por todo el apoyo y ánimos, por estar siempre ahí. Una mención especial a Tata y Cele por enseñarme el mundo de la biología desde muy pequeña, por los momentos de Facultad y Laboratorio, por ser un ejemplo a seguir. A tía Rosi, Antonio, Abuela y, aunque ya no esté aquí, a Abuelo por hacerme más fácil los años de estudio en La Laguna, las caminatas, paseos, salidas, los tapers ... infinidad de detalles y buenos momentos que me hicieron sentir como en casa y mostraron todo el cariño y preocupación para que no me faltase de nada en ningún momento. No habrán años en mi vida para agradecerles a todos todo el apoyo.

A Yoni, compañero de vida, por todo el apoyo y comprensión que ha tenido, por aguantarme días y días hablar sobre inmunología aunque le parezca que estoy hablando chino, por no cortarme las alas sino empujarme a volar, por sacarme siempre una sonrisa.

A todos los que por mi mala memoria haya podido dejar atrás.

A todos MIL GRACIAS.

# ÍNDICE

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABLAS

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. <i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	<b>3</b>
1.1. Enfermedades neumocócicas	3
1.2. Predisposición a la enfermedad neumocócica	6
1.2.1. Agente causal	7
1.2.2. Factores socioeconómicos y sociodemográficos	7
1.2.3. Factores adquiridos del huésped	7
1.2.4. Predisposición genética del huésped	8
1.2.4.1. Predisposición monogénica	8
1.2.4.2. Predisposición poligénica	10
1.3. Factores de virulencia y evasión de la respuesta inmune	12
<b>2. El sistema inmunitario: inmunidad innata y adquirida</b>	<b>14</b>
2.1. Inmunidad frente al neumococo	15
<b>3. El sistema del complemento</b>	<b>16</b>
3.1. Activación del sistema del complemento	17
3.1.1. La vía clásica	19
3.1.2. La vía de las lectinas	19
3.1.3. La vía alternativa	20
3.1.4. La vía terminal	21
3.2. Regulación del sistema del complemento	22
3.3. Funciones del sistema del complemento	24
<b>4. Deficiencias del sistema del complemento</b>	<b>26</b>
4.1. Deficiencias del complemento y susceptibilidad a infección	26
4.2. Autoinmunidad, desregulación del complemento y enfermedad	29
4.3. Variación del número de copias del componente C4 del complemento y deficiencia del isotipo C4A o C4B	31
<b>5. Variantes génicas del complemento asociadas con enfermedad o infección</b>	<b>33</b>
<b>II. HIPÓTESIS</b>	<b>37</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
1. Identificar alelos de riesgo de neumonía adquirida en la comunidad y enfermedad neumocócica en genes del sistema del complemento	43
2. Realizar estudios inmunológicos en pacientes pediátricos con enfermedad neumocócica invasiva en la isla de Gran Canaria dirigidos al diagnóstico de inmunodeficiencias primarias.	43
3. Analizar el efecto causal de la inmunodeficiencia primaria producida por la deficiencia de MASP-2	43



<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
<b>1. Grupos de poblaciones estudiadas</b>	<b>47</b>
1.1. Población adulta	47
1.1.1 Pacientes adultos con Neumonía Adquirida en la Comunidad	47
1.1.2 Subgrupos de Neumonía Adquirida en la Comunidad	48
1.1.2.1 Neumonía Neumocócica Adquirida en la Comunidad	48
1.1.2.2 Neumonía Neumocócica No Bacteriémica	48
1.1.2.3 Neumonía Neumocócica Bacteriémica	49
1.1.2.4 Neumonía no Neumocócica	49
1.1.3 Pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico	49
1.1.4 Controles	49
1.2. Población pediátrica	50
1.2.1 Pacientes con enfermedad neumocócica invasiva	50
1.2.2 Pacientes con enfermedad neumocócica invasiva grave	50
1.2.3 Definiciones	51
1.2.3.1 Enfermedad neumocócica invasiva recurrente	51
1.2.3.2 Neumonía complicada	51
1.2.3.3 Neumonía recurrente	51
1.2.3.4 Sepsis	51
1.2.3.5 Fallo vacunal	52
1.3. Recogida de datos	53
<b>2. Estudios genéticos</b>	<b>53</b>
2.1. Aislamiento y purificación de ADN genómico	53
2.2. Análisis de polimorfismos de genes del complemento	54
2.3. Análisis de la deficiencia C2 del complemento	55
2.4. Estudio de la variación del número de copias del gen C4 del complemento	56
2.5. Análisis de la homocigosidad para el alelo p.D102G del gen MASP2 de complemento	57
2.5.1 Análisis del polimorfismo p.D102G del gen MASP2	57
2.5.2 Secuenciación del dominio CUB1	60
2.5.3 Identificación de casos previos	60
<b>3. Microbiología</b>	<b>60</b>
3.1. Aislamiento de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	60
3.1.1 Cultivo microbiológico	60
3.1.2 Identificación molecular.	61
3.2. Serotipado	61
<b>4. Estudios inmunológicos</b>	<b>61</b>
4.1. Niveles de inmunoglobulinas séricas	61
4.2. Evaluación de la inmunidad innata	61
4.3. Subpoblaciones linfocitarias	62
4.4. Ensayos funcionales	65
4.4.1 CD62L shedding	65
4.4.2 Cuantificación de citocinas	67
4.4.3 Evaluación de los niveles séricos de anticuerpos IgG contra polisacárido capsular neumocócico y toxoide tetánico	68
<b>5. Análisis estadístico</b>	<b>69</b>

<b>V. RESULTADOS</b>	<b>73</b>
<b>1. Identificación de alelos de riesgo a neumonía adquirida en la comunidad y enfermedad neumocócica en genes del sistema del complemento</b>	<b>75</b>
1.1. Asociación de variantes genéticas de genes del complemento a neumonía adquirida en la comunidad en adultos	75
1.1.1 Estudio clínico demográfico	75
1.1.1.1 Características clínicas y demográficas	75
1.1.1.2 Gravedad	77
1.1.1.3 Microbiología	77
1.1.2 Estudio de las variantes genéticas de genes de complemento	78
1.1.3 Análisis de las SNVs rs547154 del gen C2 y rs2230199 y rs1047286 del gen C3 en pacientes con NAC total y en subgrupos de NAC	85
1.1.4 Análisis haplotípico y desequilibrio de ligamiento	88
1.1.5 Análisis de complotipos	90
1.1.6 Análisis de la variación del número de copias del gen C4	92
<b>2. Realización de estudios inmunológicos en pacientes pediátricos con enfermedad neumocócica invasiva en la isla de Gran Canaria dirigidos al diagnóstico de inmunodeficiencias primarias.</b>	<b>96</b>
2.1. Características de los pacientes hospitalizados por ENI	96
2.1.1 Características clínicas y demográficas	96
2.1.1 Microbiología	98
2.2. Características clínicas e inmunológicas de los pacientes con ENI grave analizados	100
2.2.1 Características clínicas	100
2.2.2 Características inmunológicas	102
2.2.3 Evaluación de los niveles séricos de anticuerpos IgG contra polisacáridos capsulares neumocócicos y contra toxoide tetánico	106
<b>3. Análisis del posible efecto causal de la inmunodeficiencia primaria producida por la deficiencia de MASP-2</b>	<b>108</b>
3.1. Características demográficas	110
3.2. Distribución de la variante rs72550870 en las distintas poblaciones analizadas	111
3.3. Pacientes descritos hasta el momento en homocigosis para la mutación p.D120G del gen <i>MASP2</i>	112
3.4. Casos descritos de homocigosis para la mutación p.D120G del gen <i>MASP2</i> en la población sana	114
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>115</b>
<b>1. Identificación de alelos de predisposición a la infección neumocócica en genes del sistema del complemento.</b>	<b>117</b>
<b>2. Realización de estudios inmunológicos en pacientes pediátricos con enfermedad neumocócica invasiva dirigidos al diagnóstico de inmunodeficiencias.</b>	<b>128</b>
<b>3. Análisis del posible efecto causal de la inmunodeficiencia primaria producida por la deficiencia de MASP-2</b>	<b>137</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>143</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>147</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>175</b>

## LISTA DE FIGURAS

*Figura 1. Representación de las principales enfermedades neumocócicas.*

*Figura 2. Factores de virulencia de streptococcus pneumoniae.*

*Figura 3. Vías de activación del sistema de complemento.*

*Figura 4. Representación de los distintos reguladores de activación de las vías del sistema de complemento*

*Figura 5. Funciones del sistema de complemento.*

*Figura 6. Susceptibilidad a infecciones más frecuentes debidas a deficiencias de complemento.*

*Figura 7. Variación del número de copias del gen C4 del complemento.*

*Figura 8. Representación del genotipado de la variante p.D120G en el gen MASP2.*

*Figura 9. Esquema del análisis realizado en el estudio de las subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo.*

*Figura 10. Escisión del ligando CD62 (CD62L) en la superficie de los granulocitos en un control sano y un paciente con deficiencia de IRAK-4.*

*Figura 11. Histogramas representativos de la técnica cba mediante citometría de flujo.*

*Figura 12. Frecuencia alélica y genotípica del rs547154 del gen C2 en las distintas poblaciones estudiadas.*

*Figura 13. Frecuencias y asociación alélica y genotípica de las SNV del gen C3 en las distintas poblaciones analizadas.*

*Figura 14. Gráfico de interacción que muestra la interacción entre los genes C2, C3, CFB y CFH de complemento relacionados con susceptibilidad a NNAC*

*Figura 15. Distribución del número de copias del gen (GCN) C4 total, C4A, C4B C4S y C4L en controles sanos y pacientes con neumonía neumocócica adquirida en la comunidad (NNAC).*

*Figura 16. Representación gráfica de la población sujeto de estudio*

*Figura 17. Manifestaciones clínicas de los pacientes con eni grave estudiados*

*Figura 18. Representación gráfica de los niveles séricos de igg contra polisacáridos conjugados y toxoide tetánico.*

*Figura 19. Vía de las lectinas*

*Figura 20. Criterios propuestos por la Fundación Jeffrey Modell para sospechar de inmunodeficiencia primaria en pediatría*

*Figura 21. Representación del modelo genético dependiente de la edad en enfermedades infecciosas graves*

## LISTA DE TABLAS

*Tabla 1. Factores de virulencia de Streptococcus pneumoniae y sus funciones principales*

*Tabla 2. Características clínicas de enfermedades causadas por deficiencias del sistema del complemento*

*Tabla 3. Polimorfismos más destacados en el sistema del complemento asociados a enfermedades*

*Tabla 4. Polimorfismos de genes del complemento analizados*

*Tabla 5. Condiciones de PCR y primers utilizados en el análisis de la deficiencia de C2*

*Tabla 6. Primers utilizados en el análisis de la mutación p.D120G en el gen MASP2*

*Tabla 7. Condiciones de PCR empleadas en el análisis de la mutación p.D120G en el gen MASP2*

*Tabla 8. Panel de anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio de las diferentes subpoblaciones linfocitarias*

*Tabla 9. Recuento de linfocitos en sangre periférica en niños sanos: distribución por edad*

*Tabla 10. Estímulos utilizados en la técnica CD62L shedding*

*Tabla 11. Características demográficas y clínicas de los pacientes con NAC y NNAC*

*Tabla 12. Características microbiológicas de los pacientes con NAC*

*Tabla 13. Información sobre la localización, distribución y efectos conocidos de las SNV analizadas en genes del complemento*

*Tabla 14. Equilibrio de Hardy-Weinberg de las SNV analizadas en controles*

*Tabla 15. Frecuencia genotípica y asociaciones alélicas y genotípicas de SNV de genes del complemento en pacientes con NNAC y en controles*

*Tabla 16. Frecuencia genotípica y asociaciones alélicas y genotípicas de SNV de genes del complemento en pacientes con nac y en controles*

*Tabla 17. Distribución de la frecuencia genotípica en función del modelo de herencia de las snvs de genes de complemento en nnac y en controles*

*Tabla 18. Desequilibrio de ligamiento entre las snvs de los genes de complemento de C2 y CFB*

*Tabla 19. Desequilibrio de ligamiento entre las SNV rs1047286 y rs2230199 del gen C3*

*Tabla 20. Asociación haplotípica de las snvs de los genes C2 y CFB con NNAC y NAC*

*Tabla 21. Asociación haplotípica de las SNV del gen C3 con NNAC y NAC*

*Tabla 22. Asociación entre las variantes genéticas combinadas de los genes C2 y C3 de complemento*

*Tabla 23. Frecuencias del GCN de C4 total, C4A, C4B, C4S y C4L c4b en pacientes con NNAC y controles*

*Tabla 24. Características clínico-demográficas de los pacientes con ENI grave*

*Tabla 25. Factores de riesgo de los pacientes con ENI grave*

*Tabla 26. Fallos vacunales en pacientes con ENI grave*

*Tabla 27. Inmunodeficiencias primarias diagnosticadas en los pacientes pediátricos con ENI grave*

*Tabla 28. Características demográficas de los distintos grupos estudiados*

*Tabla 29. Frecuencias genotípicas de la variante p.D120G del gen MASP2 en los grupos de individuos analizados*

*Tabla 30. Pacientes publicados con deficiencia de MASP-2 debido a la homocigosidad para la mutación p.D120G*

*Tabla 31. Individuos sanos con deficiencia de MASP-2 debido a la homocigosidad para la mutación p.D120G publicados*

*Tabla 32. El sistema de complemento como arma de doble filo: variantes asociadas a riesgo o protección de enfermedades*

## ABREVIATURAS

AcMo: anticuerpos monoclonales específicos

AD: herencia autosómica dominante

AR: herencia autosómica recesiva

C1-INH: inhibidor C1

C4BP: proteína de unión de C4b (*C4 binding protein*)

CAM: complejo de ataque a la membrana

CNV: variación del número de copias (*copy number variation*)

CR1: receptor 1 del complemento o CD35

CTLs: linfocitos T citotóxicos CD8+ (*cytotoxic T lymphocytes*)

DAF: factor acelerador de la degradación o CD55 (*decay acceleration factor*)

DAMPs: patrones moleculares asociados a daño (*damage-associated molecular patterns*)

DMAE: degeneración macular asociada con la edad

EDD: enfermedad de depósitos densos

ENI: enfermedad neumocócica invasiva

ENIi: enfermedad neumocócica no invasiva

GCN: número de copias del gen (*gen copy number*)

GOF: ganancia de función (*gain-of-function*)

GWAS: estudios de secuenciación completa del genoma (*genome-wide association studies*)

ID: inmunodeficiencias

IDP: inmunodeficiencia primaria

IFN- $\gamma$ : interferón gamma

IRAK-4: quinasa 4 asociada al receptor de la interleucina 1

Ig: inmunoglobulina

LCR: líquido cefalorraquídeo

LES: lupus eritematoso sistémico

LOF: pérdida de función (*loss function*)

MASPs: serina-proteasa asociada a MBL

MBL: lectina de unión a manosa

MCP: proteína cofactora de membrana o CD46 (*membrane cofactor protein*)

MG1: dominio de macroglobulina 1

MCH: complejo mayor de histocompatibilidad

MSMD: susceptibilidad mendeliana a enfermedades producidas por micobacterias

MyD88: respuesta primaria de diferenciación mieloide 88

NAC: neumonía adquirida en la comunidad

NAC-ND: neumonía adquirida en la comunidad sin agente etiológico determinado

NAC-OM: neumonía adquirida en la comunidad causada por otro organismo distinto a *Streptococcus pneumoniae*

NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad

NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriana adquirida en la comunidad

NNAC-NB: neumonía neumocócica no bacteriémica adquirida en la comunidad

No-NNAC: neumonía adquirida en la comunidad no neumocócica

OMA: otitis media aguda

OM-NAC: neumonía adquirida en la comunidad debido a otro germen

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns*)

PCP: polisacáridos capsulares neumocócicos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCV: vacuna antineumocócica conjugada

PRM: moléculas reconocedoras de patrones (*pattern recognition molecules*)

PRR: receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptor*)

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real

RCA: reguladores de la activación del complemento (*regulators of complement activation*)

SHUa: Síndrome hemolítico urémico atípico

SNV: variación de un solo nucleótido (*single nucleotide variant*)

Th: linfocitos T colaboradores CD4+ (*T-helper cells*)

TLRs: receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*)

VA: vía alternativa

VC: vía clásica

VL: vía de las lectinas

XL: ligado al cromosoma X

# I. INTRODUCCIÓN

---





## **1. *Streptococcus pneumoniae***

### **1.1. Enfermedades neumocócicas**

*Streptococcus pneumoniae* (neumococo) es una bacteria encapsulada Gram positiva que frecuentemente se encuentra formando parte de la microbiota de la nasofaringe de forma transitoria y asintomática, pero que puede migrar a tejidos y órganos estériles y causar infección. Se estima que el rango de personas portadoras de esta bacteria comensal en la nasofaringe varía del 4-10% en adultos sanos al 20-65% en niños sanos, aunque su prevalencia varía en función de la población, la edad y la localización geográfica (1–5). Este alto porcentaje implica que aquellos individuos portadores puedan transmitir el neumococo al resto de la población y que, además, el microorganismo se propague en el individuo portador y provoque enfermedad neumocócica.

El principal mecanismo de transmisión del neumococo es mediante contacto directo persona-persona a través del contacto directo que se produce entre las secreciones del sistema respiratorio del portador e individuos sanos. Otro mecanismo demostrado de propagación del microorganismo es a través de fómites ya que el neumococo puede crear *biofilms* en objetos inanimados y sobrevivir en el medioambiente durante un largo periodo de tiempo (6,7). En la mayoría de las ocasiones el neumococo coloniza la nasofaringe de forma asintomática durante seis semanas como máximo (5). No obstante, si el hospedador no es capaz eliminar la bacteria inmediatamente después de la colonización, ésta se puede multiplicar, producir alteraciones en la flora no patógena del sistema respiratorio y propagar a otros tejidos y órganos dando lugar a infecciones (8). Este tipo de infecciones causadas por *S. pneumoniae* se conocen como enfermedades neumocócicas.

Las enfermedades neumocócicas causan un amplio rango de enfermedades, desde infecciones comunes del tracto respiratorio superior, como sinusitis, faringitis u otitis media aguda (OMA), a afecciones invasivas graves como empiemas o meningitis. Estas últimas son menos frecuentes pero causan una alta tasa de morbilidad, mortalidad y hospitalización en todo el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades neumocócicas constituyen una de las diez primeras causas de muerte en el mundo. De hecho, en los países con menos recursos económicos, las infecciones de las vías respiratorias inferiores son la principal causa de muerte por una enfermedad transmisible (9).

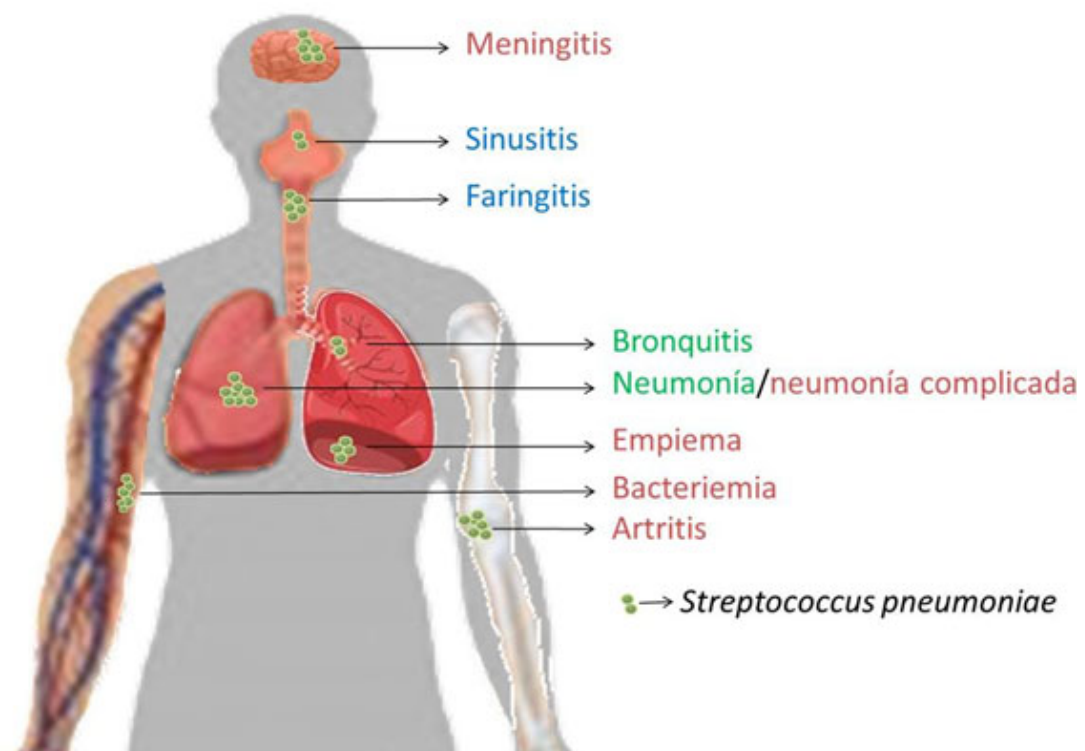
El neumococo afecta a sujetos de todas las edades, aunque los niños pequeños (<2 años) y los ancianos (adultos  $\geq 65$  años) son las poblaciones más afectadas, debido a la

inmadurez inmunológica en el primer caso y a la inmunosenescencia en el segundo (10). En 2016, se produjeron 2.377.697 muertes en el mundo debido a infecciones del tracto respiratorio inferior, que afectaron principalmente a niños menores de 5 años y a adultos mayores de 70. El *S. pneumoniae* fue el agente etiológico responsable en más de la mitad de los casos (11). A pesar de que en los últimos años estas cifras se han ido reduciendo gracias a la introducción de las vacunas neumocócicas conjugadas, el neumococo continúa produciendo cuadros clínicos graves ya que ha desarrollado resistencia a antimicrobianos y se han generado nuevos serotipos con diverso grado de patogenicidad. Hoy en día la neumonía continúa siendo la principal causa de mortalidad entre todas las enfermedades respiratorias e infecciosas, más aún que el sida, la malaria o la tuberculosis (12). Es la principal causa de mortalidad en niños menores de 5 años a nivel mundial (13). La OMS informó que cada 20 segundos un niño muere de neumonía (14). Las estas enfermedades ocasionan un elevado gasto en la sanidad pública. Se estima que en Europa la neumonía supone un coste anual de alrededor de 10 billones de euros, que muy posiblemente se vea incrementado en los próximos años como consecuencia del aumento de la esperanza de vida.

Las enfermedades neumocócicas en función del grado de diseminación del neumococo se clasifican en enfermedades neumocócicas no invasivas (ENNI) e invasivas (ENI). En las ENNI se pueden ver afectadas tanto las vías respiratorias superiores provocando sinusitis, OMA o faringitis, como las vías respiratorias inferiores causando neumonía o bronquitis (**figura 1**) (10,15).

El neumococo causa bronquitis debido a inflamación del epitelio ciliado que recubre el árbol bronquial. Puede producir incremento de las secreciones y dificultad respiratoria. La etiología más frecuente de la bronquitis aguda es vírica, sin embargo, en pacientes con bronquitis crónica, el neumococo ocasiona el 15-25% de los casos (16). La neumonía es una inflamación del parénquima pulmonar debida a un agente infeccioso, puede ser causada por virus, hongos o bacterias. *S. pneumoniae* es, según la mayoría de las series, el agente etiológico más frecuente, provocando además el 56% de las muertes (17); le sigue en frecuencia el *Haemophilus influenzae tipo b*. El virus de la gripe y el virus respiratorio sincitial también son responsables de un número significativo de casos (18). En la actualidad nos enfrentamos a una pandemia causada por un coronavirus, el SARS-CoV-2, responsable de la enfermedad COVID-19 que ha afectado ya a 188 países y ha provocado más de doce millones de casos y más de 550.000 muertes en todo el mundo. En el 75% de los pacientes sintomáticos infectados por el SARS-CoV-2 la enfermedad suele agravarse y causar neumonía (19). Los cuadros más graves afectan principalmente a personas de edad avanzada o con alguna enfermedad de

base. La neumonía no es un proceso único, sino un grupo de infecciones causadas por distintos microorganismos, y que afecta a diferentes tipos de personas, lo que condiciona una epidemiología, una patogenia, un cuadro clínico y un pronóstico diverso. Cuando afecta a la población general se denomina neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Se diferencia así de la que aparece en pacientes ingresados en un hospital o en personas que tienen otros factores de riesgo asociados a una mayor probabilidad de infección por agentes patógenos resistentes a los antimicrobianos (20). La NAC es la más frecuente y es causada principalmente por *S. pneumoniae* (NNAC) tanto en niños como en adultos. Se estima que en adultos el neumococo causa en torno al 19,3% de las NAC en europeos y el 27,3% a nivel mundial (21,22) y en niños el 35% (23). A pesar de que el SARS-CoV-2 está causando grandes estragos económicos, sanitarios y sociales, *S pneumoniae* continua siendo el principal agente etológico de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) en nuestro país.



**Figura 1. Representación de las principales enfermedades neumocócicas.**

A pesar de que individuos sanos sean portadores de *Streptococcus pneumoniae* en la nasofaringe pueden propagarse e invadir diversos tejidos causando enfermedades neumocócicas. Enfermedades neumocócicas no invasivas: en azul se reflejan algunas de las infecciones respiratorias que afectan al tracto superior (como sinusitis y faringitis) y en verde, las que afectan al tracto respiratorio inferior (bronquitis y neumonía); en rojo se representan las enfermedades neumocócicas invasivas (meningitis, neumonía complicada, empiema, bacteriemia y artritis).

La ENI se caracteriza por la presencia de *S. pneumoniae* en tejidos y fluidos corporales que normalmente son estériles, tales como la sangre o el líquido cefalorraquídeo (LCR). Esta infección da lugar principalmente a cuadros clínicos como meningitis, empiemas, absesos, neumonías neumocócicas bacteriémicas o bacteriemias sin foco (**figura 1**) (24). Esta capacidad de infección, como se verá en apartado 1.3 de la presente Tesis Doctoral, se debe a que *S. pneumoniae* tiene diversos factores de virulencia que le permiten evadir la respuesta inmune del hospedador y promover la invasión. En España en 2017, el ratio de ENI fue de 6,6 casos por 100.000 habitantes. Cifras similares a las de la Unión Europea (6,2 casos por 100.000 habitantes). En un estudio realizado en Estados Unidos, con 16.000 casos de ENI adultos, la forma más frecuente fue la neumonía (53%), seguido de bacteriemias sin foco (40%) y meningitis (5%) (25). La meningitis es la presentación clínica más grave de las ENI. El neumococo es el segundo agente etiológico más frecuente de las meningitis bacterianas, ocasionando el 50% de todos los casos en la Unión Europea. El primer agente causal es *Neisseria meningitidis*, pero la tasa de letalidad y las complicaciones neurológicas son mayores en el caso de la meningitis neumocócica, que es responsable del 30% de la tasa de letalidad (26). La mayoría de los casos de meningitis neumocócicas se produce en niños menores de 2 años. En el caso de las bacteriemias ocultas y las neumonías bacteriémicas el neumococo es el principal agente causal. A pesar que la ENI es mucho menos prevalente que la ENnI, la ENI produce alto riesgo de mortalidad (un 10% la meningitis y un 15% la bacteriemia) y los que superan la enfermedad pueden quedar con secuelas significativas (27). En 2015 la OMS estimó que aproximadamente un millón de niños menores de 5 años mueren cada año debido a una infección neumocócica invasiva. Otra ENI es la artritis causada por la infección de las articulaciones y que, a pesar de no ser muy frecuente, es una enfermedad importante en edad pediátrica debido a las secuelas permanentes que produce. La bacteriemia causada por neumococo causa unos 12.000 casos al año y suele ir acompañada de otra infecciones neumocócicas (7). Por tanto, a pesar de que *S.pneumoniae* produce predominantemente una colonización asintomática de la nasofaringe, también puede ocasionar graves problemas de salud de las personas, en especial, en individuos inmunocomprometidos.

### **1.2. Predisposición a la enfermedad neumocócica**

Son diversos los factores asociados a una mayor susceptibilidad y a un peor pronóstico en la EN. Los principales factores de riesgo se definen a continuación.

### 1.2.1 Agente causal

La versatilidad de la bacteria determina diferencias en su capacidad de colonización y de provocar infección, así como de ocasionar cuadros más graves. En concreto, como se verá en el capítulo siguiente, *S. pneumoniae* ha desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmunológica, entre los que destacan las diferencias antigénicas de los polisacáridos capsulares.

### 1.2.2 Factores socioeconómicos y sociodemográficos

Diversos estudios han demostrado que en los hogares con bajos ingresos hay una mayor incidencia de infección neumocócica (28). La malnutrición, los hogares con mala ventilación y la contaminación del aire son factores extrínsecos que también pueden aumentar la incidencia de enfermedad neumocócica. También se ha asociado mayor riesgo de ENI en fumadores pasivos de edad pediátrica, en fumadores activos y en enolismo crónico (29). La etnicidad parece ser un factor de riesgo, dado que se ha observado una mayor susceptibilidad en individuos afroamericanos y nativos americanos. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos determinó en 2016 que la ENI tuvo un ratio de incidencia en americanos blancos de 8,7 en 100.000 mientras que en americanos negros fue 13,9 en 100.000 (30).

### 1.2.3 Factores adquiridos del huésped

Las comorbilidades o el estado de inmunización del huésped también influyen en la susceptibilidad a la infección (28,31). La edad es un factor de riesgo primordial ya que los niños menores de 2 años y las personas mayores de 65 años son más susceptibles. Esto es debido a que el sistema inmunitario de los niños es inmaduro, y a que la respuesta inmune disminuye conforme aumenta la edad (inmunosenescencia) (15). Existen también discrepancias sexuales, el sexo masculino está asociado en la susceptibilidad a la ENI (32). Los pacientes inmunodeprimidos debido a infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o tratamientos inmunosupresores y los pacientes con enfermedades inflamatorias respiratorias crónicas son más susceptibles a la infección neumocócica (33,34). El Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización (ACIP, *Advisory Committee on Immunization Practices*) define como personas de riesgo a enfermedades neumocócicas a aquellas inmunocompetentes por enfermedad pulmonar, cardíaca o hepática crónica, alcoholismo, tabaquismo o por llevar un implante coclear, a personas con asplenia congénita o adquirida y a personas inmunodeprimidas por infección del HIV, cáncer, tratamiento inmunosupresor, trasplante de órganos o inmunodeficiencia congénita o adquirida (35).

### 1.2.4 Predisposición genética del huésped

Actualmente son muchas las evidencias que sugieren un elevado componente hereditario del huésped en la susceptibilidad a las infecciones y en la gravedad con la que cursa la infección (36). Existen distintos tipos de herencia implicados en la predisposición a la infección que pueden clasificarse en monogénica (un solo gen implicado), o poligénica (varios genes implicados). Por otra parte, incluso en el caso de una herencia monogénica, hay genes que pudieran tener un efecto modificador mayor sin llegar a asociarse *per se* a una herencia monogénica.

#### 1.2.4.1 Predisposición monogénica

Diferentes estudios llevados a cabo en distintos grupos étnicos y agregaciones familiares hicieron sospechar que el desarrollo de muchas infecciones podrían tener un patrón de herencia mendeliano (37). Algunos trabajos realizados en gemelos y en familias adoptivas también han contribuido a apoyar la idea de que la predisposición a enfermedades infecciosas tiene una base genética (38). En un estudio se demostró que los niños adoptados tenían mayor riesgo de morir por infección (5,81 veces) si sus padres biológicos habían fallecido por una infección antes de los 50 años. En cambio, si los padres adoptivos eran los que fallecían por infección, el riesgo no aumentaba en los niños adoptados. En el mismo estudio se comprobó que en los casos en que los padres adoptivos fallecían por cáncer, sí que aumentaba el riesgo de fallecimiento por cáncer en los niños adoptados (5,16 veces). Estos resultados llevaron a sugerir que la susceptibilidad a la infección tiene una marcada influencia genética, mientras que en el desarrollo de cáncer estarían implicados principalmente los factores ambientales.

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) son un claro ejemplo de predisposición genética al desarrollo de enfermedades con un patrón de herencia monogénico. Aunque tradicionalmente fueron consideradas como enfermedades muy raras, gracias en gran parte a las nuevas técnicas de secuenciación masiva, su número ha aumentado considerablemente en los últimos años. A comienzos de este siglo se conocían unos 50 defectos genéticos causantes de IDP monogénicas, en 2009, antes de la utilización de técnicas de secuenciación masiva, eran unas 150 y en la actualidad se han descrito más de 430 defectos genéticos causantes de IDP (39), aunque se cree que la cifra es mucho mayor. La razón de que hablemos de enfermedades monogénicas, en vez de mendelianas, es que se ha visto que la penetrancia es muy variable, incluso dentro de una misma familia, por lo que la segregación del fenotipo no sería estrictamente mendeliana. Hasta el momento las IDPs descritas se han clasificado en diez categorías (39): inmunodeficiencias que afectan a la inmunidad celular y humoral,

inmunodeficiencias combinadas con características asociadas o sindrómicas, deficiencia de anticuerpos, enfermedades de desregulación inmunológica, defectos congénitos del número y/o función fagocítica, defectos en la inmunidad innata e intrínseca, trastornos autoinflamatorios, deficiencias del complemento, insuficiencia de la médula ósea y fenocopias de IDP.

Las IDPs pueden tener un patrón de herencia autosómico recesivo (AR), autosómico dominante (AD) o ligado al cromosoma X (XL, *X-linked*) y un fenotipo clínico característico: infecciones graves y/o recurrentes, a menudo ocasionadas por microorganismos oportunistas. De acuerdo a la definición tradicional de las IDP, la afección de un gen genera susceptibilidad a múltiples infecciones. Sin embargo, esta afirmación cada vez es más cuestionable puesto que existen IDPs (no convencionales), en su mayoría con una herencia AR o AD, que predisponen mayoritariamente a un solo tipo de infección (40). En este grupo se encuentra la susceptibilidad mendeliana a enfermedades producidas por micobacterias (MSMD), de la que se han descrito en la actualidad defectos en 16 genes, en algunos casos con distintas formas de herencia para un mismo gen. Estos pacientes son susceptibles a las infecciones por micobacterias debido a defectos génicos que afectan a la integridad de la producción de y/o la respuesta a interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (41). Son ya más de 35 los genes causantes de IDP en los que las mutaciones pueden dar a diferentes IDP dependiendo de las consecuencias funcionales de la mutación. Por ejemplo, un mismo gen puede presentar mutaciones AR, generalmente por pérdida de función (LOF, *loss of function*), AD por ganancia de función (GOF, *gain of function*), AD por dominancia negativa o AD por haploinsuficiencia; y la IDP resultante puede ser diferente dependiendo del tipo de mutación en ese mismo gen. En los últimos años se ha puesto también de manifiesto que una misma IDP puede asociarse a fenotipos inmunológicos y clínicos muy variables, incluso entre miembros de una misma familia. A esta variabilidad hay que añadir que son ya muchas las IDP que predisponen a desregulación inmunológica y autoinmunidad, autoinflamación o cáncer, generalmente como primera y, en ocasiones, única presentación. Puesto que tradicionalmente se ha utilizado el término IDP como enfermedades que predisponen a infecciones recurrentes, sin tener en cuenta otros fenotipos clínicos, en la actualidad se tiende a denominar a este grupo de enfermedades como errores congénitos de la inmunidad. De todos modos, ya que IDP es el término utilizado tradicionalmente, en esta Tesis Doctoral será el término que se utilice.

Las IDPs involucradas en la susceptibilidad a la infección neumocócica son aquellas que afectan a la opsonofagocitosis (deficiencias del complemento, de producción de anticuerpos y asplenia congénita). También están implicadas las IDPs que afectan a la vía de señalización de



los receptores tipo Toll/IL-1R dependiente de Myd88 e IRAK-4, o la señalización mediada por el factor nuclear  $\kappa$ -B (42–45). Actualmente se desconoce con exactitud el mecanismo concreto por el que estas IDPs predisponen selectivamente a la infección por bacterias encapsuladas, aunque se han descrito defectos de producción de anticuerpos IgG frente a polisacáridos y de la generación de linfocitos B productores de IgM (46,47). Es importante destacar que, en estos defectos, las infecciones neumocócicas más frecuentes son las ENI, siendo relativamente raras las infecciones respiratorias. Además de la producción de anticuerpos (en los que son frecuentes principalmente las infecciones del tracto respiratorio), otros defectos como la pérdida de señalización a través de los receptores de IL-1, el defecto de producción de IL-6 u otros mecanismos podrían estar implicados. Sin embargo, se ha observado que los pacientes con deficiencia de Myd88 presentan una clínica más favorable con la edad, al contrario que la mayoría de las IDPs convencionales que suelen empeorar con la edad.

### 1.2.4.2 Predisposición poligénica

La susceptibilidad a infecciones debido a una herencia poligénica implica que varios genes colaboran, con un efecto generalmente menor y con menor penetrancia que en el caso de la herencia monogénica, en desarrollar el fenotipo del paciente. El genotipo característico es variable puesto que está condicionado a los distintos genes que actúan y a los factores ambientales que influyen en la susceptibilidad a la infección. Por tanto, en la herencia poligénica son varios los genes implicados en el desarrollo de la enfermedad, que actúan generalmente de forma aditiva (ningún gen es dominante sobre el resto), aunque puede haber genes con un efecto mayor, y están condicionados a los efectos ambientales, pudiendo observarse también fenómenos de epistasis.

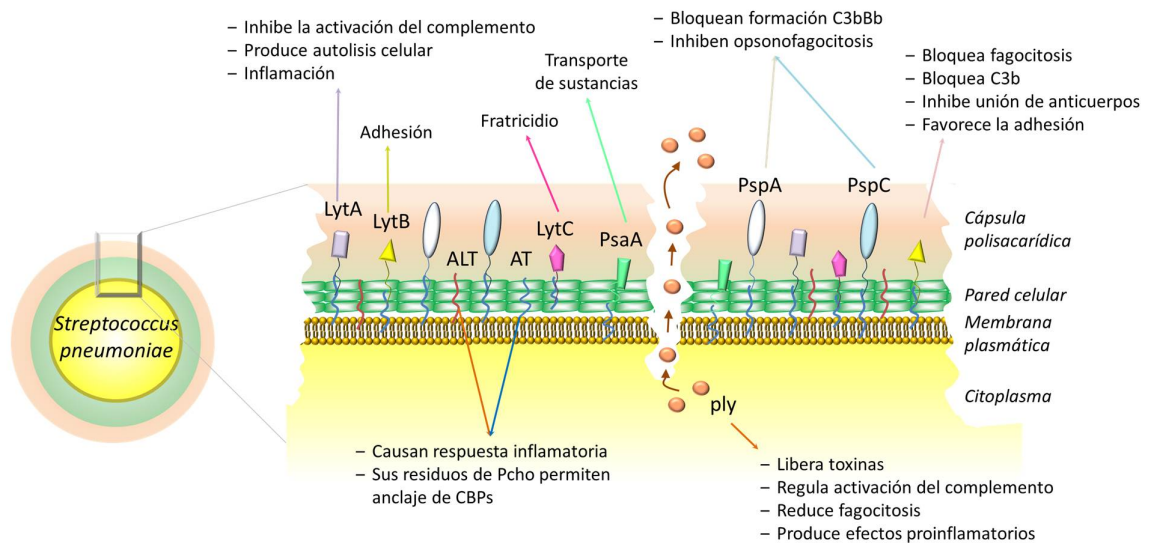
Demostrar que una enfermedad está asociada a una predisposición poligénica es difícil, ya que, por un lado se requiere realizar estudios de asociación (caso-control) con gran tamaño muestral, y por el otro lado la baja penetrancia de cada gen y los efectos aditivos de estos pueden enmascarar los resultados. Los estudios llevados a cabo para investigar las posibles predisposiciones poligénicas a enfermedades se han llevado a cabo mediante el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), definidos como variaciones de un nucleótido en una posición concreta de la secuencia de ADN con una frecuencia de al menos 1%. La definición SNP tiene también implicaciones funcionales, por lo que en la actualidad hay una tendencia a utilizar el término variaciones de un solo nucleótido (SNV, *Single Nucleotide Variant*) independientemente de su frecuencia o del grado de su implicación funcional.

Son varias las SNV que se han asociado a un mayor riesgo de infecciones neumocócicas y de ENI, diversas variantes genéticas en componentes tanto de la respuesta innata como de la adquirida (48,49). Nuestro grupo ha publicado en los últimos años varias variantes que se asocian a la infección neumocócica (50–55). Entre las SNV involucradas por diferentes grupos en la respuesta innata se encuentran en diversos genes como *IRAK4* (quinasa 4 asociada al receptor de la interleucina 1) o *MYD88* (respuesta primaria de diferenciación mieloide 88) que codifican proteínas involucradas de forma específica en la señalización por los todos los TLRs (receptores tipo Toll, *Toll-like receptor*), excepto TLR-3, y en el gen *NEMO* (modulador esencial de NF-Kappa-B) (56–63). El avance en las técnicas de biología molecular ha permitido en los últimos años detectar varias variantes genéticas asociadas a enfermedades neumocócicas (64–67). Sin embargo, son pocas las asociaciones firmemente establecidas, ya que existen controversias en los resultados publicados y, de hecho, estas asociaciones no han sido reproducidas en estudios posteriores. Entre las variantes más estudiadas se encuentran las causantes de la la deficiencia de la lectina de unión a manosa (MBL) del sistema del complemento, debido a que los resultados de los estudios realizados son contradictorios (51,55,68–70). En cuanto a la respuesta adquirida, las variantes génicas que codifican para el receptor FcγRIIa, crucial en la fagocitosis de IgG2, tampoco muestran resultados concluyentes (71,72), aunque nuestros resultados de que una variante del gen *FCGR2A* se asocia a una mayor gravedad de la infección neumocócica, se ha confirmado en estudios posteriores (53).

En consecuencia, la patogénesis de la enfermedad neumocócica en la mayoría de los individuos sigue siendo una incógnita.

### 1.3. Factores de virulencia y evasión de la respuesta inmune

La capacidad de infecciosa del neumococo se ve influenciada por la presencia de diversos factores de virulencia que le proporcionan las herramientas suficientes para evadir la respuesta inmunológica del hospedador. Los principales factores de virulencia de *S. pneumoniae* se basan su capacidad de producir toxinas perjudiciales para el huésped, y de tener una estructura física y proteínas de superficie que le permiten adherirse a las células epiteliales del huésped e interferir en la respuesta inmune (73). En concreto, muchos de los factores de virulencia se basan principalmente en inhibir la deposición de componentes del complemento en su superficie, inhibir la activación del complemento y evadir la opsonofagocitosis. Debido a la extensión y complejidad del sistema de complemento, en el apartado 3 de la presente Tesis Doctoral se explica sus diferentes vías de activación y sus funciones. Los principales factores de virulencia del neumococo y sus funciones se encuentran esquematizados en la **figura 2** y se resumen en la **tabla 1**.



**Figura 2. Factores de virulencia de *Streptococcus pneumoniae*.**

Diversas proteínas expresadas en la superficie del neumococo causan la patogénesis de las enfermedades neumocócicas. Se indica las funciones que realizan los principales factores de virulencia. LytA: amidasa lítica; LytB y LytC: enzimas líticas; ALT: ácido lipoteicoico; AT: ácido teicoico; PsaA: adhesina A de superficie del neumococo; PspA: Proteína A de superficie del neumococo; PspC: Proteína C de superficie del neumococo; ply: neumolisina

**Tabla 1. Factores de virulencia de *Streptococcus pneumoniae* y sus funciones principales**

Factor de virulencia	Localización	Función	Ref.
CPS	Capa de polisacáridos que cubre la pared celular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Evade opsonofagocitosis al bloquear la deposición de C3b y iC3b en su CPS y al evitar el reconocimiento por los receptores del complemento.</li> <li>- Permite la adherencia y colonización de la nasofaringe. La carga negativa de la CPS crea repulsión electrostática con la carga negativa de la mucosa del hospedador facilitando el inicio de la infección.</li> <li>- Principal factor de virulencia del neumococo. Hasta el momento se han descrito más de 95 serotipos basados en las diferencias antigénicas de los polisacáridos capsulares</li> </ul>	(74,75)
LytA	CBP, autolisina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Autólisis celular mediante liberación de neumolisina al medio extracelular produciendo inflamación de los tejidos celulares.</li> <li>- Inhibe activación de la VC (bloquea unión de C1q y de la proteína C reactiva y recluta C4BP)</li> <li>- Atrae al factor H de la VA del complemento</li> </ul>	(4,7,76)
LytB	CBP, autolisina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Implicada en la adhesión a las células endoteliales de la nasofaringe</li> </ul>	(7,18,77)
LytC	CBP, lisozimas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Promueve el fratricidio celular</li> </ul>	(7,18,77)
PspC	CBP, Adhesina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Implicada en la adherencia celular y en la colonización bacteriana</li> <li>- Se une al factor H del sistema del complemento bloqueando la formación de la convertasa de C3 de la VA por lo que disminuye la producción de C3b</li> </ul>	(78–80)
PspA	CBP	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibe deposición de C3b en la superficie bacteriana y la fagocitosis bacteriana tanto a través de la VC (impide unión de C1q a la superficie bacteriana) como de la VA (bloquea la actividad del factor B de la VA)</li> </ul>	(7,77,79)
Lipoproteínas (Ej PsaA)	Proteínas de superficie	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Implicadas en el transporte de sustancias que favorecen la virulencia o la adhesión del patógeno a las células del hospedador.</li> <li>- PsaA proporciona resistencia al estrés oxidativo</li> </ul>	(4,7)
Proteínas con motivos LPXTG	Proteínas de superficie	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Actúan como adhesinas</li> <li>- Actividad enzimática (proteasa o glicosil-hidrolasas).</li> </ul>	(4,7)
Ply	Toxina citoplasmática	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acción citotóxica, forma poros en las membranas celulares del hospedador</li> <li>- Regula la actividad del complemento y reduce fagocitosis</li> <li>- Efectos proinflamatorios</li> </ul>	(81)
Peptidoglicanos, AT y ALT	Componentes de la pared celular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Son PAMPs, promueven la respuesta inflamatoria del hospedador.</li> <li>- Tienen residuos de PCho que sirven de anclaje para las proteínas de unión (CBPs)</li> <li>- Los AT también se encargan de disminuir la carga negativa de la mucosa de la nasofaringe y así evitar su eliminación por la acción de los péptidos antimicrobianos.</li> </ul>	(82,83)
Biofilms		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permite al neumococo colonizar y permanecer en la nasofaringe</li> <li>- Favorece el intercambio genético con las bacterias en su proximidad</li> </ul>	(6,8)

CPS: cápsula polisacáridica; CBPs: proteínas de unión a colinas (*choline-binding proteins*); LytA: Amidasa lítica; VC: vía clásica; C4BP: proteínas de unión de C4b; VA: vía alternativa; PspC: Proteína C de superficie del neumococo;

PspA: Proteína A de superficie del neumococo; PsaA: adhesina A de superficie del neumococo; Ply: neumolisina; PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos; PCho: residuos de fosforilcolina; AT: ácidos teicoicos; ALT: ácidos lipoteicoicos

## 2. El sistema inmunitario: inmunidad innata y adquirida

A pesar de los numerosos factores de virulencia que tiene el neumococo para colonizar la nasofaringe y propagarse, esta colonización no sucede en la mayoría de las ocasiones gracias a la respuesta inmunológica del hospedador, que actúa rápidamente sobre el patógeno y lo elimina antes de que pueda causar una enfermedad neumocócica. Una vez que los microorganismos atraviesan las primeras líneas de defensa (barreras epiteliales y mucosas), se activa tanto la respuesta inmunológica innata (o inespecífica) como la adquirida (adaptativa o específica). La finalidad es combatir al patógeno con la mayor eficacia posible, sin causar daños en el hospedador y asegurar una respuesta eficaz en el caso de que se produzca una reinfección (84).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa frente a patógenos o células extrañas, desencadenando rápidas respuestas para eliminar el posible daño. Además, reconoce estructuras moleculares que le permiten discriminar entre los patógenos y los tejidos del hospedador, por lo que es clave en el mantenimiento de la integridad de los tejidos propios. Entre los principales componentes que la constituyen se encuentran las células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células citolíticas naturales (células NK, *natural killer*), citocinas mediadoras de la inflamación, receptores encargados de reconocer patrones (PRR) moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*). Estos receptores pueden ser celulares como los TLRs, los receptores tipo NOD (NLRs, *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*), los receptores tipo RIG (RLRs, *retinoic acid-inducible gene-I-like receptors*) o los receptores KIR (KIR, receptores tipo inmunoglobulina de las células NK, *Killer-cell immunoglobulin-like receptors*), o solubles, como la MBL del sistema del complemento (85). La inmunidad innata es, además, un elemento clave en la activación de la inmunidad adquirida. Este papel lo desempeñan las células presentadoras de antígeno a los linfocitos T (monocitos/macrófagos) y células dendríticas principalmente, y las citocinas secretadas por ellas. Además, participa el sistema del complemento, puesto que se ha demostrado que está implicado en la diferenciación, proliferación y viabilidad de los linfocitos T y B (86,87). Es importante señalar que otros muchos tipos celulares no específicos del sistema inmunológico participan también en la inmunidad innata y la secreción de citocinas (por ejemplo células endoteliales y epiteliales).

La respuesta efectora de la inmunidad adquirida tiene lugar a los 7-15 días tras la infección. Los componentes que la constituyen, linfocitos T y B, son capaces de reconocer moléculas de los distintos microorganismos y de desarrollar una respuesta específica. Además, se genera memoria inmunológica frente a infecciones previas, con la consiguiente protección frente a futuras infecciones por el mismo patógeno. Estas funciones se llevan a cabo gracias a la capacidad que tienen los distintos componentes que constituyen la inmunidad adquirida de reconocer de forma específica moléculas extrañas, denominadas antígenos. Los componentes de la inmunidad adquirida se pueden distinguir en humorales y celulares. La inmunidad humoral la constituyen los anticuerpos, producidos por los linfocitos B. La inmunidad celular está compuesta por los linfocitos T y B. Los linfocitos T están constituidos por dos subpoblaciones, los linfocitos T colaboradores  $CD4^+$  (Th, *T-helper cells*) y los linfocitos T citotóxicos  $CD8^+$  (CTLs, *Cytotoxic T Lymphocyte*) (88). Las tres principales funciones de los Th consisten en: la primera, en la secreción de citocinas para estimular a los linfocitos B productores de anticuerpos específicos y a los de memoria; la segunda, en activar a los CTLs; y la tercera, en activar a células fagocíticas. En cambio, los CTLs intervienen en la eliminación del patógeno produciendo la apoptosis celular, siendo así importantes en la eliminación de patógenos intracelulares.

### **2.1. Inmunidad frente al neumococo**

Ante una infección neumocócica el sistema inmunológico innato actúa mediante diversos mecanismos para intentar eliminar al patógeno.

En primer lugar las células epiteliales del tracto respiratorio y el moco secretado por las células caliciformes constituyen la primera línea de defensa contra *S.pneumoniae*. La carga negativa de la mucosa y el epitelio ciliado permiten atrapar partículas extrañas y patógenos, que son eliminados del tracto respiratorio a través de la boca al toser o deglutir las secreciones, fenómeno conocido como barrido mucociliar (89). Además, se produce la secreción localizada de citocinas y péptidos antimicrobianos que ayudan a la eliminación del patógeno.

En segundo lugar, las células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos, viajan al lugar de la infección y fagocitan al neumococo provocando su muerte. Además, los macrófagos, mediante señalización de citocinas, atraen a otras células inmunes y actúan sobre células opsonizadas por el sistema del complemento y receptores Fcγ (90). La activación de los macrófagos se produce mediante el reconocimiento de los PAMPs del neumococo a través de varios TLR, al reconocer componentes del neumococo, entre ellos lipoproteínas,

peptidoglicanos y neumolisina neumocócica. La activación de la vía de señalización de todos los TLR, excepto TLR3, es dependiente del adaptador MyD88 y de varias kinasas asociadas a IL-1Rs, (IRAK), entre ellas IRAK-4. La activación de los TLR, además de inducir la liberación de citocinas, está implicada en la respuesta de la inmunidad adquirida, principalmente en la de los linfocitos B.

Los receptores tipo NOD también intervienen en la respuesta frente a neumococo ya que NOD2 es activado por los peptidoglicanos y recluta macrófagos y monocitos al lugar de infección (91). Otro receptor, el NLRP3, también es activado por las neumolisinas de *S. pneumoniae* y activa a los macrófagos. Además, la activación de NLRP3 influye en la formación de un complejo proteico, el inflamasoma, que regula la secreción de IL-1  $\beta$ .

El sistema del complemento está constituido por un conjunto de proteínas que tienen, entre otras funciones, la de promover la opsonofagocitosis y la inflamación, para facilitar la eliminación del microorganismo. El sistema de complemento también participa en la eliminación de células dañadas y células apoptóticas (90). Además, el sistema de complemento es importante para la activación de linfocitos T y B y la producción de anticuerpos. Debido a la complejidad del sistema de complemento y a que su estudio en el contexto de la infección neumocócica es uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral, se desarrollará más extensamente en el siguiente apartado.

Tras varios días de la infección neumocócica, la respuesta inmune adquirida es activada a través de la respuesta humoral y celular. La activación de los linfocitos B conlleva la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos IgG, IgA e IgE conlleva una activación previa del linfocito T por linfocitos T colaboradores, hay producción de anticuerpos, en particular IgM y alguna IgG, independiente de linfocitos T, principalmente frente a los polisacáridos capsulares. Los anticuerpos colaboran en la defensa de la infección neumocócica mediante su capacidad de bloquear su unión a superficies celulares, al actuar como opsoninas y al promover la activación del complemento y su deposición sobre la superficie de neumococo facilitando su opsonofagocitosis

### **3. El sistema del complemento**

El sistema del complemento se descubrió a fines del siglo XIX por Fodor (1887), Nuttall (1888) y Buchner (1889) al describir un "factor" capaz de inducir la lisis bacteriana. Posteriormente, Bordet estableció que esa capacidad lítica del suero dependía de dos factores, uno termoestable (los anticuerpos) y otro capaz de inactivarse al que denominaron "alexina". Al observar que el efecto lítico no se producía si faltaba uno de los "factores", Ehrlich lo

denominó, en 1899, “complemento”, término que se adoptó universalmente (92). Desde ese momento hasta la actualidad han continuado las investigaciones sobre la composición y funciones que desempeña el sistema del complemento.

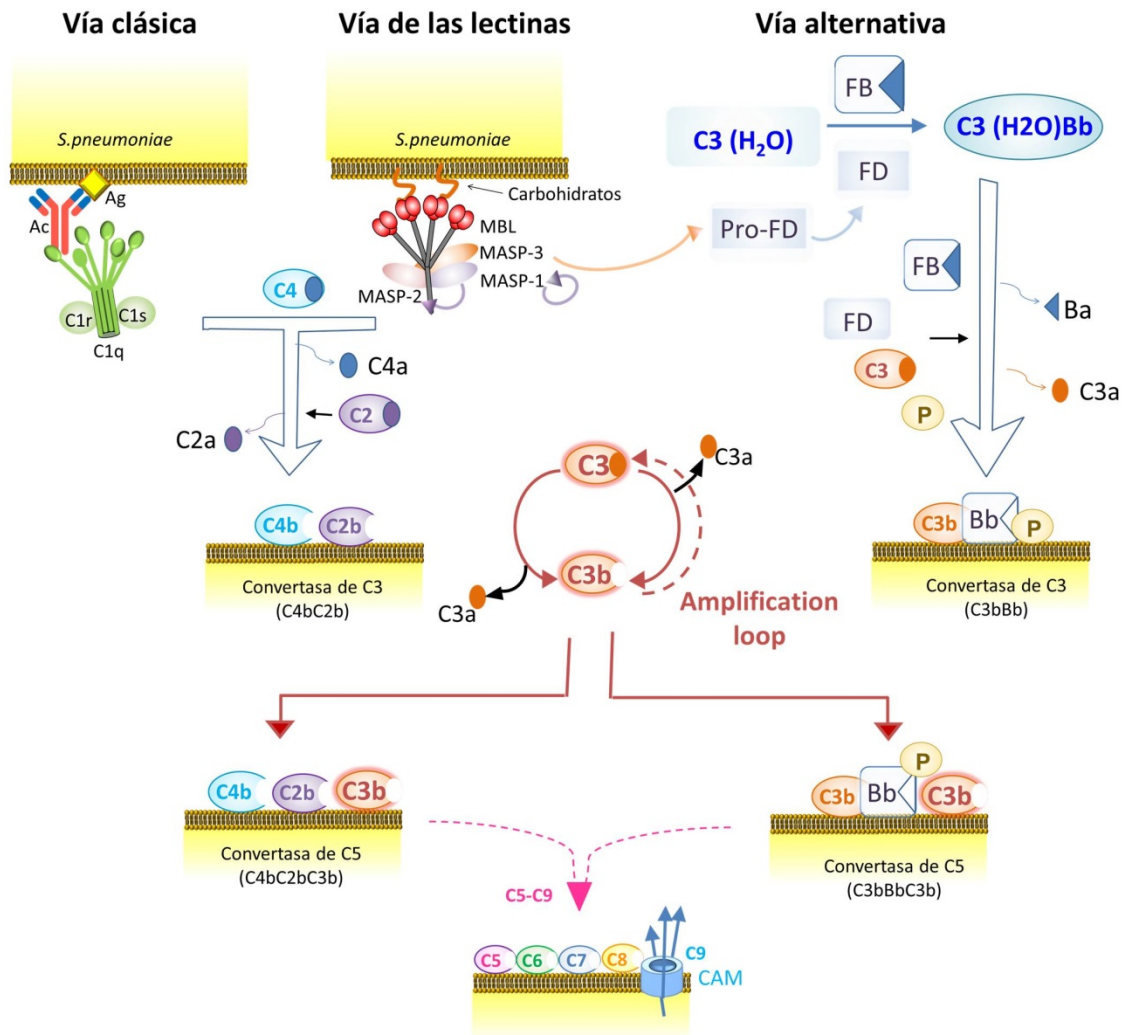
Actualmente se sabe que el sistema del complemento es un mecanismo de defensa crucial en la inmunidad innata. Se encarga de la defensa del huésped frente a infecciones, de la respuesta humoral e inflamatoria así como de la eliminación de inmunocomplejos y de células apoptóticas (93).

### 3.1. Activación del sistema del complemento

El sistema del complemento está compuesto por más de 50 proteínas. La mayoría son proteínas séricas solubles y producidas principalmente en el hígado. Además, hay proteínas de complemento que se localizan en la superficie celular, actuando muchas de ellas como proteínas reguladoras del complemento (94). En condiciones normales los componentes del complemento permanecen inactivos como zimógenos. Sin embargo, en presencia de microorganismos o células extrañas se produce la activación del complemento a través de la activación enzimática de las proteasas (95). Esta activación conlleva una cascada de activación rápida que se va amplificando a medida que se van activando moléculas en cada fase de la cascada.

Se han descrito tres vías de activación del complemento en función del elemento que desencadene la respuesta: la vía clásica (VC), la vía de las lectinas (VL) y la vía alternativa (VA). La VC es activada por la formación de complejos antígeno-anticuerpo o la proteína C reactiva; la VL se activa por la unión de moléculas reconocedoras de patrones (*pattern recognition molecules*, PRMs), capaces de reconocer patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*) o a PAMPs; y la VA, que se activa espontáneamente en suero y se amplifica tras el reconocimiento de moléculas localizadas en la superficie de los patógenos (**figura 3**). A pesar de que las fases iniciales de las tres vías difieren, todas ellas convergen en la activación de la molécula de C3, la cual genera los fragmentos C3a y C3b fundamentales en las tres vías. C3b permite continuar la activación del complemento y será el desencadenante de la vía lítica ya que permite, en la vía terminal, la formación del complejo de ataque a la membrana (CAM) y, por tanto, la destrucción celular (96). Estas vías a su vez van a estar controladas por proteínas reguladoras y efectoras favoreciendo o inhibiendo la activación de la vía según la presencia o no de células extrañas o de patógenos. De este modo se consigue por un lado evitar el daño celular del propio huésped y por otro garantizar la destrucción de los agentes no deseados.





**Figura 3. Vías de activación del sistema del complemento.**

La vía clásica, VC, se activa al unirse el complejo de antígenos (Ag) y anticuerpos (Ac) a C1q; la vía de las lectinas, VL, se activa al reconocer las PRMs (moléculas reconocedoras de patrones) como la MBL a los carbohidratos de los patógenos conocidos como PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos); la vía alternativa, VA, está continuamente activa debido a la hidrólisis espontánea de C3 (C3(H<sub>2</sub>O)). Todas las vías convergen en la formación de la convertasa de C3 (C4bC2b en la VC y VL y C3bBb en la VA). El C3b formado genera una retroalimentación (*amplification loop*) favoreciendo una rápida respuesta de la VA. La opsonina C3b producida da lugar a la formación de la convertasa de C5 (C4bC2bC3b en la VC y VL y C3bBbC3b en la VA). Tras la hidrólisis de C5, se inicia la vía terminal (C5-C9) y se forma el complejo de ataque a la membrana (CAM) que culmina con la lisis del patógeno.

### 3.1.1 La vía clásica

La VC es activada por la formación de inmunocomplejos al unirse la IgM o ciertos isotipos de IgG al antígeno. Esta unión produce un cambio conformacional que permite que las regiones de la fracción constante (Fc) de los anticuerpos se unan a C1q, el primer componente de la vía clásica, y se active la vía. Otras moléculas como la proteína C reactiva o la Pentraxina 3 (PTX3) también pueden formar inmunocomplejos y activar la vía clásica. C1 es un complejo macromolecular dependiente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) formado por tres subunidades (C1q-C1r-C1s): la proteína globular C1q, dos moléculas de C1r y otras dos de C1s. Para que la unión de C1q al anticuerpo sea estable deben establecerse múltiples uniones con las regiones Fc. Esta alta afinidad de C1q por las regiones Fc de las inmunoglobulinas recluta a C1r y C1s activándolas y adquiriendo actividad enzimática por lo que se forma el complejo C1 activo (C1q-C1r-C1s).

El complejo poli-Fc-C1q-C1r-C1s causa la hidrólisis de C4 debido a la actividad proteasa de C1s generando los fragmentos C4b y C4a. Consecutivamente se produce la fragmentación de C2 dando lugar a C2a y C2b. Se genera por tanto, dos fragmentos grandes, C4b y C2b, y dos fragmentos pequeños, C4a y C2a. Gracias al enlace tioéster que queda expuesto en C4b, al ser activada la molécula se favorece la unión covalente a la superficie del microorganismo que desencadenó su activación. C2b permanece unido a C4b generando la convertasa de C3 de la VC (C4bC2b) (86). Antiguamente al complejo formado por la convertasa de C3 se denominaba, C4bC2a, debido a que el fragmento grande de escisión de C2, C2b, se conocía como C2a. (97) **(figura 3)**.

### 3.1.2 La vía de las lectinas

La VL se desencadena por la unión de las PRMs a PAMPs o DAMPs. Los PRMs identificados en la VL son: MBL, ficolina-1, -2 y -3, y colectina-10 y -11. Son proteínas oligoméricas similares a C1q (98) que circulan en el suero formando heterocomplejos con las serina-proteasas asociada a MBL (MASPs). La cascada proteolítica de la VL se inicia tras la unión de los PRMs a sus ligandos, particularmente carbohidratos o grupos acetilos en la superficie de los microorganismos o de células dañadas. Se conocen tres MASPs, MASP-1 MASP-2 y MASP-3 que son serina-proteasas equivalentes a C1r y C1s. MASP-2 es, junto con MASP-1, indispensable en la activación de la VL **(figura 3)** (98–100).

Una vez que los PRMs reconocen y se unen a los PAMPs de los patógenos, se inducen cambios conformacionales en los PRMs que permiten la activación de MASP-2 y MASP-1. La activación de MASP-2 tiene como consecuencia la hidrólisis tanto de C4 como de C2, mientras

que MASP-1 puede hidrolizar a C2, pero no a C4, y activar a MASP-2. Al igual que en la VC, una vez producida la activación de la VL, se formará la convertasa C4bC2b. La función de MASP-3 continúa siendo un enigma, sin embargo, parece ser que al menos una de sus funciones es la de cortar el precursor del factor D (pro-fD) para que se produzca la activación y maduración del factor D (fD) y así desencadenar la activación de la vía alternativa (97,101).

### 3.1.3 La vía alternativa

La VA está continuamente activada debido a la hidrólisis espontánea de C3 en la fase líquida, que da lugar a su forma activa C3(H<sub>2</sub>O). Este proceso en el que se mantiene activa la VA es conocido como *tick-over*, y asegura una respuesta inmediata del sistema del complemento cuando es requerido. Tras la hidrólisis, el dominio tioéster de C3 queda expuesto favoreciendo la unión con el factor B (fB), una serina proteasa dependiente de Mg<sup>2+</sup>. El fB unido a C3(H<sub>2</sub>O) es posteriormente hidrolizado por otra serina proteasa, el fD, que permite la formación de la convertasa C3 inicial en la fase fluida (C3(H<sub>2</sub>O)Bb) al quedarse el fragmento mayor, Bb, unido a C3(H<sub>2</sub>O) y la liberación de un fragmento pequeño, Ba. Este complejo C3(H<sub>2</sub>O)Bb es capaz de cortar moléculas de C3 nativas y generar C3a y C3b. La opsonina C3b es capaz de unirse covalentemente a cualquier superficie que contenga grupos hidroxilos (-OH) o aminos (-NH<sub>2</sub>), frecuentes en superficies celulares. Este mecanismo permite que la VA esté continuamente reconociendo la presencia de patógenos y que actúe como un bucle de retroalimentación para la VC y la VL (93,96).

Las moléculas C3b unidas a las células hospedadoras son rápidamente inactivadas por reguladores del complemento que se encuentran en la fase fluida o por reguladores expresados en las membranas celulares. La vida media del enlace tioéster de C3 es muy corta y tiene una baja eficiencia de fijación. De hecho, si no se produce la unión del complejo, su forma naciente de corta vida se hidroliza y se inactiva en pocos milisegundos. Sin embargo, en los patógenos que carecen de reguladores específicos del complemento, las moléculas de C3b generadas por la convertasa inicial, interactúan con el fB formando la pro-convertasa de la VA (C3bB). C3bB es a su vez activada por el fD para formar en la superficie del patógeno la convertasa de C3 de la VA, C3bBb, que escinde C3 en C3a y C3b, favoreciendo así el proceso de retroalimentación. Este proceso asegura la amplificación de la respuesta y su rapidez una vez que la VA sea activada. Además, este sistema no sólo amplifica la respuesta iniciada por la VA sino también la de las vías restantes (VC y VL).

La properdina, una proteína oligomérica que se une a la superficie de los patógenos o células apoptóticas, estabiliza la convertasa C3 de la VA y aumenta su vida media. La

properdina se une a C3bBb estabilizando el complejo e inhibiendo su rápida disociación (**figura 3**). Dicha estabilización, permitirá la unión de C3b al complejo formando la convertasa C5 de la VA (C3bBbC3b) (102).

El factor H (fH) y el factor I (fI), son serina proteasas que, regulan la VA y el proceso de retroalimentación de las vías del complemento. El fH compite con el fB para unirse a C3b, evitando la formación de nueva convertasa. El fH también sirve como cofactor del fI el cual inactiva C3b formando C3b inactivo (iC3b), incapaz de unirse al fB. Además, el fH induce la disociación del complejo C3bBb inactivando la vía alternativa (94).

#### 3.1.4 La vía terminal

El corte proteolítico de C3 producido por las convertasas de C3 es el punto crítico de la activación del complemento. En este momento, las convertasas de C3 de la VC y de la VL (C4bC2b) y de la VA (C3bBb), con su acción proteasa, fragmentan numerosas moléculas de C3, el componente central del sistema del complemento, dando lugar a la formación de fragmentos grandes, C3b, y pequeños, C3a. Análogo a C4, la hidrólisis de C3 expone en C3b un enlace tioéster muy reactivo que le permite unirse covalentemente a las superficies celulares desencadenantes de la activación. C3b se asocia con C4bC2b en la VC y VL y forma el complejo C4bC2bC3b y en la VA el complejo C3bBbC3b, conocidos como la convertasa de C5. Es aquí cuando las tres vías de activación convergen en la fase terminal. Este proceso se produce cuando la densidad del C3b depositado en la superficie celular al unirse con las convertasas de C3 alcanza cierto nivel e induce que la especificidad por el sustrato de los centros activos (C2b y Bb) cambie para producir el corte de C5 (96,100).

Las convertasas de C5 (C4bC2bC3b o C3bBbC3b) cortan el componente C5 en fragmentos pequeños, C5a, y grandes, C5b. Los fragmentos pequeños C5a y C3a son potentes anafilotoxinas que se liberan en el plasma. En cambio, C5b sufre un cambio conformacional que permite la unión de los componentes C6 y C7 a la superficie del patógeno; y la activación, mediante un proceso no enzimático, del resto de los componentes del complemento, C8 y C9. Todo esto da lugar a la formación del CAM que, culminará con la lisis celular (**figura 3**). El complejo C5b-C7 se ancla a la membrana celular y captura C8. Tras cambios conformacionales, C8 se integra en la bicapa lipídica dando lugar al complejo tetramolecular C5b-C8, lo que permite que múltiples moléculas de C9 se unan a la membrana. Las moléculas de C9 forman un poro en la membrana de unos 10nm que producen la desintegración y destrucción de la célula mediante lisis osmótica (103).

Además, la activación del complemento genera varias opsoninas (C3b e iC3b) y anafilotoxinas (en concreto C3a y C5a). Las opsoninas se encargan de promover la fagocitosis a través del reconocimiento de fragmentos C3 por receptores específicos expresados por los fagocitos. Las anafilotoxinas son capaces de activar leucocitos y células endoteliales, y de reclutar leucocitos hacia el sitio de infección para iniciar la respuesta inflamatoria (104).

### 3.2. Regulación del sistema del complemento

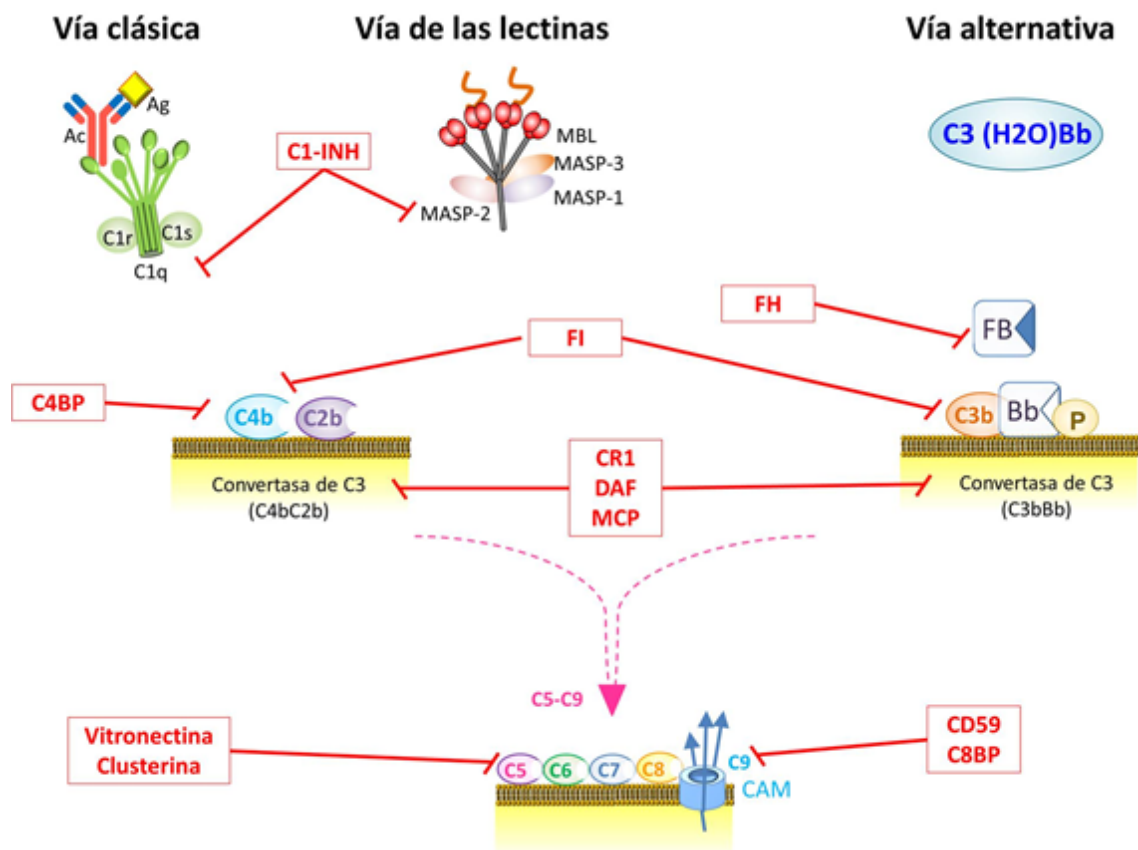
La regulación de la activación del complemento es crucial para prevenir una amplificación descontrolada que cause enfermedades autoinmunes o inflamación. Debido al papel central de la formación de la convertasa de C3 y del CAM en la activación del complemento, la mayoría de las proteínas reguladoras actúan inhibiendo o disociando su formación. Estas proteínas reguladoras se encuentran tanto solubles en plasma como ancladas a las membranas celulares y permiten mediante su acción mantener la homeostasis.

Entre los distintos reguladores destacan los que se citan a continuación (**figura 4**) (94,95,105,106):

- **Inhibidor C1 (C1-INH)** es un inhibidor de serina proteasas en plasma que, mediante enlace covalente, se une a C1r y C1s y los disocia de C1q inactivándolo. C1-INH también se une a MASP-1 y MASP-2 disociándolo de los PRMs. Por tanto, este inhibidor C1 permite regular tanto la VC como la VL ya que bloquea la hidrólisis de C2 y C4 y como consecuencia inhibe la formación del complejo convertasa de C3. El C1-INH regula también otras vías como la de calicreína-cinina.
- **Inhibidores de la convertasa de C3 y C5.** Para evitar el acúmulo excesivo de depósitos de C3b en las superficies celulares, que ocasionar daños por un exceso de formación de convertasas y, consecuentemente, por un exceso de activación del complemento, estas convertasas deben ser disociadas. Existen diversas proteínas reguladoras que se encargan de realizar esta función, son los denominados **reguladores de activación del complemento (RCA, regulators of complement activation)**. Estos RCA son proteínas que regulan la actividad de la convertasa de C3 y por tanto regulan las tres vías de activación del complemento (VC, VL y VA). Este conjunto de proteínas es codificada en la región 1q32 del cromosoma 1. Incluye reguladores asociados a la membrana celular como el receptor 1 del complemento (**CR1**, también conocido como CD35), la proteína cofactora de membrana (**MCP, membrane cofactor protein** o CD46) o el factor acelerador de la degradación (**DAF, decay acceleration factor** o CD55), y

reguladores solubles en plasma como la proteína de unión de C4b (**C4BP**, *C4 binding protein*), el **fi**, el **fH** y su producto de *splicing* alternativo, el **fHL-1** (*Factor H-like 1*):

- **C4BP** tiene alta afinidad a C4b. Esta unión implica la disociación de la convertasa de C3 (C4bC2b) de la VC y de la VL al impedir la unión de C2b.
- El **fi** impide la formación de la convertasa C3 de las tres vías, al unirse tanto al C4b como a C3b con la ayuda de proteínas cofactoras solubles (CR1, MCP, C4BP y fH).



**Figura 4. Representación de los distintos reguladores de activación de las vías del sistema de complemento**

La mayoría de las proteínas reguladoras actúan inhibiendo o disociando la formación de la convertasa de C3. Estas proteínas reguladoras se encuentran tanto solubles en plasma como ancladas a las membranas celulares. Inhibidor C1 (C1-INH) se encuentra en plasma, regula la vía clásica al inactivar C1q. C1-INH también regula la vía alternativa al unirse a MASP-1 y MASP-2 disociándolo de los PRMs. Las proteínas que regulan la actividad de la convertasa de C3 se encargan principalmente de evitar el acúmulo excesivo de depósitos de C3b en las superficies celulares. Este tipo de reguladores se encuentran tanto en las membranas celulares como solubles. Las proteínas reguladoras asociadas a la membrana celular son el receptor 1 de complemento (CR1), la proteína cofactora de membrana (MCP) o el factor de aceleración de complemento (DAF). Los reguladores solubles en plasma son la proteína de unión de C4b (C4BP), el factor I (fi), el factor H (fH) y el factor H-like 1 (fHL-1). Diversas proteínas impiden la inserción del complejo de ataque a la membrana (CAM) en la bicapa lipídica. La vitronectina y la clusterina se unen a los complejos C5b-C7, C5b-C8 y C5b-C9 e impide la formación del CAM. CD59 y C8BP impiden la polimerización de C9 y la unión a C5b-C8 para formar el CAM.

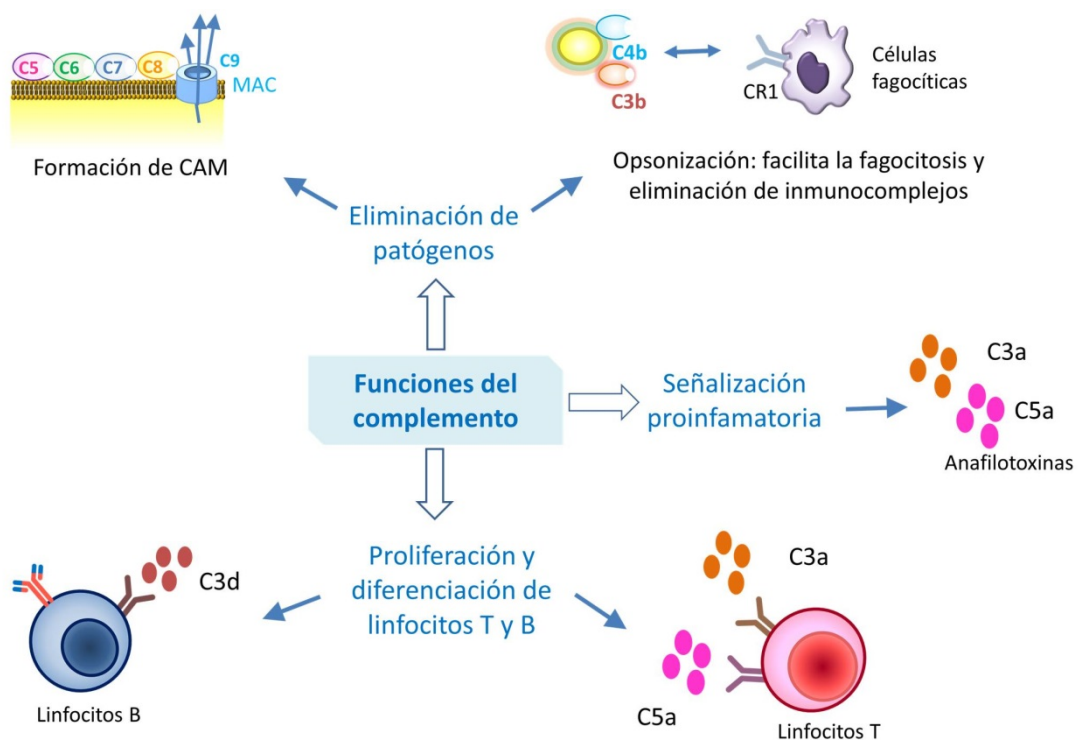
- El **fH** es capaz de competir con el **fB** por el sitio de unión a **C3b** e impedir la formación del complejo **C3bBb**.
  - El **DAF** y **CR1** actúan sobre todas las convertasas de **C3** y de **C5**.
- **Inhibición de la formación del CAM.** Diversas proteínas impiden la inserción del CAM en la bicapa lipídica. La vitronectina y la clusterina se unen a los complejos **C5b-C7**, **C5b-C8** y **C5b-C9** e impide la formación del CAM. **CD59** y **C8BP** impiden la polimerización de **C9** y la unión a **C5b-C8** para formar el CAM.

### 3.3. Funciones del sistema del complemento

Como comentamos anteriormente el sistema del complemento es el principal mecanismo de defensa frente a patógenos externos. Sin embargo, son muchas más las funciones en las que está implicado. A continuación se detallan las principales actividades que desarrolla (93,95,96,107) (**figura 5**):

- **Eliminación de patógenos mediante formación del CAM u opsonización.** La eliminación de patógenos se produce al formarse el CAM en su superficie, ya que provoca la lisis osmótica y, por tanto, su destrucción. Los patógenos eliminados mediante este mecanismo son principalmente bacterias Gram-negativas, parásitos y virus (93,95). Sin embargo, la eliminación de patógenos está también producida por el proceso de opsonización. Este proceso está desencadenado por la unión covalente de **C3b** y **C4b** a la superficie de bacterias e inmunocomplejos. Estas uniones permiten que sean reconocidos por los receptores **CR1** de la superficie de los fagocitos con lo que se favorece la fagocitosis. Los componentes de complemento **C3b** y **C4b** se unen a **CR1** expresado en fagocitos y eritrocitos. El **CR1** de fagocitos mejora la fagocitosis mediada por **IgG** mientras que en los eritrocitos el **CR1** favorece la eliminación de inmunocomplejos solubles. Además, **CR1** es un cofactor del **fI** por lo que favorece la escisión de **C3b** a **iC3b** (**C3b** inactivo) (108). **iC3b** también participa en la eliminación de células apoptóticas al interactuar con los receptores **CR3** o **CR4** de monocitos, macrófagos y células dendríticas (93)
- **Señalización proinflamatoria.** Las anafilotoxinas (**C3a** y **C5a**) producidas en el proceso de activación del complemento actúan como quimioatrayentes, reclutando a neutrófilos, monocitos y macrófagos hacia el lugar de infección, y promoviendo así la respuesta inflamatoria.

- **Proliferación y diferenciación de linfocitos T y B.** Las células T tienen en sus membranas receptores de **C3a** y **C5a** involucrados en la diferenciación y proliferación de los linfocitos T. La MCP, CD35 y CD59 juegan un papel importante en la regulación de los linfocitos T. La DAF también participa en la regulación de la respuesta inmunitaria adquirida (93). La interacción entre **iC3b** y **C3d** (fragmento que se genera en el procesamiento de iC3b) y el receptor CR2 en los linfocitos B, permite la activación de las células B y facilita la transformación de las células B vírgenes en células efectoras productoras de anticuerpos y linfocitos B de memoria (108). Por tanto, el sistema del complemento permite **modular la respuesta inmune adquirida** para combatir la infección.



**Figura 5. Funciones del sistema del complemento.**

Las principales funciones del sistema del complemento son: la lisis de patógenos mediante la formación del complejo de ataque a la membrana (CAM), la opsonización y fagocitosis de patógenos y la eliminación de inmunocomplejos mediante las opsoninas C3b y C4b, la generación de una respuesta inflamatoria con las anafilotoxinas C3a y C5a, y la estimulación de la respuesta inmune adquirida. Las anafilotoxinas también están implicadas en la activación de los linfocitos T. C3d promueve la diferenciación y proliferación de los linfocitos B y la generación de anticuerpos.



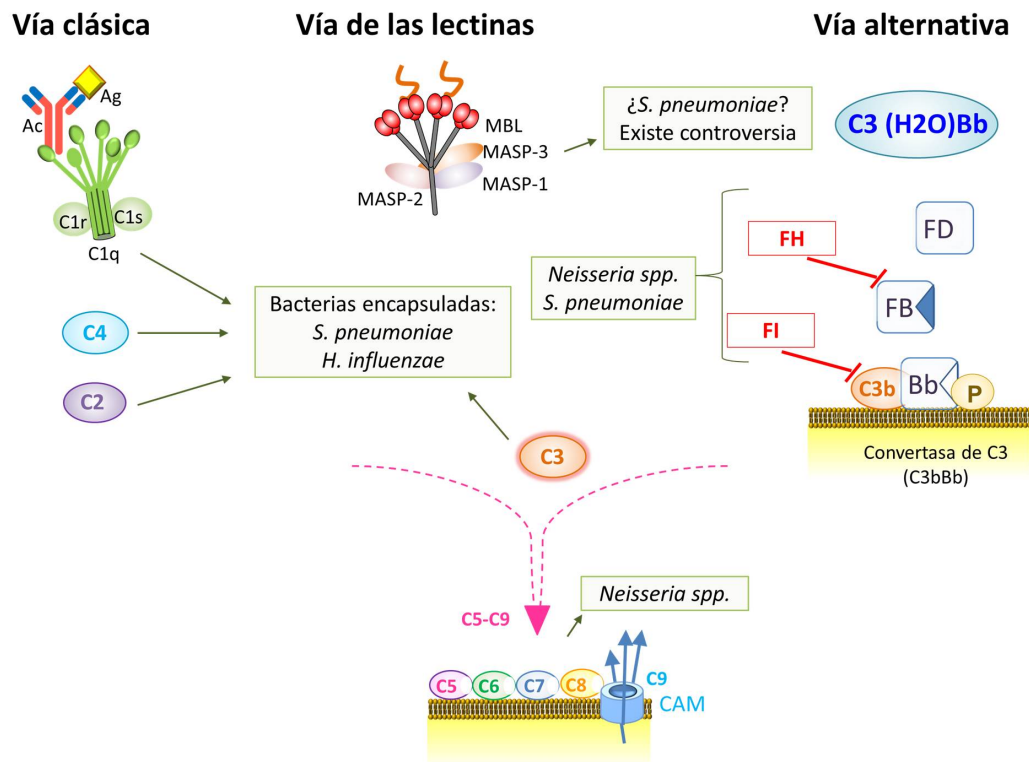
## 4. Deficiencias del sistema del complemento

Los pacientes con deficiencias del complemento a menudo presentan una clínica con aumento de susceptibilidad a infecciones, enfermedades autoinmunes o enfermedades causadas por la desregulación del complemento.

### 4.1. Deficiencias del complemento y susceptibilidad a infección

La activación del complemento es crítica en la eliminación de patógenos, puesto que está implicado en la opsonización del patógeno (C3b) y tiene actividad anafilotóxica (C4a, C3a y C5a), quimiotáctica (C5a) y bactericida (CAM, C5b-C9). Estas funciones le van a permitir actuar rápidamente en las etapas iniciales de la infección, generar una respuesta inflamatoria evitando la propagación del microorganismo y facilitar la fagocitosis del patógeno. Por todo ello, parece evidente que las deficiencias del sistema del complemento se asocian a una mayor susceptibilidad a infecciones (109). Se han descrito deficiencias de casi todos los componentes del complemento. En función del agente causal de la infección se puede discernir el tipo de deficiencia del sistema del complemento que tiene el paciente (**figura 6, tabla 2**).

Las deficiencias de la VC (C1q, C1r, C1s, C4 y C2) son poco habituales. Presentan una herencia AR. Debido a que en esta vía el proceso de opsonización es la primera línea de defensa del hospedador, estas deficiencias predisponen a infección por bacterias encapsuladas, sobre todo *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y otros estreptococos (110–112). Aunque poco habitual, también se han observado casos de infecciones por *N. meningitidis* y otras bacterias Gram negativas. La deficiencia más común de la VC es la deficiencia de C2, con una prevalencia en la población europea de 1:10.000-1:20.000 (113–115). La mayoría (95%) de las deficiencias de C2 están causadas por una delección de 28pb en el extremo 3' del exón 6 del gen C2 (C2 28-bp DEL), la cual causa una terminación prematura de la transcripción. Esta deficiencia es conocida como deficiencia tipo I del gen del complemento C2 (C2D). La delección de 28pb está asociada a un haplotipo conservado del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) muy ligado a autoinmunidad (HLA-B18, C2\*QO, Bf\*S, C4A\*4, C4B\*2 y DR\*2). El principal patógeno implicado en las infecciones relacionadas con esta deficiencia es *S. pneumoniae*, que puede causar infecciones graves como sepsis, meningitis o neumonía (113). Los pacientes con deficiencias en la VC presentan una penetrancia parcial en la susceptibilidad a la infección, ya que la VA funciona con normalidad. La deficiencia de C4 será explicada en el apartado 4.3 de la presente Tesis Doctoral.



**Figura 6. Susceptibilidad a infecciones más frecuentes debidas a deficiencias de complemento.**

Deficiencias en componentes de la vía clásica y de C3 predisponen a infecciones por bacterias encapsuladas como *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, deficiencias en componentes de la vía alternativa y del complejo de ataque a membrana (CAM) predisponen a *Neisserias spp.*, especialmente *N. meningitidis*. En individuos con deficiencias en componentes de la vía alternativa son también frecuentes las infecciones por *Streptococcus pneumoniae*. En la vía de las lectinas existe controversia.

Las deficiencias de la VA (fB, fD, properdina, fH y fI) predisponen generalmente a infecciones por *Neisserias*, predominando *N. meningitidis* ya que en esta vía la lisis celular es el principal mecanismo de acción (42). Todas, excepto la properdina que tiene una herencia XL, presentan una herencia AR. Las IDP de esta vía son muy poco frecuentes, pero más graves. Por ejemplo, los pacientes con infecciones por meningococo y deficiencia de properdina tienen una tasa de mortalidad del 65%. En el caso de pacientes con deficiencias del fH y fI las infecciones por neumococo también son frecuentes ya que estas deficiencias causan una activación descontrolada de la VA e inducen indirectamente una deficiencia secundaria de C3 (116). Las deficiencias en el fB y fD también se asocian a infecciones sistémicas causadas por *Neisserias* y neumococo.

**Tabla 2. Características clínicas de enfermedades causadas por deficiencias del sistema del complemento**

Componentes	Susceptibilidad a infección	Asociación a enfermedad
<b>Vía clásica</b>		
C1q		LES
C1r/C1s	Bacterias encapsuladas	LES
C4	( <i>S.pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> )	LES
C2		LES, DMAE
<b>Vía alternativa</b>		
FB		SHUa, C3G, DMAE
FD	<i>Neisserias (N. meningitidis)</i>	
Properdina		NiGA
FH	<i>Neisserias (N. meningitidis)</i> y	SHUa, C3G NiGA, DMAE
FI	<i>S.pneumoniae</i>	SHUa, C3G, DMAE
<b>Vía lectina</b>		
MBL		NiGA
MASP-1		NiGA
MASP-2		NiGA
<b>C3</b>	Bacterias piógenas encapsuladas ( <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> )	LES, SHUa, C3G, DMAE
<b>Vía terminal</b>		
C5-C9	<i>Neisseria spp.</i>	DMAE

LES: lupus eritematoso sistémico; DMAE: degeneración macular del adulto; SHUa: síndrome hemolítico urémico atípico; C3G: glomerulopatía-C3; NiGA: nefropatía por IgA

Los pacientes con deficiencia de C3 son altamente susceptibles a la infección por bacterias piógenas encapsuladas como *S. pneumoniae* y *H. influenzae* ya que son organismos en los que la opsonización es un mecanismo clave en la defensa del huésped (110,117). Esta deficiencia AR causa, por tanto, neumonías, bacteriemias, meningitis y osteomielitis con un fenotipo más grave que el resto de las deficiencias del complemento. Aproximadamente el 80% de los pacientes con deficiencia de C3 manifiestan infecciones graves y/o recurrentes.

Los individuos con deficiencias en componentes terminales (C5-C9), al tener C3, opsonizan las bacterias con normalidad y no son particularmente propensos a infecciones por neumococo o *H. influenzae*. Sin embargo, debido al deterioro de la actividad bactericida mediada por deficiencias en los componentes del complemento (C5-C9), los pacientes son notablemente susceptibles a *Neisseria spp*, especialmente a *N. meningitidis*, ocasionando meningitis y sepsis, y a *N. gonorrhoeae* (110). Las deficiencias de la vía terminal también presentan una herencia AR y una baja prevalencia teniendo, además, una baja tasa de mortalidad.

Las deficiencias AR de los componentes de la VL (MBL, ficolina-3 y MASP-2) se han asociado a infecciones respiratorias causadas por bacterias piógenas. La deficiencia de MBL

tiene una frecuencia del 5% en población europea y a pesar de que los individuos con estas alteraciones parecen sanos, los bajos niveles en suero de MBL se han asociado a un mayor riesgo de infección, aunque con resultados muy controvertidos. En cambio, la frecuencia de la deficiencia de MASP-2 en individuos europeos es baja, encontrándose entre 7 y 15 por cada 10.000 individuos de origen europeo (51,118–120). Aunque las deficiencias de MASP-2 y ficolina-3 han sido incluidas en la clasificación de IDP de complemento en el informe realizado por el comité de IDP (121), existen resultados controvertidos en cuanto a la asociación de la deficiencia de MBL con susceptibilidad a infecciones por bacterias piógenas (51,68,120,122,123). En un estudio previo, nuestro grupo sugirió que la penetrancia clínica de la deficiencia de MASP-2, si la tiene, puede ser baja (120). Además, se cuestiona si las deficiencias de MBL, MASP-2 y ficolina-3 son resultado de una baja o nula penetrancia o si sus manifestaciones clínicas están condicionadas a la presencia de otros defectos inmunológicos primarios o adquiridos (51,55,120,124,125).

Por tanto, la alta incidencia de infecciones neumocócicas en pacientes con deficiencias del complemento (VC, VA, C3) y el hecho de que el neumococo ha desarrollado numerosos mecanismos para evadir la opsonización mediada por el complemento, subrayan el papel crucial del complemento en la defensa frente al neumococo (77,126).

#### **4.2. Autoinmunidad, desregulación del complemento y enfermedad**

EL sistema inmunológico está constituido por un minucioso puzle en el que cada pieza es clave para su correcto funcionamiento. Sin embargo, a veces este ensamblado falla en el mecanismo de activación o regulación de sus componentes y causa diversas enfermedades. En ocasiones, se producen trastornos autoinmunes producidos por un aumento de la respuesta inflamatoria y la persistencia del daño tisular, dando lugar a enfermedades como el lupus eritematoso sistémico (LES) o la artritis reumatoide. Este tipo de enfermedades autoinmunes es frecuente en pacientes con deficiencias en componentes de la VC (C1q, C4 y C2) puesto que esta vía se encarga principalmente de la eliminación de restos apoptóticos e inmunocomplejos, y debido a que está implicada en la activación de linfocitos B y el desarrollo de tolerancia frente a autoantígenos. En otras ocasiones, las enfermedades son consecuencia de mutaciones o polimorfismos en genes de componentes del complemento que producen la alteración de sus funciones o su regulación, lo que resulta en un exceso de activación del complemento (desregulación). Como consecuencia de esta desregulación, estas enfermedades también se caracterizan por producir daños tisulares crónicos e inflamación, pudiendo dar lugar a enfermedades como el síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa), la

glomerulopatía-C3, el angioedema hereditario, la hemoglobinuria paroxística nocturna, la nefropatía por IgA o la degeneración macular asociada con la edad (DMAE) (**tabla 2**) (100). En los últimos años, se ha sugerido que la desregulación del sistema del complemento también podría estar asociado a diversas enfermedades neurológicas, como el Alzheimer o el Parkinson (127). Estudios recientes advierten que la COVID-19 está causada principalmente por el aumento de la respuesta inflamatoria del sistema inmunitario del hospedador, más que por la propia infección viral (128). Podría ser que la activación del complemento empeore la gravedad de la COVID-19 (129,130).

La deficiencia de C1q es una inmunodeficiencia poco frecuente altamente asociada con el desarrollo de LES. También se asocia a LES en pacientes con deficiencias de C4 y C2 y, en menor medida, pacientes con deficiencia de C3 (131). La deficiencia de C2, a pesar de ser rara, presenta su manifestación clínica más frecuente en LES (132). Posiblemente esta asociación se deba a que la deficiencia de C2 impide la eliminación de inmunocomplejos de forma eficaz (115,133). A diferencia de las otras deficiencias, los pacientes con deficiencia de C2 suelen presentar LES sin anticuerpos antinucleares y con presencia de anticuerpos anti-Ro. Además, a esta deficiencia se han asociado a otras enfermedades como glomerulonefritis, dermatomiositis y vasculitis (113).

El SHUa se caracteriza por anemia hemolítica microangiopática trombótica que afecta fundamentalmente al riñón. El 60% de los casos de SHUa se asocia con mutaciones en genes del complemento, principalmente en la VA (fH, fl y fB), y con menor frecuencia en C3 y MCP. Por tanto, esta enfermedad es debida, fundamentalmente, a una activación inapropiada de la VA debido a mutaciones LOF en los factores reguladores H e I, por lo que no inactivan la vía del complemento. Como consecuencia, se acumulan depósitos de C3 pudiendo ocasionar fallo renal al no poder proteger las células propias de la actividad lítica (134). Este tipo de mutaciones LOF también se han identificado en genes que codifican para las proteínas MCP y C4BP del complemento. Sin embargo, en los pacientes con mutaciones en los genes que codifican para el fB y C3 estas mutaciones se han relacionado con GOF por lo que se produce una mayor activación de las vías, en especial de la VA.

La glomerulopatía-C3 se produce como consecuencia de la acumulación de depósitos de C3 en los glomérulos debido a por la activación incontrolada de la VA. La glomerulopatía-C3 engloba dos subtipos: la glomerulonefritis y la enfermedad de depósitos densos (EDD). Se producen por mutaciones en los genes que codifican para C3, fB, fH, CFHR1-CHFR5, fl y MCP. Estos pacientes suelen presentar autoanticuerpos denominados factor nefrítico C3 que actúan

estabilizando la convertasa de C3 de la VA (C3bBb) por lo que aumenta su actividad y como consecuencia se produce el consumo de C3 (135).

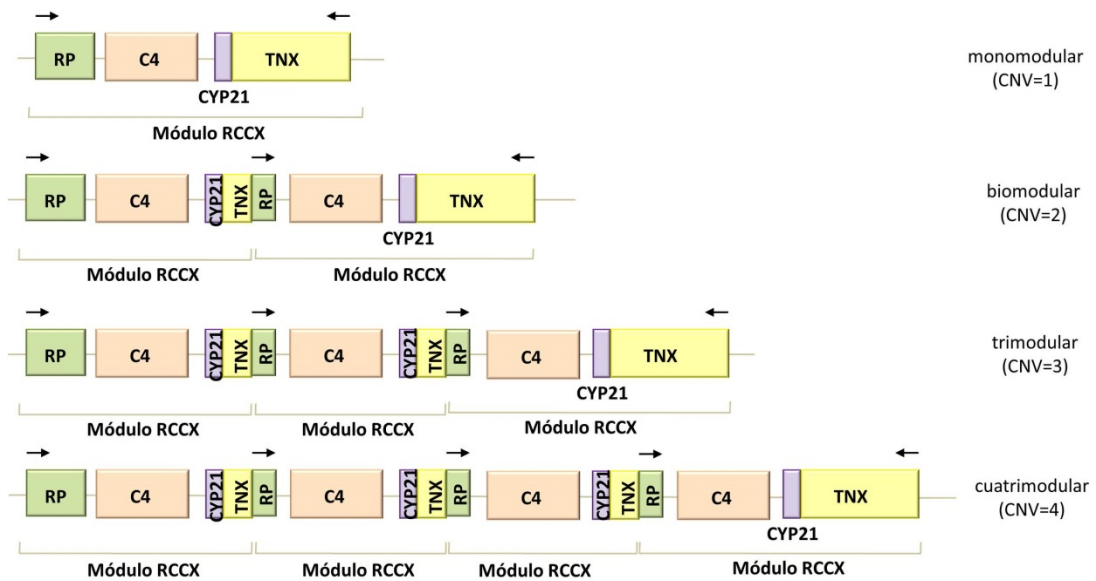
La nefropatía por IgA está causada por la acumulación de IgA1 en el mesangio desencadenada por la activación incontrolada de la VA (fH y properdina) y la VL (MBL, MASP-1 y MASP-2) (136).

La DMAE es una enfermedad frecuente, ampliamente distribuida a nivel mundial, que causa ceguera en edades avanzadas asociada a la desregulación del complemento. En esta enfermedad se ha identificado una base genética en un 40-70% de los casos, en los que los polimorfismos del fH, C2, fB, fI, C3 y C9 del complemento son los principales desencadenantes de la patogénesis de la enfermedad. Estas variantes se asocian a una activación descontrolada del complemento sobre todo a nivel de la VA (137).

#### **4.3. Variación del número de copias del componente C4 del complemento y deficiencia del isotipo C4A o C4B**

El componente C4 del complemento es sintetizado en el hígado y se localiza en el MHC III, en el brazo corto del cromosoma 6, telomérico al gen C2. El número de copias de gen (GCN) varía de dos a ocho copias en C4 total entre individuos en un genoma diploide, siendo cuatro el número de copias más frecuente. En las poblaciones de origen europeo, aproximadamente el 80% de las personas tienen tres o cuatro genes C4, el 20% tiene cinco o más, y solo menos del 2% tiene únicamente dos copias. Cada duplicación del gen va casi siempre precedida de un fragmento de 0.9 kb del gen *RP* (*STK19*), y teloméricos se sitúan los genes *CYP21* y *TNX* formando el módulo conocido como RCCX (**figura 7**). Por tanto, un gen C4 puede ser monomodular (CNV=1), bimodular (CNV=2), trimodular (CNV=3) o cuatrimodular (CNV=4). Además, cada gen C4 puede ser largo (20.6 kb) o corto (14.2 kb) debido la inserción, en el noveno intrón, de un retrovirus endógeno (HERV-K) de 6.4 kb. El 76% de la población ancestral europea sana presenta la forma larga (C4L) mientras que el restante 24% tiene la forma corta (C4S). Los genes C4A y C4B solo difieren en cuatro aminoácidos, **PCPVLD** y **LSPVIH** respectivamente, que les confieren diferencias en la afinidad por ligandos. En la proteína más ácida, C4A, se ve favorecida la unión a grupos aminos (ej. inmunocomplejos) mientras que en la más básica, C4B, se favorece la unión a grupos carboxilos e hidroxilos (ej. polisacáridos). Estas características le confieren diversas funciones a cada uno, C4A se encarga de la eliminación de inmunocomplejos y el papel principal de C4B es la activación de las vías al unirse a la superficie de los patógenos (138). El GCN varía de cero a cinco en C4A, mientras que

el de *C4B* varía de cero a cuatro, siendo dos el más común para ambos genes en todos los grupos raciales (139,140). Se ha observado que existe una fuerte correlación entre la variación del número de copias (CNV) *C4*, el tamaño del gen *C4* (*C4S* o *C4L*), la concentración de proteína *C4* en plasma o suero, y la actividad de la VC (midiendo la actividad hemolítica) (141–144). Además, se ha detectado una mayor concentración de proteínas séricas de *C4* y una mayor actividad hemolítica en individuos con *C4S* que en individuos con *C4L* solamente (142), lo que sugiere que el HERV-K de *C4* ejerce un efecto negativo en la expresión de *C4*.



**Figura 7. Variación del número de copias del gen *C4* del complemento.**

Se representa la duplicación del gen *C4* en módulos RCCX. El gen *RP* puede ser *RP1* o *RP2* al igual que el gen *TNX* puede ser *TNXA* o *TNXB*. La duplicación del gen *CYP21* puede ser un pseudogen (*CYP21A1P* o *CYP21A*) o un gen funcional (*CYP21B* o *CYP21A2*). Cada módulo RCCX contiene un gen *C4* que puede ser *C4A* (ácido) o *C4B* (básico) independientemente del gen *C4* que tenga el resto de módulos.

La deficiencia de *C4* es debida a una herencia AR. Los pacientes con la deficiencia completa de *C4* (*C4A*\*Q0 y *C4B*\*Q0) presentan niveles séricos antigénicos de *C4* muy bajos o indetectables incapaz de opsonizar y tener actividad quimiotáctica y bactericida mediante la activación de la VC. No obstante, la frecuencia de esta deficiencia completa es muy poco frecuente. Solo se han descrito 28 pacientes de 19 familias estudiadas, la mayoría con LES (145). La deficiencia de *C4A* (*C4A*\*Q0) se encuentra en un 1-6% de individuos sanos y la deficiencia de *C4B* en un 1-10% de la población sana (145). En cambio, la presencia de alelos nulos de *C4A* o *C4B* es frecuente, en población sana europea ocurre en un 45-56% debido a la presencia de haplotipos que portan los módulos monomodulares de RCCX que contiene *C4A* o *C4B* (139,146).

Los individuos con una deficiencia completa de C4 pueden presentar LES y/o una mayor susceptibilidad a infección (147). Los sujetos con deficiencia de C4A (C4A\*Q0) tienen mayor riesgo de padecer LES debido a la incapacidad de eliminar inmunocomplejos (139). Esta deficiencia también ha sido asociada con rinosinusitis crónica o recurrente (148). Se ha sugerido que los individuos con la deficiencia de C4B (C4B\*Q0) parecen tener mayor predisposición a infecciones por bacterias encapsuladas (112,149). Este isotipo es más eficiente en la interacción con polisacáridos por lo que su ausencia impide la opsonización del patógeno al no depositar C3b en su superficie (145). En cualquier caso, existe mucha controversia en los resultados publicados hasta ahora (112,150) y todos los estudios han sido realizados en los años 1989-1992 con técnicas de análisis proteico, antes de describirse la existencia de CNV. El bajo GCN de *C4* también se ha asociado a enfermedades. Un bajo GCN de *C4* (<4) o *C4A* (<2) se ha relacionado con un mayor riesgo a enfermedades autoinmunes (140) y un bajo GCN de *C4B* ( $\leq 1$ ) se han asociado con el desarrollo de artritis reumatoide seropositiva (151). A su vez, el bajo GCN de *C4B*, al igual que el genotipo C4L\*Q0, se han asociado con una menor longevidad, aunque existen controversias (152–154). Sin embargo, altos GCN de *C4A* se han asociado con protección de DMAE (155).

## 5. Variantes génicas del complemento asociadas con enfermedad o infección

Además de las mutaciones causantes de IDP de complemento, el continuo estudio de las variantes de genes del complemento ha permitido identificar algunas variantes asociadas a un mayor riesgo de padecer enfermedades como la DMAE o SHUa, e identificar variantes protectoras en diversas entidades clínicas (**tabla 3**).

Son muchísimas las SNV que se han estudiado en genes del complemento. En la VC destacan los polimorfismos rs9332739 (E318D) y rs547154 (intrón 10) del gen *C2*. La SNV rs9332739 se encuentra en desequilibrio de ligamiento (DL) completo con rs4151667 (L9H) del gen codificante del fB (*CFB*), mientras que la SNV rs547154 se encuentra en DL completo con rs641153 (R32Q) en el gen *CFB*. Todas estas SNV se han asociado con desarrollo o protección de desarrollar DMAE (156). La posición aminoacídica 32 del fB presenta tres variantes: fB<sub>32R</sub>, fB<sub>32Q</sub> y fB<sub>32W</sub>. Las SNV fB<sub>32Q</sub> y fB<sub>32W</sub> están asociadas con un efecto protector para la DMAE aunque el efecto protector que ejerce la SNV fB<sub>32W</sub> es menor (157–160). Otra SNV de la VA estudiada es el rs2072633 (IVS17) del fB, también relacionada a una disminución del riesgo de DMAE (158).



**Tabla 3. Polimorfismos más destacados en el sistema del complemento asociados a enfermedades**

Fenotipos asociados al alelo de menor frecuencia					
Gen	SNV	Posición	Riesgo	Protección	Ref.
<i>C2</i>	rs9332739	E318D	-	DMAE	(161)
<i>C2</i>	rs547154	IVS10	-	DMAE	(161)
<i>CFB</i>	rs4151667	H9L	-	DMAE	(161)
<i>CFB</i>	rs641153	R32Q	-	DMAE	(161)
<i>CFB</i>	rs2072633	IVS17	-	DMAE	(158)
<i>MBL2</i>	rs5030737	R52C	Infección, autoinmunidad	-	(162–165)
<i>MBL2</i>	rs1800450	G54R	Infección, autoinmunidad	-	(162–165)
<i>MBL2</i>	rs1800451	G57E	Infección, autoinmunidad	-	(162–165)
<i>CFH</i>	rs1061170	Y402H	DMAE, EDD	EA	
<i>CFH</i>	rs800292	V62I	VCP	DMAE, EDD, SHUa	(166)
<i>CFH</i>	rs6677604	-	LES, SHUa	NlgA, DMAE, C3G	(167,168)
<i>CFH</i>	rs1065489	E936D	SHUa	EM	(169,170)
<i>CFHR3</i>	rs426736	-	SHUa	EM	(64,171)
<i>CFHR4</i>	rs16840639	-	LES	-	(167)
<i>C3</i>	rs2230199	R102G	DMAE, EDD	-	(172)
<i>C3</i>	rs1047286	P314L	DMAE, EDD	MB	(161,173)
<i>C5</i>	rs17611	V802I	-	AR, MB	(174,175)

SNV: variación del número de copias; Ref.: referencias bibliográficas; DMAE: degeneración macular del adulto asociado a la edad; EDD: enfermedad de depósitos densos; EA: enfermedad de Alzheimer; VCP: vasculopatía coroidea polipoidea; SHUa: síndrome hemolítico urémico atípico; LES: lupus eritematoso sistémico; NlgA: Nefropatía por IgA; C3G: glomerulopatía-C3; EM: enfermedad meningocócica; MB: meningitis bacteriana; AR: artritis reumatoide.

En el gen *CFH*, que codifica para la proteína del complemento del fH, destacan varias SNV por su asociación a diversas enfermedades. El alelo fH<sub>402His</sub> de la SNV Y402H confiere fuerte riesgo de desarrollar DMAE y EDD (176,177), mientras que el alelo fH<sub>402Tyr</sub> se ha asociado a un peor pronóstico en pacientes con Alzheimer (178). Otro polimorfismo frecuente en la población es el V62I localizado en la región N-terminal del gen *CFH*. La variante fH<sub>62I</sub> tiene carácter protector para DMAE y otras enfermedades como DDD y SHUa (179), debido a que esta variante reduce la activación de la VA. A su vez, esta variante se ha establecido como posible agente causal del desarrollo de vasculopatía coroidea polipoidea (180). La SNV

rs6677604 del gen *CFH*, localizada en el intrón 12, reduce el riesgo de padecer DMAE, glomerulopatía-C3 y nefropatía por IgA y está asociada con mayor riesgo de LES y SHUa (167,168). La SNV rs6677604 tiene alto DL con la delección de los genes *CFHR3* y *CFHR1* ( $\Delta$ CFHR3-CFHR1) y ambos ejercen los mismos efectos fenotípicos descritos anteriormente.

Como se ha comentado anteriormente, un pequeño desequilibrio en el delicado ajuste entre regulación y activación del complemento puede dar lugar a enfermedades infecciosas e inflamatorias. Este es el caso de la SNV rs1065489 (E936D) del gen *CFH*. El alelo fH<sub>936Asp</sub> se asocia con riesgo de producir SHUa y a su vez confiere protección a desarrollar enfermedades meningocócicas (169,170). Otro ejemplo de este tipo de variantes ocurre en la región intrónica del *CFHR3*, en el rs426736 (A>G), que al igual que en el caso anterior, se asocia fuertemente a riesgo de SHUa y confiere protección a enfermedades meningocócicas (64,171). El *CFHR3* pertenece a la familia de genes del factor H CFHR1-CFHR5. Se encuentran también en la región RCA junto al gen *CFH*. Este conjunto de genes presentan alta homología en sus secuencias lo que favorece el reordenamiento cromosómico y que se asocian a enfermedades. Se cree que esta familia de genes está implicada en regular la activación del complemento mediante competición por los ligandos y receptores del fH. Otra SNV estudiada perteneciente a esta familia es el rs16840639, localizado en la región intrónica telomérica del gen *CFHR4*, se ha asociado a LES (167).

En el gen *C3*, que codifica para la proteína C3, también se han estudiado diversos polimorfismos. Destacan, por los numerosos estudios realizados, las SNV C3<sub>R102G</sub> y C3<sub>P314L</sub>. Las variantes de menor frecuencia de estos dos polimorfismos se asocian a un mayor riesgo a DMAE y EDD (C3<sub>102G</sub> y C3<sub>314L</sub>) (161,172). La variante C3<sub>314L</sub> también se ha asociado a una menor susceptibilidad a meningitis bacteriana (173).

En la vía terminal también se han asociado SNV a diversas enfermedades. Por ejemplo, una SNV en *C5*, la V802I, se ha asociado a un mayor riesgo de padecer artritis reumatoide cuando se tiene la variante C5<sub>802V</sub> (174) y, a su vez, esta misma variante se ha asociado a un peor pronóstico de meningitis neumocócica (175).

Se han estudiado diversas SNV en los genes que codifican para proteínas implicadas en la VL, sin embargo, los resultados vuelven a ser contradictorios. Las SNV más estudiados de esta vía son los que se encuentran en el gen *MBL2*, que codifica para la MBL. En el exón 1 de *MBL2* destacan las SNV rs5030737 (R52C), rs1800450 (G54D) y rs1800451 (G57E), y en la región promotora y la región 5'UTR se han estudiado las SNV rs11003125, rs7096206 y rs7095891 (162–165). El efecto causal de estas variantes sigue hoy en día en duda, aunque

algunos autores sugieren que la alteración de los niveles séricos que producen estas variantes podría aumentar la susceptibilidad a infecciones y el riesgo de padecer trastornos autoinmunes (181–184).

Algunos autores han sugerido modelos teóricos en los que predicen que un mismo polimorfismo en genes que codifican para proteínas del complemento podría desencadenar tanto inflamación como infección, en función de la variante génica que se herede. Al conjunto de diversas variantes heredadas se le conoce como *complotipo*. Término acuñado en 2011 para designar cualquier combinación heredada de variantes genéticas en genes de complemento que definan la actividad del complemento del individuo. Heurich y colaboradores (166) determinaron que al combinar las variantes génicas de riesgo para DMAE rs2230199, rs641153 y rs800292 en los genes *C3*, *CFB* y *CFH* ( $C3_{102G}$ ,  $fB_{32R}$  y  $fH_{62V}$  respectivamente), se produjo una actividad hemolítica de la VA seis veces mayor en comparación con las variantes protectoras ( $C3_{102R}$ ,  $fB_{32Q}$  y  $fH_{62I}$ ). Los autores propusieron que la herencia de un sistema de complemento altamente activo (por ejemplo, homocigoto  $C3_{102G}$ ,  $fB_{32R}$  y  $fH_{62V}$ ), es beneficioso a la hora de combatir una infección debido a una mejora del proceso de opsonización, mientras que a su vez podría predisponer a enfermedades inflamatorias como la DMAE (166,185). Así pues, las variantes que promuevan la activación de la VA (*C3* o *fB*) o que favorezcan una disminución de actividad reguladora (*fI*, *fH* o *MCP*), podrán producir una mayor activación de la VA y, como consecuencia, inflamación. En cambio, individuos con las variantes polimórficas que disminuyan la activación de la vía o promuevan la activación de los factores reguladores, darán lugar a una menor activación del complemento y, como consecuencia, a individuos con mayor riesgo de infección (185).

Los estudios poblacionales podrían ser relevantes para identificar variantes asociadas a enfermedades inflamatorias por desregulación de complemento y a la predisposición a infecciones y, su identificación y conocimiento, podría identificar nuevas dianas terapéuticas.

## **II. HIPÓTESIS**



En base a lo expuesto en la introducción, las hipótesis planteadas son:

- 1.1. Los alelos y genotipos, así como los haplotipos y complotipos definidos por las SNVs de los genes *C2*, *C3*, *CFB*, *CFH* asociados a diferencias en la activación de complemento y/o al desarrollo de enfermedades inflamatorias mediadas por complemento, así como la variante de *C5* asociada a mayor gravedad de la meningitis neumocócica y la deficiencia completa de *C2* se asocian a diferencias en la susceptibilidad a la neumonía adquirida en la comunidad, en particular neumocócica, en adultos.
- 1.2. La variación en el número de copias, en particular un bajo número de copias (0 o 1 copia) de los genes *C4A* y *C4B*, así como la variación en el número de copias de *C4L* y *C4S*, se asocian a diferencias en la susceptibilidad a la neumonía adquirida en la comunidad, en particular neumocócica, en adultos.
2. Un número sustancial de casos de enfermedad neumocócica invasiva en niños son debidos a inmunodeficiencias primarias conocidas.
3. La deficiencia de MASP-2 debida a la homocigosidad para el alelo p.D120G del gen *MASP2* se asocia a diferencias en la susceptibilidad a neumonía adquirida en la comunidad en adultos, a enfermedad neumocócica invasiva en niños y a lupus eritematoso sistémico, aunque su penetrancia clínica pudiera ser baja.



# **III. OBJETIVOS**

---





**1. Identificar alelos de riesgo de neumonía adquirida en la comunidad y enfermedad neumocócica en genes del sistema del complemento**

1.1. Comparar las frecuencias de los diferentes alelos, genotipos, haplotipos y complotipos de las SNVs de los genes *C2*, *CFB*, *CFH*, *C3* y *C5*, así como los genotipos de la delección 28bp del del exón 6 del gen *C2* en pacientes adultos con neumonía adquirida en la comunidad, en particular neumocócica, y en controles adultos sanos.

1.2. Comparar el número de copias de *C4A*, *C4B*, *C4S* y *C4L* en pacientes adultos con neumonía adquirida en la comunidad, en particular neumocócica, y en controles adultos sanos.

**2. Realizar estudios inmunológicos, dirigidos principalmente al diagnóstico de deficiencias de opsonofagocitosis (deficiencias de anticuerpos, deficiencias de la vía clásica y alternativa del complemento y asplenia) y deficiencias de la activación de receptores tipo Toll (TLR) dependiente de MyD88, en pacientes pediátricos con enfermedad neumocócica invasiva en la isla de Gran Canaria, dirigidos al diagnóstico de inmunodeficiencias primarias.**

**3. Analizar el efecto causal de la inmunodeficiencia primaria producida por la deficiencia de MASP-2**



# **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 1. Grupos de poblaciones estudiadas

### 1.1. Población adulta

#### 1.1.1 Pacientes adultos con Neumonía Adquirida en la Comunidad

En este estudio multicéntrico se han incluido pacientes adultos ingresados por NAC desde enero de 2001 hasta marzo de 2016 en seis hospitales españoles: Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canaria; Hospital Universitario de La Princesa, Madrid; Hospital Clínico Universitario, Valencia; Hospital General San Jorge, Huesca; Hospital Son Llatzer, Palma de Mallorca; y Hospital Universitario de Canarias, Tenerife.

##### 1.1.1.1 Criterios de inclusión

Los criterios para la inclusión de pacientes diagnosticados de NAC en este estudio fueron: 1) presentar síntomas y signos de infección de las vías aéreas inferiores, junto con la aparición de un infiltrado radiológico nuevo y sin otros diagnósticos alternativos durante el seguimiento; 2) No haber sido hospitalizado al menos, en los diez días previos al episodio actual; 3) ser español de origen caucásico.

##### 1.1.1.2 Criterios de exclusión

Quedaron excluidos del estudio aquellos pacientes que, aún con el diagnóstico de NAC, cumplía alguno de los siguientes criterios: 1) inmunodepresión grave, tales como inmunodeficiencias primarias, neutropenia significativa ( $<1,0 \times 10^9/L$ ), o portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), trasplantados de médula ósea o de órgano sólido, o tratados con esteroides sistémicos a dosis superiores a 20 mg de prednisona o su equivalente al día durante dos semanas o más; 2) NAC como evento terminal de una enfermedad crónica y progresiva; 3) tuberculosis; 4) neumonía obstructiva por neoplasia; 5) neumonía por aspiración; 6) neumonía nosocomial; 7) extranjeros, los pacientes españoles no caucásicos y los pacientes españoles cuyos antecesores fueran extranjeros (al menos tres generaciones).

##### 1.1.1.3 Criterios de diagnóstico

La NAC es toda infección aguda del tracto respiratorio inferior caracterizada por la aparición de infiltrado pulmonar agudo en la radiografía de tórax y compatible con neumonía, un examen clínico compatible y con la adquisición extrahospitalaria de la infección.

Se diagnosticó de NAC cuando:

- Se obtuvo un hemocultivo positivo para cualquier bacteria u hongo patógenos sin

otro foco aparente

- Se recuperó un patógeno de muestras obtenidas con punción transtorácica o en líquido pleural
- Se produjo una seroconversión con aumento de, al menos, cuatro veces el título inicial de IgG para *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii* o virus respiratorios
- Se obtuvo un título inicial de IgM > 1:32 para *Chlamydomphila pneumoniae*, 1:80 para *Coxiella burnetii*, y cualquier título para *Mycoplasma pneumoniae*
- Se obtuvo un antígeno urinario positivo para *Legionella pneumophila* o para *S. pneumoniae*
- Se obtuvieron recuentos > 10<sup>3</sup> unidades formadoras de colonias (ufc)/mL en muestras de catéter telescopado o biopsia pulmonar y > 10<sup>4</sup> ufc/mL en lavado broncoalveolar.

### 1.1.2 Subgrupos de Neumonía Adquirida en la Comunidad

#### 1.1.2.1 Neumonía Neumocócica Adquirida en la Comunidad

El diagnóstico de la NNAC se basó en la observación radiológica de tórax de infiltrado pulmonar compatible con neumonía y la presencia de al menos uno de los siguientes criterios:

- Claro predominio de cocos lanceolados grampositivos agrupados en cadenas o en parejas, sin otros microorganismos en muestras de esputo o aspirados traqueobronquiales; dichos especímenes debían contener >20 neutrófilos y <10 células epiteliales escamosas por campo de bajo aumento
- Crecimiento significativo de *S. pneumoniae* en el cultivo, sin otros patógenos probables
- Líquido pleural con crecimiento de *S. pneumoniae*
- Antígeno urinario positivo para *S. pneumoniae*
- Crecimiento bacteriano de > 10<sup>3</sup> ufc/mL de *S. pneumoniae* en especímenes de catéter telescopado o biopsia pulmonar, y/o >10<sup>4</sup> ufc/mL en lavado broncoalveolar.

#### 1.1.2.2 Neumonía Neumocócica No Bacteriémica

El diagnóstico de neumonía neumocócica no bacteriémica (NNAC-NB) se basó en obtener resultados negativos de los hemocultivos antes de recibir tratamiento antibiótico en el hospital y en tener al menos uno de los criterios descritos anteriormente (apartado 1.1.2.1).

### 1.1.2.3 Neumonía Neumocócica Bacteriémica

El diagnóstico de neumonía neumocócica bacteriémica (NNAC-B) se basó en la presencia de, al menos, un hemocultivo positivo para *S. pneumoniae*.

### 1.1.2.4 Neumonía no Neumocócica

La neumonía adquirida en la comunidad no neumocócica (No-NNAC) se define como la NAC que está causada por otro microorganismo (NAC-OM) distinto a *S. pneumoniae* o que el agente etiológico no ha sido determinado (NAC-ND).

### 1.1.3 Pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico

Este estudio prospectivo incluyó pacientes adultos con LES atendidos en el Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín de Las Palmas de Gran Canaria.

Los pacientes diagnosticados de LES incluidos en este estudio fueron aquellos que cumplieron cuatro o más de los once criterios propuestos por el Colegio Americano de Reumatología en la clasificación de Lupus Eritematoso Sistémico (186).

### 1.1.4 Controles

Los individuos controles adultos proceden de cuatro de los seis hospitales participantes (Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canaria; Hospital Universitario de La Princesa, Madrid; Hospital Clínico Universitario, Valencia; y Hospital General San Jorge, Huesca).

Todos los sujetos eran españoles de origen caucásico, mayores de edad y no estaban emparentados genéticamente entre sí. Se han dividido en dos grupos:

- **Controles sanos de la población general.** Este grupo se constituyó por voluntarios sanos, principalmente donantes de médula ósea y/o sangre, personal investigador y clínico, y estudiantes universitarios. A este conjunto de individuos nos referiremos como controles adultos sanos.
- **Controles adultos sin infección.** Este grupo está formado por pacientes sin historia previa relevante de infecciones respiratorias procedentes de diversos servicios hospitalarios (medicina general, inmunología, neumología, hematología, bioquímica, radioterapia, microbiología o dermatología).



## **1.2. Población pediátrica**

### **1.2.1 Pacientes con enfermedad neumocócica invasiva**

En este estudio se incluyeron a todos los niños que asistieron al Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil de Gran Canaria con ENI entre enero del año 2000 y febrero del año 2017.

Los pacientes diagnosticados de ENI fueron aquellos que presentaron signos clínicos de infección severos (meningitis, bacteriemia, septicemia, neumonía bacteriémica o complicada, pleuritis, celulitis, artritis, mastoiditis, osteomielitis y/o peritonitis) y en los que se aisló un cultivo positivo de *S. pneumoniae* de sitios normalmente estériles (sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido sinovial o exudado ótico, pero no esputo). Además, como criterio de inclusión se incluyó sólo a pacientes de edad pediátrica (menores de 14 años).

Los factores de riesgo clásicos asociados con susceptibilidad a ENI fueron: anemia falciforme, fístula post-quirúrgica, trasplantes, infección por VIH, enfermedad congénita (asplenia, cardiopatías, displasia de Mondini), cardíaca, pulmonar (asma grave, displasia broncopulmonar, aspiración de meconio), hepática o renal crónica, ser prematuro o tener retraso ponderal y/o tener alguna enfermedad sistémica, lupus eritematoso sistémico o Síndrome de Down.

### **1.2.2 Pacientes con enfermedad neumocócica invasiva grave**

A partir del grupo de pacientes con ENI definidos anteriormente se estudió a los niños con ENI grave.

#### **1.2.2.1 Criterios de inclusión**

Los criterios para la inclusión de pacientes pediátricos diagnosticados de ENI grave fueron: 1) pacientes con ENI hospitalizados; 2) pacientes con diagnóstico clínico de ENI grave por meningitis, neumonías bacteriémicas, empiemas o derrame pleural, bacteriemias con complicaciones sistémicas (sepsis, shock séptico o ingreso en la unidad de medicina intensiva) y/o bacteriemias con artritis séptica u otras localizaciones.

#### **1.2.2.2 Criterios de exclusión**

Se excluyeron a los pacientes con ENI que no fueron hospitalizados y a los pacientes con ENI causada por bacteriema sin foco.

### 1.2.3 Definiciones

#### 1.2.3.1 Enfermedad neumocócica invasiva recurrente

La ENI recurrente se define como 2 o más episodios de ENI en el mismo individuo con al menos un mes de diferencia.

#### 1.2.3.2 Neumonía complicada

La neumonía complicada se define como una infección que afecta al parénquima pulmonar, que se complica al presentar una o más de las siguientes afecciones: derrame paraneumónico, empiema, neumonía necrotizante, abscesos, neumotórax o fístula broncopleural (187). Para que se considere empiema o derrame pleural complicado el líquido pleural debe caracterizarse por presentar pus libre o pH menor de 7 y el cultivo ser Gram +. Otra complicación de la neumonía es la neumonía bacteriémica, considerada como una de las formas más graves de neumonía, especialmente, con sepsis. Las complicaciones más habituales de las NAC son las causadas por empiemas o derrames pleurales, las neumonías necrotizantes y la abscesificación y, en menor medida, la sepsis.

#### 1.2.3.3 Neumonía recurrente

La neumonía recurrente se define como dos o más episodios de neumonía en un mismo año o tres o más episodios durante toda la vida, con evidencia de resolución radiológica entre los mismos (188).

#### 1.2.3.4 Sepsis

La sepsis se define como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) debido a la presencia o resultado de cualquier infección sospechada o confirmada con al menos dos de los siguientes criterios (189,190) (al menos uno de los criterios debe ser la alteración de la temperatura corporal o del recuento leucocitario):

- a) Temperatura corporal central  $> 38,5^{\circ}\text{C}$  o  $< 36^{\circ}\text{C}$  (rectal, vesical, oral o sonda central)
- b) Taquicardia, definida como:
  - Una elevación  $>2$  SD (desviaciones estándar) de la media para su edad en ausencia de estímulos externos, medicación o estímulo doloroso
  - Elevación persistente inexplicable durante 0,5-4 horas
  - Bradicardia  $<$  percentil 10 en niños menores de un año de edad en ausencia de estímulo vagal, medicación beta-bloqueante o cardiopatía congénita o disminución de la frecuencia inexplicable durante más de 0,5 horas.

- c) Taquipnea, frecuencia respiratoria > 2 SD sobre la media para la edad
- d) Leucocitosis o leucopenia para su edad o >10% de neutrófilos inmaduros.

##### 1.2.3.5 Fallo vacunal

Se define como fallo vacunal a la aparición de ENI en pacientes pediátricos con vacunación frente a *S. pneumoniae* completa y adecuada acorde a su edad teniendo en cuenta el período de incubación y la demora normal para que la protección sea adquirida como resultado de la inmunización.

Las vacunas antineumocócicas conjugadas (PCV) contienen los polisacáridos capsulares de los serotipos que se citan a continuación:

- Vacuna antineumocócicas conjugada heptavalente (PCV7 o Prevenar®): 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
- Vacuna antineumocócicas conjugada decavalente (PCV10 o Synflorix®): 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, **1, 5, 7F**
- Vacuna antineumocócicas conjugada tridecavalente (PCV13 o Prevenar 13®): 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, **1, 5, 7F, 3, 6A, 19A**

En junio de 2001 se comercializó por primera vez en España la vacuna PCV7 constituida por los 7 serotipos especificados anteriormente. Posteriormente, en marzo de 2009 se comercializó la PCV10 y por último, en junio de 2010 se comercializó la PCV13 pero no fue hasta marzo de 2015 cuando se introdujo en el calendario vacunal infantil de Canarias.

De este modo se consideró que tuvieron fallo vacunal los pacientes a los que se confirmó la presencia de *S. pneumoniae* tras transcurrir al menos 14 días desde la administración de la última dosis acorde a su grupo de edad:

- Niños vacunados entre los 0-6 meses de edad: 3 + 1 dosis de PCV7; 3 + 1 de PCV10; o 2 +1 dosis de PCV13.
- Niños vacunados entre los 7-11 meses de edad: 3 dosis (2 dosis con un intervalo de al menos 1 mes entre dosis y se recomienda una tercera dosis durante el 2º año de vida)
- Niños de 12 a 23 meses: 2 dosis (separadas 2 meses entre dosis)
- Niños de más de dos años: 1 dosis.

### **1.3. Recogida de datos**

El protocolo fue aprobado por los Comités Éticos de Investigación Clínica (CEIC) de los hospitales participantes. Para la inclusión en el estudio se recogieron los correspondientes consentimientos informados de los pacientes o, en su caso, sus representantes. El presente estudio se realizó en conformidad a la declaración de Helsinki.

En el caso de pacientes con NAC la hoja de recogida de datos incluyó datos demográficos, hábitos tóxicos (tabaquismo, consumo de alcohol u otras drogas), presencia de comorbilidades, variables biológicas habituales, uso previo de betalactámicos, uso de glucocorticoides u otras drogas inmunosupresoras y los resultados microbiológicos. Además, se registraron las complicaciones que aparecieron en los siguientes 30 días de la presentación de la NAC incluyendo enfermedades de base del paciente y/o la presencia de shock, insuficiencia renal, insuficiencia respiratoria, metástasis sépticas, ingreso en UCI.

En la hoja de recogida de datos de pacientes con ENI se recopiló: sexo, fecha de nacimiento, fecha de ingreso, edad, antecedentes familiares y del paciente, signos clínicos, serotipo, estado de vacunación neumocócica y factores de riesgo (disfunción cardiovascular, neurológica, renal, respiratoria, hematológica o hepática) y comorbilidades.

## **2. Estudios genéticos**

### **2.1. Aislamiento y purificación de ADN genómico**

De cada individuo se tomó una muestra de sangre periférica anticoagulada con EDTA. La extracción del ADN genómico se realizó mediante la técnica de extracción manual fenol-cloroformo o mediante sistemas automatizados de extracción. La extracción manual mediante la técnica de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) se realizó en muestras de individuos tomadas hasta 2009. Los sistemas automatizados de purificación de ácidos nucleicos utilizados fueron el Magpure (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA), el iPrep™ Purification Instrument utilizando los reactivos de iPrep™ PureLink® gDNA Blood Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) o el equipo Nuclisens® easyMAG® (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France).

Una vez realizada la extracción se procedió a la verificación de la integridad y cuantificación del ADN extraído mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Fisher Scientific, Wilmington, EE.UU.). Se consideraron las muestras de pureza óptima aquellas con un ratio de absorbancia 260/280nm entre 1,7-1,9.

## 2.2. Análisis de polimorfismos de genes del complemento

En el presente trabajo se han seleccionado SNV en genes del sistema del complemento (*C2*, *C3*, *CFH*, *CFB* y *C5*) con una frecuencia del alelo menor superior al 5 % ( $MAF \geq 5\%$ ) y que, además, han sido previamente asociados con alguna complementopatía o asociados a una mayor gravedad a meningitis meningocócica. Según este criterio de selección se analizaron 12 SNV: dos presentes en el gen *C2* (rs9332739, rs547154), dos variantes en el gen *C3* (rs1047286, rs2230199), 5 en el gen del *CFH* (rs800292, rs1065489, rs6677604, rs1061170, rs16840639), 2 SNV en el gen *CFB* (rs2072633 y rs4151667) y una en *C5* (rs17611) (**tabla 4**).

**Tabla 4. Polimorfismos de genes del complemento analizados**

Gen	SNV	Posición	Código de ensayo
<i>C2</i>	rs9332739	E318D	C_29531804_10
<i>C2</i>	rs547154	IVS10	C__940286_10
<i>CFB</i>	rs4151667	H9L	C__29622248_10
<i>CFB</i>	rs2072633	IVS17	C__3125456_1_
<i>CFH</i>	rs1061170	Y402H	C__8355565_10
<i>CFH</i>	rs800292	V62I	C__2530382_10
<i>CFH</i>	rs6677604	intrón	C__2530309_10
<i>CFH</i>	rs1065489	E936D	C__2530274_1_
<i>CFHR3</i>	rs426736	intrón	C_188895459_10
<i>CFHR4</i>	rs16840639	intrón	C__26753546_10
<i>C3</i>	rs2230199	R102G	C__26330755_10
<i>C3</i>	rs1047286	P314L	C__1998030_10
<i>C5</i>	rs17611	V802I	C__11720402_10

Todos los ensayos son TaqMan® SNP Genotyping Assays prediseñados (Applied Biosystems). Se trató de realizar un ensayo custom para el rs641153 del gen del factor B utilizando el software Primer Express, Applied Biosystems. Sin embargo, la síntesis personalizada de este ensayo no tuvo éxito al tratarse de una región complicada, debido a que en la misma posición nucleotídica existe la posibilidad de encontrar 3 variantes genéticas. No obstante, el SNV rs641153 está en desequilibrio de ligamiento completo con el rs547154 del gen *C2* del complemento.

La identificación de los genotipos de los diversos SNVs se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *reaccion change polymerase*) a tiempo real utilizando sondas

Taqman. Cada ensayo de identificación de genotipos TaqMan prediseñados está compuesto por un par de primers específicos, dos sondas Taqman (una marcada con el fluorocromo VIC y otra con FAM) en el extremo 5' y el Quencher (NFQ) con la unión al surco menor (MGB) en el extremo 3'. Esto permite la discriminación alélica puesto que en la reacción de amplificación sólo el primer complementario al ADN se unirá, lo cual hará que se libere la sonda y emita fluorescencia a la longitud de onda específica (VIC a 550nm y/o FAM a 520nm aproximadamente).

Las condiciones de PCR para una placa de 96 pocillos se establecieron según indica el fabricante:

- 12,2 µl de TaqMan™ Genotyping Master Mix
  - 11,25 µl de agua libre de DNAsas
  - 1,25 µl del ensayo Taqman prediseñado 20X (*Taqman SNP Genotyping Assays*, Applied Biosystems)
  - 1µl de ADN a 100ng/µl en cada pocillo
- Volumen final de cada pocillo: 25 µl

El genotipado se realizó a través de diagramas de discriminación alélica utilizando el equipo ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las condiciones de PCR estandarizadas son: desnaturalización inicial 95°C 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y anillado/extensión a 60°C durante un minuto. Los resultados fueron analizados con el programa ViiA™7 Software Instrument Console en el que se visualizó el punto final de fluorescencia relativa debido a la liberación del fluorocromo con el que estaba marcada cada sonda (VIC y/o FAM).

### **2.3. Análisis de la deficiencia C2 del complemento**

El estudio de la prevalencia de la deficiencia tipo I del gen del complemento C2 (C2D), es decir, el análisis de la delección de 28 pares de bases en el exón 6, c.841\_849+19del28 (C2, 28-bp DEL) se llevó a cabo mediante PCR convencional según el protocolo descrito previamente por Sullivan y colaboradores (132) con ligeras modificaciones mostradas en la **tabla 5**:

Posteriormente el producto de PCR obtenido fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% y teñido con bromuro de etidio. Tras observar en el transiluminador de luz UV se pudo distinguir tres patrones de bandas:

- 180 pb: homocigótico wild type (+/+)
- 180 y 152 pb: heterocigótico (+/-)
- 152pb: homocigótico con la delección (-/-)

Tabla 5. Condiciones de PCR y primers utilizados en el análisis de la deficiencia de C2

Reactivos	Condiciones termociclador		Primers			
	[ ] <sub>f</sub>	μl	Temperatura	Ciclos	Primers	Secuencia
H <sub>2</sub> O		13,98	95°-----5'	X 30	C2-Fw	5'-GCCTGGGCCCTAAAATCCAAATCCA-3'
Buffer	1,0x	2,5	95°-----30''		C2-Rv	5'-GCACAGGAAGGCCTCTGCTGCAGGC-3'
dNTPs	0,2mM	2	60°-----30''			
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM	1,5	72°-----15''			
C2-Fw	0,28μM	0,7	72°-----5'			
C2-Rv	0,28 μM	0,7	4°-----∞			
TaqPol	0,60 U	0,12				
ADN	350ng	3,5				

Kit utilizado AmpliTaq DNA Polymerase, ref. N8080156, (Applied biosystems, Foster City, CA, USA). Termociclador utilizado PCT-100 de MJ Research. [ ]<sub>f</sub>: concentración final; μl: volumen empleado en una reacción

#### 2.4. Estudio de la variación del número de copias del gen C4 del complemento

El análisis del número de copias del gen de C4 total *C4A*, *C4B* o el análisis del tamaño del gen (*C4S* o *C4L*) se llevó a cabo utilizando sondas Taqman prediseñadas (*C4A*, *Hs07226349*; *C4B*, *Hs07226350*; *C4S*, *Hs07226351*; *C4L*, *Hs07226352*, *pre-designed TaqMan® Copy Number Assays*, Applied Biosystems) mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) (191). Para ello se utilizó a su vez un gen de referencia endógeno humano, el RNaseP (*TaqMan™ Copy Number Reference Assay, human, RNase P*), mediante dúplex real time PCR para poder realizar una cuantificación relativa de las variaciones en el número de copias de los genes de interés (*C4A*, *C4B*, *C4S* o *C4L*). Los ensayos TaqMan CNV cuantificaron el gen de interés y se normalizó con el gen de referencia endógeno (RNaseP) puesto que se conoce que éste siempre tiene dos copias en un genoma diploide. Se realizó mediante cuantificación relativa utilizando el método de comparativa C<sub>T</sub> (ΔΔC<sub>T</sub>). Este método consiste en medir la diferencia de C<sub>T</sub> (ciclo umbral) entre la secuencia diana y la de referencia (ΔC<sub>T</sub>).

La reacción de cuantificación del número de copias requirió por pocillo lo siguiente:

- 4 μl ADN genómico purificado (5ng/μl)
- 10μl TaqMan Genotyping Master Mix
- 0,33μl TaqMan Copy Number Assay 60X diluido en 0.66μl de TE (concentración final 20X)
- 1μl TaqMan Copy Number Reference Assay (RNaseP) 20X
- 4μl agua libre de nucleasas

Cada *TaqMan® Copy Number Assay* contiene dos primers y una sonda MGB marcada con

FAM para detectar la secuencia diana. El ensayo de referencia, RNaseP, contiene dos primers y una sonda TAMRA marcada con VIC para detectar la secuencia de referencia del ADN genómico. Cada muestra de ADN, los blancos (muestras sin ADN que muestra la fluorescencia de fondo y permite detectar si existe contaminación) y las muestras de referencia (muestras de ADN con número de copias conocido para la región de interés) fueron cargados por cuatriplicado en cada placa para cada uno de los ensayos (C4A, C4B, C4S y C4L).

Las condiciones de PCR fueron las establecidas por el fabricante: 95°C 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos en el termociclador ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Una vez finalizada la PCR, el análisis de datos post-PCR se llevó a cabo en el software CopyCaller (Applied Biosystems CopyCaller™ Software). Para ello, los archivos con los valores de las  $C_T$  de cada muestra realizada por cuatriplicado fueron exportados del ViiA7 Real-Time PCR System e importados en el CopyCaller Software. El análisis se llevó a cabo acorde a la Guía del Usuario (PN 4400042). El riguroso control de calidad fue realizado conforme lo establecido en dicho manual de tal forma que se excluyeron (153):

- Todas las muestras con menos de tres replicados
- Muestras con confianza  $< 0,95$  y  $|CN \text{ predichas} - CN \text{ calculadas}| > 0,3$
- Muestras con Z-score  $\geq 2,65$
- Muestras con  $2,65 > Z\text{-score} \geq 1,75$  y  $|CN \text{ predichas} - CN \text{ calculadas}| > 0,3$
- Además, debió cumplirse para cada muestra que la suma del número de copias de C4A y C4B fuese igual a la suma del número de copias de C4S y C4L.

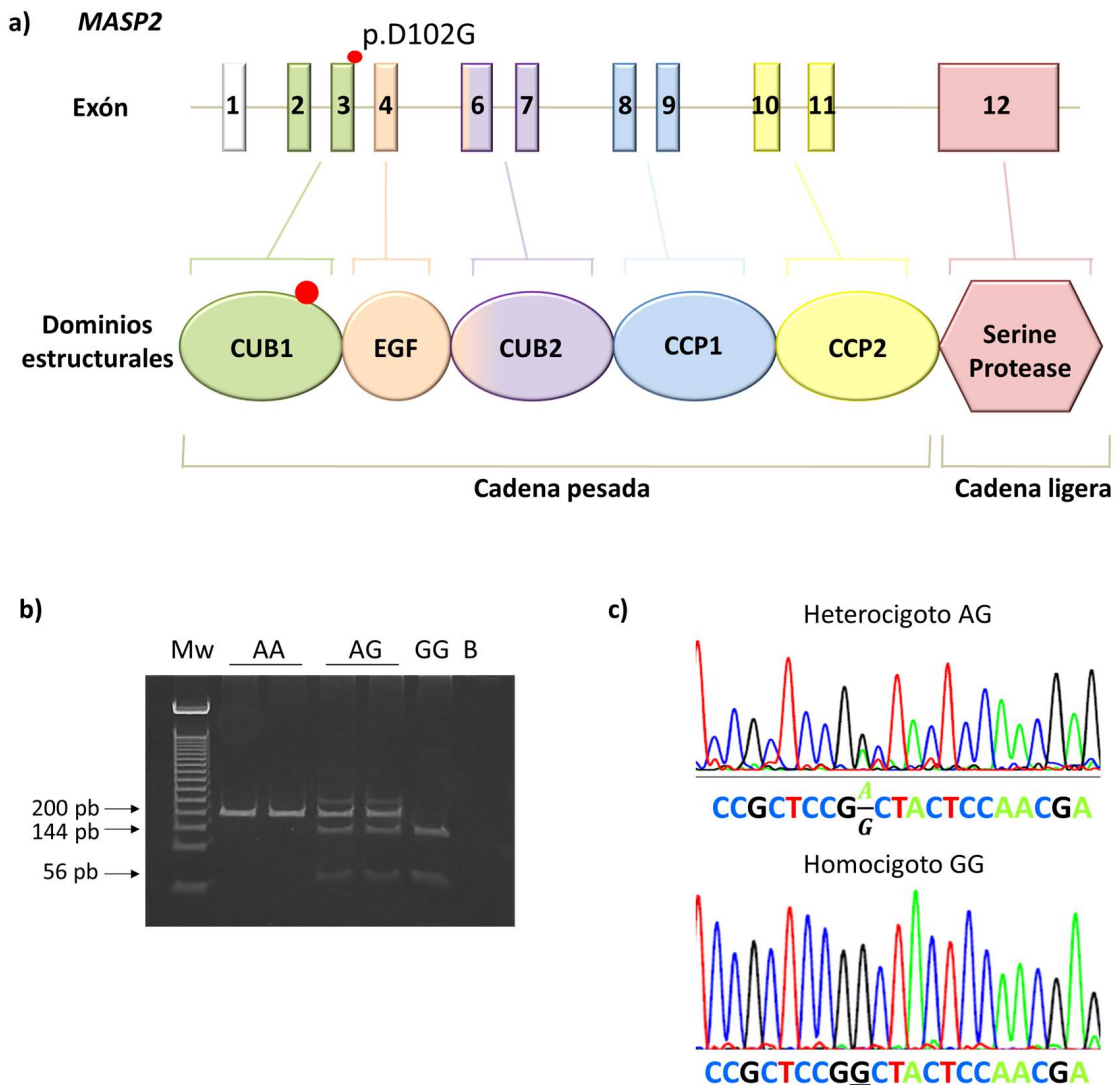
## **2.5. Análisis de la homocigosidad para el alelo p.D102G del gen *MASP2* de complemento**

### **2.5.1 Análisis del polimorfismo p.D102G del gen *MASP2***

La mutación p.D120G del gen *MASP2* (rs72550870) se localiza en el dominio CUB1 del exón 3 (chr1:11046609) (**figura 8.a**). Se caracteriza por un cambio a nivel genético de una adenina (A) por una guanina (G) (c.359A>G) dando lugar a una mutación sin sentido (*missense*) que ocasiona un cambio de aminoácido de ácido aspártico (D) a glicina (G) (p.D120G). El genotipado de esta variante genética se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP,



restriction fragment length polymorphism PCR) utilizando enzimas de restricción específicas. El protocolo llevado a cabo se detalla a continuación:



**Figura 8. Representación del genotipado de la variante p.D120G en el gen MASP2.**

a) Representación esquemática de la región codificante del gen *MASP2*, conteniendo en el dominio CUB1 la mutación p.D102G. b) Gel de electroforesis en el que se representa el patrón de bandas obtenido tras la realización de PCR-RFLP para la identificación de la mutación *D120G* en la región CUB1 del gen *MASP2*. c) Electroferograma mostrando la sustitución nucleotídica A>G en la posición 359 del exón 3 de *MASP2*. CUB: dominio CUB (para C1r/C1s, Bmp1); EGF: factor de crecimiento epidérmico; CCP: proteínas de control del crecimiento; Mw: marcador de peso molecular (pb); B: blanco

Primero se amplificó la región de ADN de interés, el dominio CUB1, mediante PCR convencional utilizando los primers CUB1D y M2-1R2 (tabla 6). Las condiciones de PCR utilizadas se especifican en la tabla 7. Posteriormente, el producto de PCR obteniendo se

visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa teñido al 2% con bromuro de etidio y se observó en el transiluminador de luz UV. El producto de PCR esperado es de 200pb.

**Tabla 6. Primers utilizados en el análisis de la mutación p.D120G en el gen *MASP2***

Primer	Orientación	Secuencia
CUB1D	Forward	5'-CCTGGCAAGGACACTTTCTAC-3'
M2-1R2	Reverse	5'-ACTGAAGGCAGGGCTGCCTG-3'
SecMASP2-Fw	Forward	5'-GCGAGTACGACTTCGTCAAGG-3'
SecMASP2-Rv	Reverse	5'-CTCGGCTGCATAGAAGGCCTC-3'

**Tabla 7. Condiciones de PCR empleadas en el análisis de la mutación p.D120G en el gen *MASP2***

Reactivos				Condiciones termociclador			
Reactivo	Stock	[ ] <sub>f</sub>	μl	Etapas	Temp. (°C)	Tiempo	Ciclo
H <sub>2</sub> O estéril			19,55				
Buffer	10x	1,0x	3	Pre-desnaturalización	94 °C	120''	1
dNTPs	2,5mM	0,2mM	2.4				
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1,5mM	1.8	Desnaturalización	94 °C	30''	
Primer Fw	10μM	0,25μM	0.8	Anillamiento	62 °C	60''	30
Primer Rev	10μM	0,25 μM	0.8	Extensión	72 °C	120''	
AmpliTaq	5U/μl	0,75 U	0.15				
ADN	100ng/μl	150ng	1.5	Extensión final	72 °C	5'	1
Volumen final			30	Hold	4°C	∞	

Kit utilizado AmpliTaq DNA Polymerase, ref. N8080156, (Applied biosystems, Foster City, CA, USA). Termociclador utilizado PCT-100 de MJ Research. [ ]<sub>f</sub>: concentración final; μl: volumen empleado en una reacción.

Por último, con el fin de determinar la presencia o no de la mutación el producto amplificado en la PCR anterior se sometió a RFLP-PCR, para ello se añadió 5U de la enzima HapII (Takara Bio USA, Inc) a 5μl del amplificado y se incubó 60 minutos a 37 °C.

A continuación, se observó el producto de la digestión tras haberlo corrido en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. La enzima HpaII es una desoxirribonucleasa tipo II que reconoce de forma específica las secuencias C<sup>A</sup>CGG, de forma que en presencia de la mutación (T<sup>C</sup>AC GGC) se producirá el corte obteniéndose dos fragmentos de 144 y 56 pb, en cambio, en aquellos individuos que presentan el alelo de referencia (TCC GAC) no se podrá producir dicho corte por lo que el tamaño esperado es de 200pb (**figura 8.b**).

### 2.5.2 Secuenciación del dominio CUB1

Con el fin de confirmar el correcto genotipado de todos los individuos homocigotos mutados se secuenció parte de la región que engloba el dominio CUB1 del gen *MASP2*. Con este fin se utilizaron los primers descritos en la **tabla 6** y se secuenció mediante el método Sanger en el secuenciador (ABI Prism 310, Applied Biosystems) (**figura 8.c**).

### 2.5.3 Identificación de casos previos

Se realizó una búsqueda exhaustiva en PubMed con el fin de identificar todos los casos previos publicados de individuos homocigóticos p.120G en el gen *MASP2*. Para ello se utilizaron los términos de búsqueda “Mannose-binding lectin-associated serine protease 2”, “Mannose-binding protein-associated serine protease 2”, “Mannan-binding lectin-associated serine protease 2”, “MASP-2” y “*MASP2*”.

## 3. Microbiología

### 3.1. Aislamiento de *Streptococcus pneumoniae*

El aislamiento de *S. pneumoniae* se llevó a cabo en el servicio de Microbiología del hospital Dr. Negrín a partir de muestras procedentes de sitios estériles de los pacientes (sangre, líquido cefalorraquídeo, pleural o articular) mediante cultivo microbiológico o PCR.

#### 3.1.1 Cultivo microbiológico

El cultivo microbiológico consistió en observar la formación de colonias  $\alpha$ -hemolíticas en agar sangre y confirmar las colonias positivas mediante la determinación de la susceptibilidad a la optoquina. Los distintos medios de cultivos utilizados fueron:

- 1º) Cultivo en agar sangre enriquecido.** Se cultivaron las muestras en agar sangre enriquecido y se incubaron 24-48 horas. Se diagnosticó como *S. pneumoniae* a aquellas muestras en las que se observó la formación de colonias  $\alpha$ -hemolíticas (rodeadas de zona verdosa de  $\alpha$ -hemólisis), pequeñas, grisáceas, mucoides (acuosas) y con apariencia umbilicada (formación de una depresión en el centro de cada colonia).
- 2º) Susceptibilidad a la optoquina.** *S. pneumoniae* es sensible a la optoquina a bajas concentraciones por lo que se colocó un disco de papel de 6mm con 5 $\mu$ g de optoquina sobre una placa de agar sangre enriquecida previamente inoculada con una colonia asilada del cultivo anterior. Se incubó 18-24 horas a 35°C en CO<sub>2</sub> al 5-7% y se observó el halo de inhibición, si es mayor de 14mm se confirmó el

aislamiento positivo de *S. pneumoniae*.

**3º) Solubilidad en bilis.** Esta técnica se realizó cuando los resultados de la prueba de la susceptibilidad a la optoquina fueron ambiguos (halo de inhibición entre 9-13mm). Aquellas muestras solubles en bilis se identificaron como *S. pneumoniae*.

**4º) Pruebas de aglutinación en lámina.** Esta prueba se llevó a cabo en las muestras que, según morfología y susceptibilidad a la optoquina, aparentan ser *S. pneumoniae* pero no son solubles en bilis. Esta técnica se realizó acorde a las instrucciones del fabricante utilizando el kit comercial Slidex-Pneumo kit, (Biomérieux, Marcy L'Etoile, Francia). La aglutinación en lámina positiva, junto a las características morfológicas y susceptibilidad positiva a la optoquina se consideraron como aislamiento de *S. pneumoniae* positivo.

### 3.1.2 Identificación molecular.

Cuando los cultivos de muestras de LCR o líquido pleural fueron negativos se enviaron para su análisis al laboratorio de referencia (Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda, Madrid). El diagnóstico se realizó mediante qPCR utilizando primers específicos del gen de neumolisina de *S. pneumoniae* y sondas taqman (192).

## 3.2. Serotipado

El serotipado de las cepas se realizó en el laboratorio de referencia mediante la reacción de Quellung acorde a las instrucciones del fabricante (Statens Serum Institut, Copenhague, Dinamarca). Cuando el cultivo fue negativo se serotipó mediante PCR a tiempo real (193).

## 4. Estudios inmunológicos

### 4.1. Niveles de inmunoglobulinas séricas

Los niveles de inmunoglobulinas séricas IgG, IgA, IgM y de las subclases de IgG se midieron mediante nefelometría, las isohemaglutininas y el título de anticuerpos se determinaron mediante métodos estándar, y los niveles de IgE se analizaron mediante ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, *enzyme-linked immunosorbent assay*).

### 4.2. Evaluación de la inmunidad innata

La inmunidad innata se evaluó analizando los niveles séricos de C3 y C4 mediante nefelometría y el CH50 (medición del complemento hemolítico total) utilizado para determinar la actividad de la VC se cuantificó mediante inmunoensayo de liposomas acorde a las

instrucciones del fabricante. Para determinar la presencia de asplenia, se estudiaron los cuerpos de Howell-Jolly en frotis de sangre y/o se realizó ecografía abdominal.

Se realizó un hemograma completo (CBC, *complete blood count*) a todos los pacientes para descartar alguna posible alteración.

### 4.3. Subpoblaciones linfocitarias

Se realizó análisis de subpoblaciones linfocitarias mediante marcaje de moléculas de superficie celular utilizando anticuerpos monoclonales específicos (AcMo) conjugados con un fluorocromo. El protocolo consistió en añadir a cada tubo de citometría 100µl de sangre total (recolectada en tubos de EDTA), añadir 3-20µl de AcMo según corresponda acorde con las instrucciones del fabricante (en la **tabla 8** se especifica el panel utilizado en este estudio) e incubar 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se añadieron 2ml de solución lisante (Facslysing solution, Becton Dickinson, San José, CA) con el fin de eliminar las células no nucleadas y se incubó 11 minutos en las mismas condiciones especificadas anteriormente. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugaron los tubos a 450g durante 5 minutos y se lavó el exceso de anticuerpo con 3 ml de PBS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> con azida de sodio al 0.1% centrifugando a 500g durante 5 minutos. Finalmente, el sobrenadante se decantó y se resuspendió el precipitado celular en 250µl de PBS azida para adquirir las células en el citómetro de flujo (FACS Canto II Becton-Dikinson). En el caso del tubo 7 previo al marcaje con los AcMo conjugados se realizaron dos lavados con PBS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (10 minutos a 300g) con el fin de evitar que las Ig séricas fluctuantes interfiriesen con la tinción de AcMo anti-Ig en la superficie celular mediante inhibición competitiva.

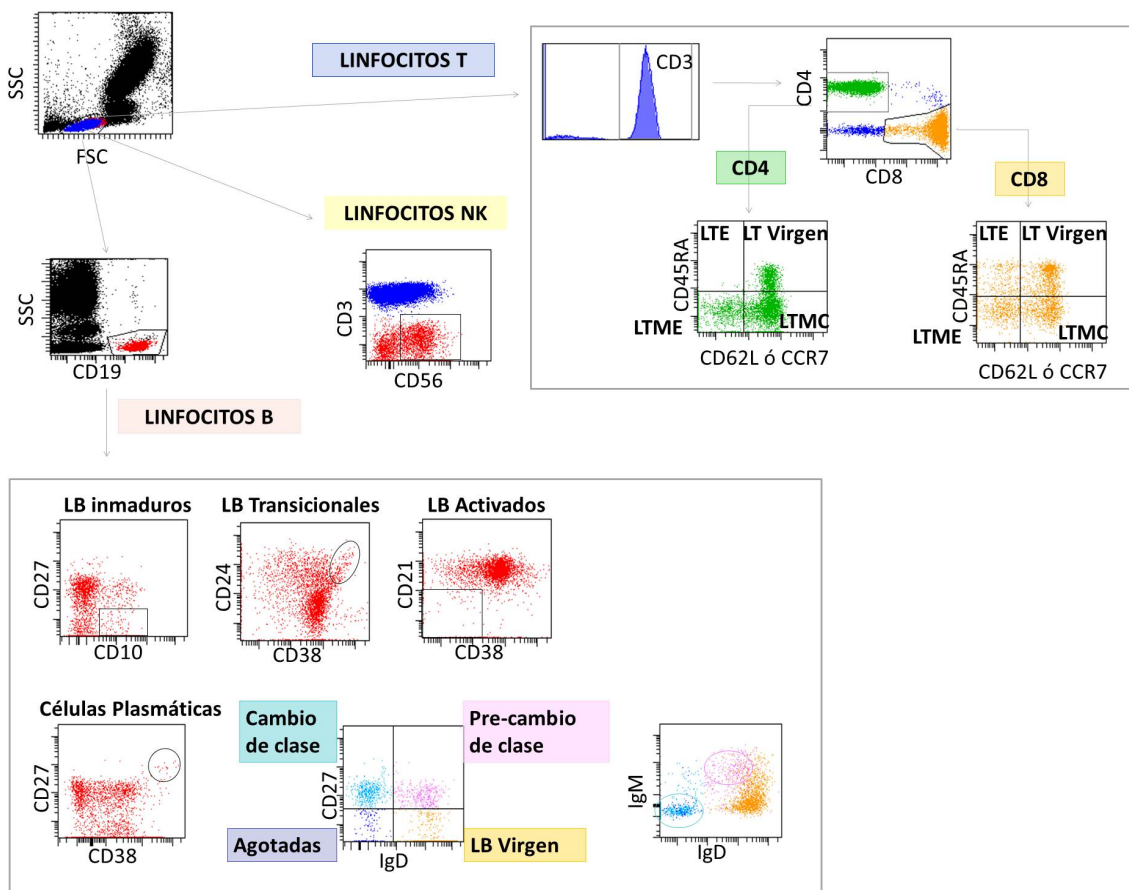
**Tabla 8. Panel de anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio de las diferentes subpoblaciones linfocitarias**

TUBO	FITC	PE	PERCP	PECy7	APC	APCH7
1	CD4	CD16	CD3	CD56	CD8	CD45
2	CD45RA	CCR7	CD3	-	CD8	CD4
3	CD57	CD28	CD3	CD8	CD4	CD45
4	CD45RA	CCR7	CD3	CD8	CD62L	CD4
5	CD24	CD38	-	CD19	CD21	CD45
6	CD27	CD10	CD20	CD19	CD38	CD45
7	CD27	IgD	-	CD19	IgM	CD45

Los fluorocromos utilizados fueron FITC, PE, PERCP, PECy7, APC y APCH7

Los marcajes utilizados fueron: CD3, CD4, CD8, CD31, CD45RA, CD45RO, CD28, CD57, CCR7, CD62L y CD21 para analizar las subpoblaciones de linfocitos T; CD19, CD20, CD10, CD27, CD24, CD38, IgD e IgM para estudiar subpoblaciones de células B; y CD3, CD56, CD16 y CD57 para evaluar las células NK. Todos los anticuerpos se adquirieron de BD (Biosciences, San José, CA, EE. UU).

Para llevar a cabo un análisis fenotípico óptimo se seleccionó la población a estudio de acuerdo al tamaño (FSC) y complejidad interna (SSC), de este modo se seleccionaron células de baja complejidad y poco granulares (región en la que se encuentran los linfocitos). De esta población se adquirieron un mínimo de 50.000 eventos de la región SSC-CD45 seleccionando la población CD45<sup>high</sup> y de baja complejidad. Las diferentes subpoblaciones se expresaron como porcentaje y células/μl del total de linfocitos totales, de linfocitos B, T CD4 o T CD8 según corresponda. En la **figura 9** se muestra un esquema del análisis realizado.



**Figura 9.** Esquema del análisis realizado en el estudio de las subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo.

LTE: linfocitos T efectores; LTME: linfocitos T memoria efectora; LTMC: linfocitos T memoria central

Las subpoblaciones de linfocitos T se identificaron mediante el marcaje con anti-CD3<sup>+</sup>. A partir de aquí se puede distinguir a los linfocitos T colaboradores (CD4<sup>+</sup>) de los linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>). A su vez, estas subpoblaciones se marcaron con anticuerpos contra la isoforma de tirosina fosfatasa (CD45RA), el receptor de quimiocinas 7 (CCR7) y el L-selectina (CD62L). Con estos, tanto los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como los CD8<sup>+</sup>, se dividieron en naïve o vírgenes (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), memoria central (LTMC: CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), memoria efectora (LTME: CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) y los linfocitos efectores (LTE: CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>). Las mismas subpoblaciones son definidas con el marcaje de CD45RA y CD62L.

Las células Natural Killer (NK) se definieron mediante el marcaje de CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>. Además, se distinguió entre las NK<sup>bright</sup> y las NK<sup>dim</sup> al combinar los marcadores CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>.

Los linfocitos B se identificaron como CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>. Mediante la utilización de diversos AcMo de superficie se analizaron los distintos fenotipos de maduración de los linfocitos B identificando: linfocitos B inmaduros (CD10<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), las células transicionales (CD38<sup>high</sup>CD24<sup>high</sup>), las activadas (CD21<sup>low</sup>CD38<sup>-</sup>) y las células plasmáticas (CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>). Además, mediante la combinación de los marcadores de CD27, IgD e IgM pudimos identificar a los linfocitos B vírgenes o naïve (CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>), a las células *pre-switch memory* (pre-cambio de clase: CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), las *switch memory* (con cambio de clase: CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) y las células *exhausted* (agotadas: CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>).

Al tratarse de una población pediátrica todos los valores analizados se compararon con los valores de referencia publicados acorde a la edad de cada individuo (194–199). En la **tabla 9** se muestra un resumen de los valores de referencia de linfocitos T y B obtenidos a partir de la bibliografía citada.

**Tabla 9. Recuento de linfocitos en sangre periférica en niños sanos: distribución por edad**

	3-6 MESES		6-12 MESES		1-2 AÑOS		2-6 AÑOS		6-12 AÑOS		12-18 AÑOS	
	%	Células	%	Células	%	Células	%	Células	%	Células	%	Células
<b>LINFOCITOS TOTALES</b>	3,9-9,0		3,4-9,0		3,6-8,9		2,3-5,4		1,9-3,7		1,4-3,3	
<b>LINFOCITOS T (CD3<sup>+</sup>)</b>	51-77	2,5-5,6	49-76	1,9-5,9	53-75	2,1-6,2	56-75	1,4-3,7	6-76	1,2-2,6	56-84	1,-2,2
<b>LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup></b>	35-56	1,8-4,0	31-56	1,4-4,3	32-51	1,3-3,4	28-47	0,7-2,2	31-47	0,7-1,5	31-52	0,5-1,3
T CD4 vírgenes	77-94	1,3-1,7	64-93	1,1-3,7	6-91	1,0-2,9	53-86	0,4-1,5	46-77	0,3-1,0	33-66	0,2-0,8
T CD4 memoria	3-16	0,1-0,6	5-18	0,2-0,8	7-20	0,2-0,9	9,26	0,2-0,7	13-30	0,2-0,6	18-38	0,2-0,7
<b>LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup></b>	12-23	1,0-1,6	12-24	0,5-1,7	14-30	0,6-2,0	16-30	0,5-1,3	18-35	0,4-1,1	18-35	0,3-0,9
Linfocitos T helper virgen	64-92	1,3-1,6	58-91	1,1-3,6	62-90	0,9-2,8	50-85	0,4-1,5	42-74	0,3-1,0	31-65	0,2-0,8
Linfocitos T citotóxicos virgen	53-88	0,5-1,2	47-48	0,3-1,2	46-85	0,4-1,4	42-81	0,3-0,9	39-73	0,2-0,7	42-73	0,2-0,6
<b>LINFOCITOS NK</b>	3-14	0,2-0,8	3-15	0,2-0,95	3-15	0,2-0,9	4-17	0,1-0,7	4-17	0,1-0,5	3-22	0,1-0,5
<b>LINFOCITOS B (CD19<sup>+</sup>)</b>	11-41	0,4-3,0	14-37	0,6-2,6	16-35	0,7-2,6	14-33	0,4-1,4	13-27	0,3-0,9	6-23	0,1-0,6
Inmaduros/transicionales	17-32	0,1-1,2	9,3-27	0,07-0,8	9,7-18	0,1-0,3	3,6-21	0,02-0,3	2,9-23,8	0,01-0,06	1,5-19	0,0-0,04
Transicionales	8,3-15,8	0,03-0,2	8,3-16	0,03-0,2	5,1-16	0,03-0,16	4,5-11	0,02-0,1	3,9-9,2	0,01-0,04	3,9-7,8	0,01-0,02
Memoria sin cambio de isotipo	1,6-4,1	0,01-0,04	1,6-4,1	0,01-0,04	4,2-6,9	0,04-0,09	4,1-9,0	0,03-0,1	4,6-12,4	0,01-0,04	4,6-10,2	0,01-0,03
Memoria con cambio de isotipo	0,1-1,9	0,0-0,02	0,1-1,9	0,0-0,02	1,5-4,1	0,01-0,04	1,5-7,4	0,01-0,04	3,3-12,1	0,01-0,03	3,3-9,6	0,01-0,03

Los valores son representados en porcentaje y número de células por microlitro  $\times 10^{-3}$ . Linfocitos T CD4: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>; T CD4 vírgenes: CD45RA<sup>+</sup>; T CD4 memoria: CD45RO<sup>+</sup>; linfocitos T CD8: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; linfocitos T helper virgen: CD4CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>; linfocitos T citotóxicos virgen: CD8CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>; linfocitos NK: CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>; linfocitos B inmaduros/transicionales: CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>; linfocitos B transicionales: CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD38<sup>++</sup>; memoria sin cambio de isotipo: CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>; Memoria con cambio de isotipo: CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>.

#### 4.4. Ensayos funcionales

##### 4.4.1 CD62L shedding

Se realizaron ensayos funcionales para revelar defectos en la vía TLR mediante citometría de flujo basados en detectar la liberación de la selectina-L (CD62L) en la superficie de los granulocitos tras estimular con diversos agonistas.

El procedimiento a realizar consistió en incubar 100µl de sangre procedente de heparina de litio durante 1 hora sin estímulos o con diversos agonistas de TLR, con PMA o TNF- $\alpha$  a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Los estímulos y las concentraciones utilizadas se detallan en la **tabla 10**. Todas las células previo a las incubaciones con los estímulos fueron incubadas 20 minutos con 20µg/ml de polimixina B (Sigma, P-4932) (excepto en la incubación con LPS).



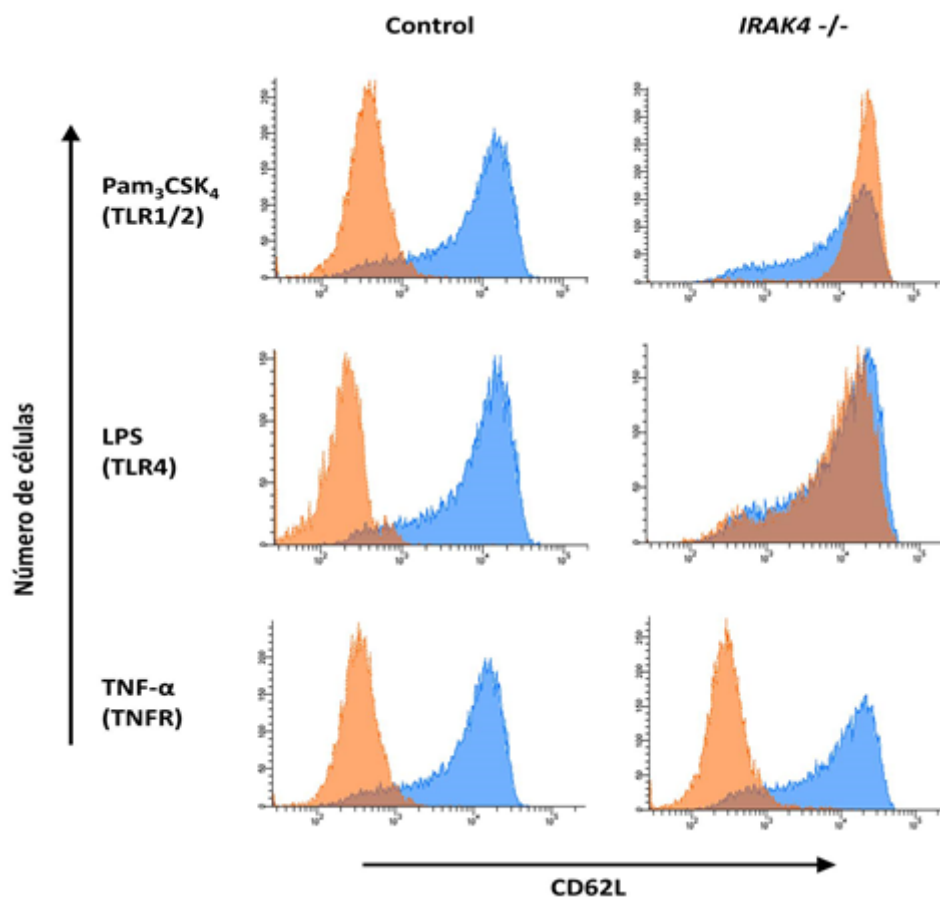
**Tabla 10. Estímulos utilizados en la técnica CD62L shedding**

Estímulo	Agonista de	Concentración (ng/ml)	Referencia
Pam <sub>2</sub> CSK <sub>4</sub>	TLR2/6	10	Invivogen, San Diego, CA, tlr1-pm2
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	TLR1/2	10	Invivogen, San Diego, CA, tlr1-pms
LPS <i>Salmonella minnesota</i>	TLR4	1	Sigma, St Louis, MO, L-4641
TNF- $\alpha$	TNFR	20	R&D systems, Minneapolis, MN, 210-TA
PMA	Estimulación inespecífica	2000	Sigma, St Louis, MO, P-8139

Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub>: synthetic diacylated lipopeptide; Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>: synthetic triacylated lipopeptide; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$  PMA: Phorbolmyristyl acetate

Posteriormente, el contenido de cada tubo se dividió en dos tubos, uno se marcó con el AcMo anti-CD62L con el fluoróforo PE (BD Biosciences, cat. 341012) y el otro con su respectivo control isotópico mouse anti-IgG1k en PE (BD Biosciences, cat. 555749), ambos fueron marcados con anti-CD45 en APC (BD Biosciences, cat. 555485) y se incubaron 15 minutos en hielo y en oscuridad. Luego se lisaron con 2ml de Facslysing solution (Becton Dickinson, San José, CA) y se lavaron con PBS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> con azida de sodio al 0,1%. Este protocolo fue realizado con pequeñas modificaciones a partir del publicado por Bernuth et al. (200).

Se analizaron en el citómetro de flujo (FACS Canto II Becton-Dikinson) al menos 6000 eventos localizados en la región de alta complejidad celular (SSC) y alta expresión de CD45, lugar donde se encuentran las células polimorfonucleares. El estudio de pérdida de expresión de CD62L en la membrana de los granulocitos (CD62L shedding) se analizó a través de histogramas en el que se observó en controles sanos que tras estimular se indujo un fuerte CD62L shedding mientras que en los tubos no estimulados permanece expresándose CD62L. En pacientes con deficiencia de la vía de TLR cabría esperar que no se produjese pérdida de la expresión de CD62L tras incubación con el correspondiente estímulo que esté implicado en que se produzca dicho defecto. En la **figura 10** se muestra a modo de ejemplo el corte de CD62L en granulocitos de un control sano y un paciente con deficiencia de IRAK-4 tras la estimulación con diversos agonistas de TLR y de TNFR.



**Figura 10.** Escisión del ligando CD62 (CD62L) en la superficie de los granulocitos en un control sano y un paciente con deficiencia de IRAK-4.

Se muestra una representación al activar con agonistas de TLR1/2 (PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>), TLR4 (LPS) o TNF- $\alpha$ . En azul se indica expresión de CD62L en granulocitos no estimulados y en naranja se muestra la expresión de CD62L 1 hora después de activar con los diferentes agonistas (CD62L shedding inducido).

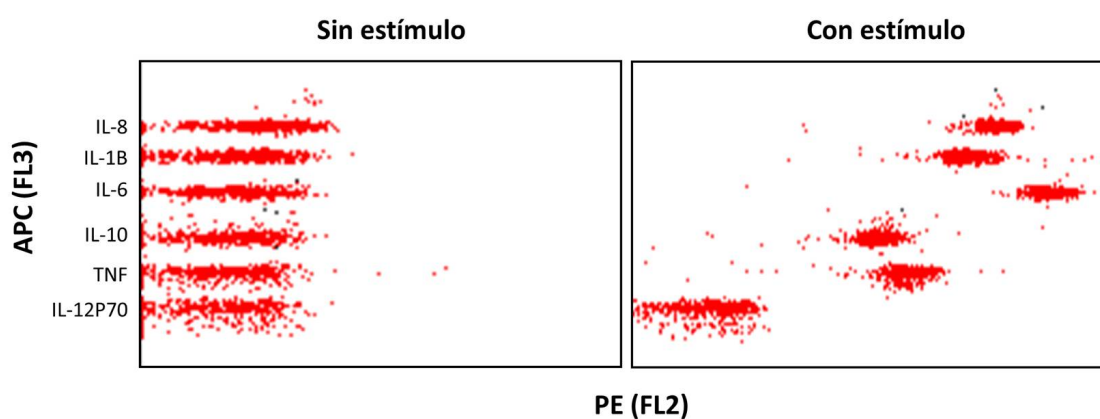
#### 4.4.2 Cuantificación de citocinas

En aquellos pacientes en los que no hubo pérdida de expresión de CD62L se realizó un análisis de producción de citocinas mediante CBA (*Cytometric Bead Array*, BD Biosciences, San Diego, USA) utilizando el kit *Human Inflammatory Cytokine*.

Para ello, sangre total extraída en tubos con heparina de litio, fue incubada con diversos estímulos: Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> 1 $\mu$ g/ml; Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> 1 $\mu$ g/ml; LPS *Salmonella minnesota* 1 $\mu$ g/ml; LPS *Escherichia coli* 500ng/ml; Poly I:C (ácido polinosínico-policitidílico) 50ng/ml; PMA/Ionomicina 10ng/ml y 1ng/ml respectivamente durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>; TNF $\alpha$  20ng/ml se incubó 48 horas en las mismas condiciones. Ambas incubaciones también incluyeron controles

negativos (sin estimular) con y sin polimixina. Pasado el periodo de incubación, se centrifugaron los tubos con las muestras (350g, 10minutos) y se recogió el sobrenadante.

Posteriormente, la producción de citocinas se determinó a partir de los sobrenadantes extraídos de los cultivos mediante la técnica de CBA. El kit utilizado *Human Inflammatory Cytokine* permite analizar las citocinas IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70. El procedimiento y análisis se llevó a cabo acorde a las instrucciones del fabricante. El fundamento teórico de esta técnica consiste en la utilización de seis poblaciones de microesferas (beads) recubiertas con anticuerpos de captura específicos para IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70 cada una con distintas intensidades de fluorescencia y detectadas en el canal rojo (FL3) del citómetro de flujo (**figura 11**). Dichas poblaciones junto con los anticuerpos de detección unidos a PE y los estándares de cada citocina o los sobrenadantes a analizar se incubaron para dar lugar a la formación del sándwich. El análisis de los resultados se llevó a cabo en el software FCAP Array™ (BD Biosciences, San Diego, USA). El análisis se basa en medir la cantidad de cada citocina presente en cada muestra interpolando la intensidad de fluorescencia de PE de cada anticuerpo de detección presentes en el sándwich con la curva estándar obtenida para cada citocina.



**Figura 11. Histogramas representativos de la técnica CBA mediante citometría de flujo.**

Se observa las diferentes intensidades de fluorescencia emitidas por cada una de las citocinas (IL-8, IL-1B, IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70) en un control sano sin estimular y tras estimular con un agonista de TLR4 (LPS).

#### 4.4.3 Evaluación de los niveles séricos de anticuerpos IgG contra polisacárido capsular neumocócico y toxoide tetánico

Se analizó los niveles séricos de anticuerpos IgG contra polisacáridos capsulares neumocócico (PCP) de los pacientes utilizando el kit *VaccZyme™ Anti-PCP IgG Enzyme Immunoassay Kit* (MK012) y los niveles de IgG contra toxoide tetánico se midieron con el kit

VaccZyme™ Anti-tetanus toxoid IgG Enzyme Immunoassay Kit (MK010) (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK).

El kit *VaccZyme™ Anti-PCP IgG Enzyme Immunoassay Kit* mide las respuestas de anticuerpo a las vacunas neumocócicas que incorporan 23 polisacáridos aislados de *S. pneumoniae* (1-5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F). Estos polisacáridos representan el 80% de los serotipos de virulencia.

El fundamento teórico de esta técnica consiste en recubrir los pocillos con el antígeno correspondiente (toxoides tetánico o PCP) y añadir a los pocillos los calibradores, controles o muestras diluidas de los pacientes de tal forma que los autoanticuerpos reconocerán el antígeno del pocillo tras incubarlo. Posteriormente se realiza una serie de lavados para eliminar el exceso de proteína y se añade un anticuerpo secundario conjugado, anti-IgG marcado con peroxidasa. Éste, tras ser incubado, se unirá al anticuerpo capturado. El exceso de conjugado también es eliminado mediante lavados y se visualiza al añadir el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente, se para la reacción al añadir ácido fosfórico y se mide la absorbancia a 450nm mediante espectrofotometría. La concentración del anticuerpo en cada muestra es proporcional a la intensidad del color producido al añadir el sustrato. La técnica es procesada y analizada en el DS2 systems (DYNEX Technologies, Sullyeld Circle Chantilly, USA).

Los valores de referencia indican que valores >0,15 UI/mL de anticuerpos anti-toxoides tetánico en suero muestran que el paciente tiene protección inmune adecuada. Valores inferiores indican que el paciente carece de protección inmune. Por otro lado, valores inferiores a 43,8 - 50 mg/L manifiestan baja o nula protección inmune frente a *S. pneumoniae*.

## 5. Análisis estadístico

Las variables continuas (cuantitativas) fueron expresadas como la media  $\pm$  la desviación estándar (SD). Las diferencias entre esos grupos se realizó aplicando el test t de Student para muestras independientes paramétricas o el test U de Mann-Whitney en los casos no paramétricos. El análisis de correlación entre variables cuantitativas se realizó mediante los tests de correlación de Pearson y de Spearman.

Las variables categóricas (cualitativas) se representaron como las frecuencias observadas. La comparación de las frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas y de complotipos entre casos y controles en las distintas SNVs para el estudio de asociación se llevó a cabo mediante modelos de regresión logística (test de  $\chi^2$  o test exacto de Fisher según

correspondiese). A su vez, se asumieron en todos los casos modelos de herencia AD y AR mediante regresión logística.

El Equilibrio Hardy-Weinberg se testó utilizando  $\chi^2$  con corrección de Yates para comparar las frecuencias genotípicas observadas y esperadas. El umbral se estableció en  $p > 0,0029$ . Los SNVs que no superaron dicho umbral y, por tanto, no se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg fueron excluidos del análisis.

Los análisis estadísticos se realizaron tomando intervalos de confianza al 95% (IC 95%) y un nivel de significación del 5%. Un contraste de hipótesis se consideró significativo cuando el valor del parámetro  $p$  fue inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, por lo que en adultos pasó a considerarse significativo cuando el valor de  $p$  fuese inferior a 0,0029 ( $0,05/17$ ) debido al estudio de los 17 SNVs incluidos en esta Tesis Doctoral. Para cada variable independiente se calculó su odd ratio (OR) y su 95% IC, tanto a nivel alélico como genotípico acorde a su modelo de herencia. Todos los análisis estadísticos descritos se llevaron a cabo mediante el software SPSS 20.0 (SPSS, Inc, Chicago, Ill, USA).

El análisis del desequilibrio de ligamiento (DL,  $D'$  y  $r^2$ ) se realizó mediante el software Haploview v.4.2 tanto en el grupo control como en los pacientes. Las frecuencias de haplotipos se estimaron mediante el programa PHASE v 2.1 y la asociación haplotípica se evaluó mediante SNPStats (<https://www.snpstats.net/start.htm>).

Con el fin de determinar posibles interacciones entre las SNV e identificar si las asociaciones incrementan el riesgo de NNAC, se llevó a cabo el método de Reducción de Dimensionalidad Multifactorial (MDR, *Multifactor Dimensionality Reduction*) mediante el software MDR v3.0.2. Es un software estadístico basado en un método no paramétrico que determina un modelo en función de las relaciones que se producen entre las variantes genéticas (201). Los posibles efectos epistáticos se muestran en un gráfico de interacción construido a partir de medidas de entropía. Esta medida conocida como ganancia de información determina si la interacción es sinérgica (valor positivo), redundante (valor negativo) o independiente (valor nulo). El color de las líneas de interacción entre dos variantes indican el tipo de interacción que se establece entre ellas: rojo y naranja muestran una relación sinérgica (epistasia); amarillo muestra independencia de las variantes; verde y azul sugieren redundancia o correlación.

La distribución de GCN de C4A, C4B, C4S, C4L y C4 total se realizó mediante análisis del test de  $\chi^2$ . El número de copias C4 y las frecuencias de grupos de números de copias entre

casos y controles se analizaron mediante el test de Fisher o  $\chi^2$ . La media del GCN de  $C4 \pm SD$  se comparó entre controles y pacientes mediante la prueba t de Student. Para todos los análisis,  $p < 0,05$  se consideró significativo y los resultados se ajustaron mediante la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples ( $p < 0,0029$ ).



# **V. RESULTADOS**

---





## **1. Identificación de alelos de riesgo a neumonía adquirida en la comunidad y enfermedad neumocócica en genes del sistema del complemento**

Como se ha comentado anteriormente, existen diversos factores asociados a una mayor susceptibilidad a la infección neumocócica. El principal factor es el agente causal ya que el neumococo ha desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmunológica. No obstante, también influyen otros factores como la genética de cada individuo.

El sistema del complemento es un mecanismo de defensa crucial en la defensa del huésped contra los microorganismos. No obstante, una activación en exceso o en defecto puede ser perjudicial para el huésped y provocar en él enfermedades autoinmunes o inflamatorias crónicas y aumentar la susceptibilidad a infecciones. Diversas SNVs en el sistema de complemento se han asociado a enfermedades inflamatorias crónicas mediadas por el complemento (159,166,177,179). Sin embargo, solo unas pocas variantes distintas de las clasificadas como IDP se han asociado con infecciones bacterianas (64,175,202).

El primer objetivo de la presente Tesis Doctoral consistió en realizar un estudio de asociación genética para investigar el papel de variantes genéticas comunes del sistema del complemento en la susceptibilidad a NAC, en concreto a NNAC en adultos. Las variantes genéticas incluidas en el análisis se seleccionaron a partir de estudios previos realizados de asociación con enfermedades inflamatorias crónicas mediadas por el sistema del complemento o por asociaciones previas a la susceptibilidad de infecciones neumocócicas o meningocócicas.

### **1.1. Asociación de variantes genéticas de genes del complemento a neumonía adquirida en la comunidad en adultos**

#### 1.1.1 Estudio clínico demográfico

##### 1.1.1.1 Características clínicas y demográficas

El grupo de pacientes con NAC, consiste en una cohorte constituida por 932 pacientes, de los cuales 356 pacientes eran NNAC. Todos los individuos eran blancos de origen español, procedentes de seis hospitales españoles. La media de edad de los pacientes con NAC fue de  $61,3 \pm 17,7$  años y su distribución por sexos fue de un 66,2% hombres frente al 33,8% de mujeres (**tabla 11**). En nuestro grupo control se incluyeron 851 individuos adultos blancos de

origen español procedentes de la misma región que los pacientes reclutados. La media de edad fue de  $44,5 \pm 19,2$  años y su distribución por sexos fue 50% mujeres y 50% hombres.

**Tabla 11. Características demográficas y clínicas de los pacientes con NAC y NNAC**

Características	NAC (932)	NNAC (356)
<b>Demográficas</b>		
Año (media $\pm$ SD)	61,3 $\pm$ 17,7	60,6 (17,8)
Género (hombre) *	617 (66,2)	229 (64,3)
<b>Comorbilidades * #</b>		
EPOC	232 (24,9)	87 (24,4)
Asma	37 (4,0)	7 (2,0)
Diabetes	208 (22,3)	74 (20,8)
Insuficiencia hepática	55 (5,9)	29 (8,1)
Insuficiencia renal agudo	74 (7,9)	27 (7,6)
Enfermedad cardiovascular	106 (11,4)	37 (10,4)
Enfermedad autoinmune	35 (3,8)	11 (3,1)
Neoplasia	99 (10,6)	42 (11,8)
Enfermedad neurológica	108 (11,6)	49 (13,8)
Enfermedad psiquiátrica	42 (4,5)	11 (3,1)
No comorbilidades	268 (28,8)	118 (33,1)
<b>Gravedad *</b>		
PSI I-III	348 (41,1)	140 (41,0)
PSI IV-V	499 (58,9)	201 (58,9)
<b>Variables clínicas (media <math>\pm</math> SD)</b>		
Glucemia (mg/d)	152,0 $\pm$ 82,3	148,3 $\pm$ 87,1
Hematocrito (%)	37,9 $\pm$ 5,8	38,2 $\pm$ 5,5
Natremia (meq/L)	136,5 $\pm$ 5,1	136,4 $\pm$ 4,9
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	37,7 $\pm$ 1,3	37,6 $\pm$ 1,5
BUN (mg/dL)	31,4 $\pm$ 26,2	34,8 $\pm$ 30,3
Ritmo cardiaco	103,4 $\pm$ 21,2	107,9 $\pm$ 21,4
<b>Complicaciones *†</b>		
Ingreso en UMI	360 (38,6)	136 (38,2)
Bacteriemia	132 (14,2)	100 (28,1)
Derrame pleural	268 (27,8)	97 (27,4)
Fallo renal agudo	258 (27,7)	110 (30,9)
Sepsis grave	347 (37,2)	139 (39,0)
SDRA	68 (7,3)	31 (8,7)
Ventilación mecánica	255 (27,4)	90 (25,3)
FMO	187 (20,1)	79 (22,2)

\* Los valores representan el número de individuos y el porcentaje sobre el total (%)

# Algunos pacientes tienen más de una comorbilidad.

† Algunos pacientes tienen más de una complicación.

NAC: neumonía adquirida en la comunidad; NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad; SD: desviación estándar; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice de severidad de la neumonía (*pneumonia severity index*). BUN: nitrógeno urémico en sangre (*Blood urea nitrogen*); SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo. FMO: Fracaso multiorgánico

Del total de los pacientes con NAC, sólo el 28,8% no presentaba ninguna comorbilidad conocida. En el resto de pacientes (n=664) se describió al menos una de las comorbilidades consideradas en el estudio (**tabla 11**). Las comorbilidades más frecuentes fueron EPOC (24,9%) y diabetes (22,3%). En cuanto a los pacientes con NNAC las frecuencias de comorbilidades fueron similares a las de las NAC, aunque destaca que fue mayor el porcentaje de pacientes que no presentaba comorbilidades (33,1%).

#### 1.1.1.2 Gravedad

En cuanto a la gravedad, el 58,9% de los pacientes con NAC y NNAC se clasificaron a su ingreso hospitalario como de gravedad moderada alta (PSI IV-V). De hecho, más de 38% de los pacientes tuvieron que ser ingresado en UMI. En pacientes con NAC el 38,5% presentó neumonía complicada y el 37,2% de los pacientes desarrollaron formas graves de sepsis (sepsis grave o shock séptico). En pacientes con NNAC casi la mitad de los pacientes (49%) presentaron una neumonía complicada y el 39% de los pacientes desarrollaron formas graves de sepsis (sepsis grave o shock séptico) (**tabla 11**).

#### 1.1.1.3 Microbiología

El agente etiológico causante de la NAC se confirmó el agente etiológico causante de la NAC en 530 pacientes (56,9%), de los cuales sólo el 9,4% presentaban infecciones polimicrobianas. El patógeno aislado más frecuente fue *S. pneumoniae*, con un porcentaje del 38,2% con respecto al total de los pacientes con NAC y un 67,2% de aquellos en los que se diagnosticó el agente causal de la infección. El segundo agente etiológico aislado más frecuente fue *Staphylococcus aureus* (4,5%), seguido de *H. influenzae* (4,3%) (**tabla 12**). El porcentaje de pacientes que desarrolló bacteriemia fue considerablemente mayor en pacientes con NNAC (28,1%) que en pacientes con NAC no neumocócica (14,2%) (**tabla 11**).

**Tabla 12. Características microbiológicas de los pacientes con NAC**

Características microbiológicas	NAC (932)
	N (%)
<b>Aislado microbiológico</b>	
SI	530 (56,9)
NO	402 (43,1)
<b>Aislados</b>	
Monomicrobiano	482 (90,6)
Polimicrobiano	50 (9,4)
<b>Diagnóstico etiológico*</b>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	356 (67,2)
<i>Staphylococcus aureus</i>	24 (4,5)
<i>Haemophilus influenzae</i>	23 (4,3)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20 (3,8)
Otros #	120 (22,6)

NAC: neumonía adquirida en la comunidad; NNAC: neumonía neumocócica; N (%): los valores representan el número de individuos (N) y el porcentaje (%) con respecto al total.

\* En un mismo paciente puede estar causando la infección más de un agente etiológico

# *Legionella pneumophyla*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Nocardia asteroides*, *Fusobacterium*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Peptostreptococcus*, *Aeromonas caviae*, *Coxiella burnetii*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus coagulasa (-)*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter diversus*, *Streptococcus milenii*, *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus viridans*, *Moraxella catharralis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus sanguis*, *virus Influenza A*, *virus Varicela*, *virus Respiratorio Sincitial*, *virus influenza B* o *virus parainfluenza*.

### 1.1.2 Estudio de las variantes genéticas de genes de complemento

Todos las SNVs analizadas (**tabla 13**) se encontraron, tras aplicar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, en equilibrio de Hardy-Weinberg (**tabla 14**).

Para evaluar la asociación genotípica y alélica de las distintas SNVs con la susceptibilidad a adquirir la enfermedad se comparó su distribución entre los pacientes con NNAC y el grupo control (**tabla 15**) y entre pacientes con NAC e individuos controles (**tabla 16**). Los resultados revelaron que dos SNVs, la rs547154 en el gen C2 y la rs2230199 en el gen C3, se asociaron significativamente con NAC y NNAC después de la corrección de comparaciones múltiples (**tabla 15 y 16**). La variante rs1047286 del gen C3 se asoció significativamente a nivel genotípico a NNAC (**tabla 15**).

**Tabla 13. Información sobre la localización, distribución y efectos conocidos de las SNVs analizadas en genes del complemento**

Gen	SNV	Posición SNV	Posición nucleotídica	Frecuencia CEU*	Fuerte DL	Fenotipos asociados al alelo de menor frecuencia		Ref.
						Riesgo	Protección	
C2	rs9332739	E318D	Chr.6: 31936027	G:94% ; C:6%	rs4151667 (fB <sub>L9H</sub> )	-	DMAE	(161)
C2	rs547154	IVS10	Chr.6:31943161	G:93% ; T:7%	rs641153 (fB <sub>R32Q</sub> )	-	DMAE	(161)
CFB	rs4151667	H9L	Chr.6:31946247	T:94% ; A:6%	rs9332739	-	DMAE	(161)
CFB	rs2072633	IVS17	Chr.6:31951801	G:60% ; A:40%	-	-	DMAE	(158)
CFH	rs1061170	Y402H	Chr 1:196690107	T:61% ; C:39%	rs1061147 en SCR5	DMAE, EDD	-	(203,204)
CFH	rs800292	V62I	Chr.1:196673103	G:78% ; A:22 %	-	VCP	DMAE, EDD, SHUa	(166)
CFH	rs6677604	-	Chr.1:196717788	G:79% ; A:21%	CFHR3-A, rs16840639	LES, SHUa	NIgA, DMAE, C3G	(167,168)
CFH	rs1065489	E936D	Chr.1:196740644	G:84% ; T:16%	rs426736, rs385390, rs371075, rs11582939, rs3753396	SHUa	MB	(169,170)
CFH R4	rs16840639	-	Chr 1:196855643	T:79% ; C:21%	rs6677604	LES	-	(167)
C3	rs2230199	R102G	Chr.19:6718376	C:82% ; G:18%	rs1047286	DMAE, EDD	-	(172)
C3	rs1047286	P314L	Chr.19:6713251	G:80% ; A:20%	rs2230199	DMAE, EDD	MB	(161,173)
C5	rs17611	V802I	Chr.9:121006922	C:60% ; T:40%	-	-	AR, MB†	(174,175)

\*Ensembl (<https://www.ensembl.org/>). GRCh38.p13

# Frecuencia de residentes de Utah con ascendencia del norte y oeste de Europa

† El alelo T de la SNV rs17611 se asoció con menor gravedad del desarrollo de meningitis neumocócica

SNV: variación del número de copias; DL: desequilibrio de ligamiento; Ref: referencias bibliográficas; SHUa: síndrome hemolítico urémico atípico; DMAE: degeneración macular del adulto asociada a la edad; DDD: enfermedad de depósitos densos; LES: lupus eritematoso sistémico; IgAN: nefropatía por IgA; MB: meningitis bacteriana; AR: artritis reumatoide

**Tabla 14. Equilibrio de Hardy-Weinberg de las SNVs analizadas en controles**

Gen	SNV	Control	
		N	Eq H-W
CFH	rs1065489	851	0,054
	rs16840639	851	0,606
	rs1061170	851	0,113
	rs6677604	851	0,319
	rs800292	851	0,008
CFB	rs4151667	851	0,387
	rs2072633	851	0,800
C2	rs547154	851	0,028
	rs9332739	851	0,145
	28-bp DEL	1081	0,939
C5	rs17611	851	0,238
C3	rs1047286	851	0,962
	rs2230199	851	0,832

Los valores muestran el valor de significación obtenido tras realizar el test de  $\chi^2$ . N: número de controles analizados en cada variante genética (SNV); Eq. H-W: equilibrio de Hardy Weinberg.

Los genes *CFB* y *C2* son genes parálogos localizados en el MHC-III. Los polimorfismos rs641153 (p.R32Q) en el gen *CFB* y rs547154 en el gen *C2* están en DL completo en todas las poblaciones estudiadas hasta el momento a nivel mundial. En concreto, las poblaciones europeas presentan un DL completo ( $D'=1$ ,  $r^2=1$ ) según informa el proyecto 1000 genomes (<https://www.ensembl.org>). Debido a que la SNV rs641153 del gen *CFB* no se pudo analizar mediante ensayos TaqMan, analizamos la SNV rs547154 del gen *C2* como un SNV marcador del rs641153 del gen *CFB*. El alelo de menor frecuencia de la SNV rs547154 (rs547154-T) del gen *C2* se asoció significativamente con predisposición a NNAC ( $p=0,0003$ ; OR 1,55 IC 95% 1,22-1,98) (**tabla 15**). El alelo de menor frecuencia de la SNV rs2230199 (rs2230199-G) del gen *C3* se asoció con una reducción del riesgo de NNAC ( $p=0,0003$ ; OR 0,65 IC 95% 0,51-0,82). En los pacientes con NAC, el papel desempeñado por estas dos SNVs fue similar a la establecida en los pacientes con NNAC: el alelo de menor frecuencia de la SNV rs547154-T se asoció con mayor riesgo a NAC ( $p=0,002$ ; OR 1,35 IC 95% 1,11-1,64) mientras que la frecuencia del rs2230199-G disminuyó en pacientes con NAC respecto a los controles ( $p=0,000015$ ; OR 0,68 IC 95% 0,51-0,81) (**tabla 16**).

La frecuencia del alelo menos frecuente de la SNV rs1047286 del gen *C3* (rs1047286-A) fue significativamente menor en pacientes con NNAC que en controles ( $p=0,004$ ; OR 0,69 IC 95% 0,53-0,89), sin embargo, esta asociación no se mantuvo tras aplicar la corrección de comparaciones múltiples (**tabla 15**). A nivel genotípico las diferencias observadas si se mantuvieron significativas tras aplicar el test de Bonferroni.

En el resto de SNVs analizadas no se observó asociación significativa después de la corrección de Bonferroni.

La deficiencia tipo I del gen *C2* en homocigosis causada por la delección de 28pb en el exón 6 (*C2* 28-bp DEL) no se encontró en pacientes ni en controles. Sin embargo, se observó la deficiencia en heterocigosis en cuatro pacientes con NNAC (1,4%) y en cinco controles (0,5%) aunque esta diferencia no fue significativa ( $p=0,259$ ) (**tabla 15**).

Para establecer qué modelo de herencia se ajusta más a lo que se observa en cada una de las SNVs asociadas con la enfermedad se procedió a realizar el análisis mediante regresión logística con la herramienta online SNPStats (<https://www.snpstats.net/start.htm>). El análisis para la SNV rs547154 del gen *C2* sugiere un modelo de herencia para susceptibilidad a NNAC dominante: aumenta el riesgo de susceptibilidad a NNAC al presentar el genotipo heterocigótico (GT) o el homocigótico de menor frecuencia (TT), esto es, la presencia del alelo T es suficiente para modificar el riesgo de la enfermedad ( $p=0,0007$ ; OR 1,62 IC 95% 1,22-2,13). El análisis mostró que la SNV rs2230199 del gen *C3* presentó un modelo de herencia recesivo: la presencia del genotipo homocigoto CC predispone a NNAC ( $p=0,0001$ ; OR 1,72 IC 95% 1,30-2,27) (**tabla 17**).



## V. Resultados

**Tabla 15. Frecuencia genotípica y asociaciones alélicas y genotípicas de SNVs de genes del complemento en pacientes con NNAC y en controles**

Gen	SNV	NNAC N (%)	Controles N (%)	Asociación Alélica		Asociación Genotípica
				<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>
C2	rs547154					
	TT	14 (3,9)	19 (2,2)	<b>0,0003</b>	<b>1,55 (1,22-1,98)</b>	<b>0,003</b>
	GT	96 (27,0)	166 (19,5)			
GG	245 (69,0)	666 (78,3)				
C2	rs9332739			0,959	0,99 (0,59-1,65)	0,637 <sup>#</sup>
	CC	0 (0,0)	2 (0,2)			
	GC	21 (5,9)	47 (5,5)			
C2	28-bp DEL			0,259*	2,70 (0,72-10,1)	-
	--	0 (0,0)	0 (0,0)			
	+-	4 (1,4)	5 (0,5)			
C3	rs2230199			<b>0,0003</b>	<b>0,65 (0,51-0,82)</b>	<b>0,0005</b>
	GG	12 (3,4)	37 (4,3)			
	CG	78 (21,9)	276 (32,4)			
C3	rs1047286			<b>0,004</b>	<b>0,69 (0,53-0,89)</b>	<b>0,002</b>
	AA	11 (3,1)	24 (2,8)			
	GA	65 (18,3)	239 (28,1)			
CFH	rs16840639			0,112	0,83 (0,70-1,0)	0,036
	CC	19 (5,9)	43 (5,1)			
	TC	83 (25,7)	285 (33,5)			
CFH	rs6677604			0,012	0,75 (0,60-0,95)	0,018
	AA	17 (5,3)	51 (6,0)			
	GA	86 (26,6)	292 (34,8)			
CFH	rs800292			0,594	1,05 (0,86-1,30)	0,796
	AA	26 (8,0)	68 (8,0)			
	GA	117 (36,2)	291 (34,2)			
CFH	rs1061170			0,845	1,02 (0,84-1,23)	0,570
	AA	45 (13,9)	103 (12,1)			
	GA	126 (39,0)	356 (41,8)			
CFH	rs1065489			0,535	0,93 (0,75-1,16)	0,237
	TT	14 (4,3)	47 (5,5)			
	GT	116 (35,9)	264 (31,0)			
CFB	rs4151667			0,044	1,58 (1,01-2,47)	0,069*
	AA	0 (0,0)	1 (0,1)			
	GA	33 (9,3)	49 (5,8)			
CFB	rs2072633			0,038	1,21 (1,01-1,45)	0,017
	AA	71 (20,0)	115 (13,5)			
	GA	149 (42,0)	391 (45,9)			
C5	rs17611			0,508	0,94 (0,79-1,13)	0,638
	TT	59 (16,6)	159 (18,7)			
	CT	167 (46,9)	398 (46,8)			
	CC	130 (36,5)	294 (34,5)			

Los valores de las frecuencias genotípicas se representan como el número de individuos (N) y porcentaje (%) sobre el total. \*Valor de *p* analizado mediante test exacto de Fisher. *p*<0,0029 (Bonferroni). NNAC: NAC neumocócica

**Tabla 16. Frecuencia genotípica y asociaciones alélicas y genotípicas de SNVs de genes del complemento en pacientes con NAC y en controles**

Gen	SNV	NAC	Controles	Asociación Alélica		Asociación Genotípica
		N (%)	N (%)	p	OR (IC 95%)	p
C2	rs547154					
	TT	28 (3,1)	19 (2,2)			
	GT	223 (24,8)	166 (19,5)	<b>0,002</b>	<b>1,35 (1,11-1,64)</b>	0,011
	GG	648 (72,1)	666 (78,3)			
C2	rs9332739					
	CC	0 (0,0)	2 (0,2)			
	GC	53 (5,9)	47 (5,5)	0,935	0,98 (0,66-1,45)	0,330*
	GG	508 (65,6)	504 (59,2)			
C2	28-bp DEL					
	--	0 (0,0)	0 (0,0)			
	+-	15 (1,4)	5 (0,5)	0,042	3,00 (1,09-8,28)	-
	++	1071 (98,6)	1076 (95,5)			
C3	rs2230199					
	GG	31 (3,3)	37 (4,3)			
	CG	218 (23,4)	276 (32,4)	<b>0,000015</b>	<b>0,68 (0,57-0,81)</b>	<b>0,00003</b>
	CC	683 (73,3)	538 (63,2)			
C3	rs1047286					
	AA	30 (3,2)	24 (2,8)			
	GA	203 (21,8)	239 (28,1)	0,023	0,81 (0,68-0,97)	0,009
	GG	699 (75,0)	588 (69,1)			
CFH	rs16840639					
	CC	39 (5,0)	43 (5,1)			
	TC	222 (28,7)	285 (33,5)	0,089	0,86 (0,73-1,02)	0,106
	TT	513 (66,3)	523 (61,5)			
CFH	rs6677604					
	AA	34 (4,4)	51 (6,0)			
	GA	232 (30,0)	292 (34,8)	0,005	0,79 (0,67-0,93)	0,023
	GG	508 (65,6)	504 (59,2)			
CFH	rs800292					
	AA	68 (8,8)	68 (8,0)			
	GA	266 (34,4)	291 (34,2)	0,565	1,05 (0,89-1,23)	0,829
	GG	440 (56,8)	492 (57,9)			
CFH	rs1061170					
	GG	113 (14,6)	103 (12,1)			
	AG	323 (41,7)	356 (41,8)	0,142	1,11 (0,96-1,29)	0,299
	AA	338 (43,7)	392 (46,1)			
CFH	rs1065489					
	TT	36 (4,7)	47 (5,5)			
	GT	268 (34,6)	264 (31,0)	0,519	0,95- 0,80-1,12)	0,260
	GG	470 (60,7)	540 (63,5)			
CFB	rs4151667					
	AA	2 (0,2)	1 (0,1)			
	GA	60 (6,7)	49 (5,8)	0,350	1,20 (0,82-1,74)	0,632*
	GG	837 (93,1)	801 (94,1)			
CFB	rs2072633					
	AA	139 (15,5)	115 (13,5)			
	GA	433 (48,2)	391 (45,9)	0,063	1,14 (0,99-1,31)	0,167
	GG	327 (36,4)	345 (40,5)			
C5	rs17611					
	TT	172(19,0)	159 (18,7)			
	CT	430 (47,5)	398 (46,8)	0,440	1,05 (0,92-1,21)	0, 895
	CC	303 (34,5)	294 (34,5)			

Los valores de las frecuencias genotípicas se representan como el número de individuos (N) y porcentaje (%) sobre el total. \*Valor de p analizado mediante test exacto de Fisher.  $p < 0,0029$  (Bonferroni). NAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad

## V. Resultados

A pesar que en el análisis de asociación a nivel alélico del rs1047286 no superó el test de Bonferroni determinamos el modelo de herencia. Observamos un modelo de herencia recesivo: la presencia del genotipo GG aumenta la susceptibilidad a NNAC ( $p=0,0008$ ; OR 1,65 IC 95% 1,23-2,21). El resto de SNVs analizados no mostraron asociación en el modelo de herencia tras aplicar el test de Bonferroni de comparaciones múltiples (**tabla 17**).

**Tabla 17. Distribución de la frecuencia genotípica en función del modelo de herencia de las SNVs de genes de complemento en NNAC y en controles**

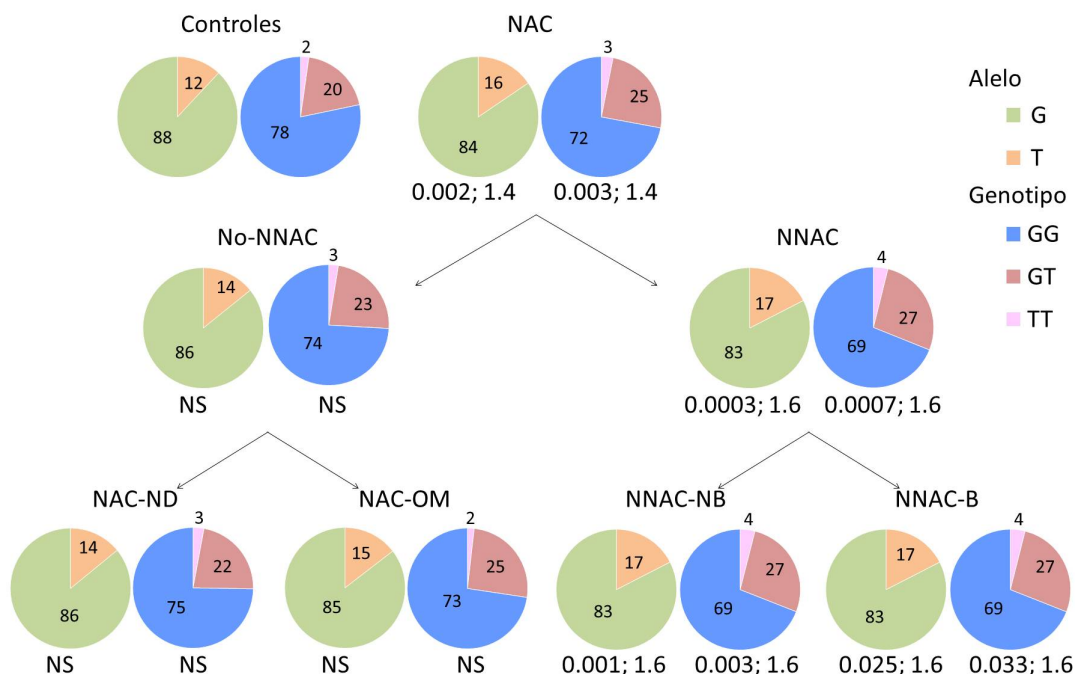
Modelo genético	Genotipo	Frec. Controles N (%)	Frec. NNAC N (%)	OR	IC 95%	$p$
rs547154						
Recesivo	G/T - G/G	832 (97,8)	341 (96,1)	1,00		
	T/T	19 (2,2)	14 (3,9)	1,80	0,89-3,63	0,11
Dominante	G/G	<b>666 (78,3)</b>	<b>245 (69)</b>	1,00		
	G/T - T/T	<b>185 (21,7)</b>	<b>110 (31)</b>	<b>1,62</b>	<b>1,22-2,13</b>	<b>0,0007</b>
-----						
rs2230199						
Recesivo	C/G - G/G	<b>313 (36,8)</b>	<b>90 (25,3)</b>	1,00		
	C/C	<b>538 (63,2)</b>	<b>266 (74,7)</b>	<b>1,72</b>	<b>1,30-2,27</b>	<b>0,0001</b>
Dominante	G/G	37 (4,3)	12 (3,4)	1,00		
	C/G - C/C	814 (95,7)	344 (96,6)	1,30	0,67,-2,53	0,433
-----						
rs1047286						
Recesivo	A/G - A/A	<b>263 (30,9)</b>	<b>76 (21,4)</b>	1,00		
	G/G	<b>588 (69,1)</b>	<b>280 (78,7)</b>	<b>1,65</b>	<b>1,23-2,21</b>	<b>0,0008</b>
Dominante	A/A	24 (2,8)	11 (3,1)	1,00		
	A/G - G/G	827 (97,2)	345 (96,9)	0,91	0,44-1,88	0,799
-----						
rs2072633						
Recesivo	A/G - G/G	736 (86,5)	284 (80)	1,00		
	A/A	115 (13,5)	71 (20)	1,60	0,15-2,22	0,005
Dominante	G/G	345 (40,5)	135 (38)	1,00		
	A/A - A/G	506 (59,5)	220 (62)	1,11	0,86-1,43	0,417
-----						
rs6677604						
Recesivo	G/A - G/G	800 (94,0)	306 (94,7)			
	A/A	51 (6,0)	17 (5,3)	0,87	0,50-1,53	0,630
Dominante	G/G	504 (59,2)	220 (68,1)	1,00		
	G/A - A/A	347 (40,8)	103 (31,9)	0,68	0,52-0,89	0,005
-----						
rs16840639						
Recesivo	T/T - C/T	808 (95,0)	304 (94,1)	1,00		
	C/C	43 (5,0)	19 (5,9)	1,17	0,67-2,05	0,57
Dominante	T/T	523 (61,5)	221 (68,4)	1,00		
	C/T - C/C	328 (38,5)	102 (31,6)	0,74	0,56-0,97	0,026

Comparación de las frecuencias genotípicas en función del modelo de herencia, los valores representan número de individuos (N) y porcentaje (%) sobre el total de individuos de cada población. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad; Valor de significación  $p < 0,0029$  tras corrección de Bonferroni.

### 1.1.3 Análisis de las SNVs rs547154 del gen C2 y rs2230199 y rs1047286 del gen C3 en pacientes con NAC total y en subgrupos de NAC

Dado que las deficiencias del sistema del complemento también predisponen a otras infecciones bacterianas además de distintas a las causadas por el neumococo, analizamos las tres SNV asociadas a NNAC en un grupo más grande de pacientes con NAC, independientemente del microorganismo causante de la infección. Para ello comparamos las frecuencias alélicas y genotípicas de las SNV rs547154 del gen C2 y las SNV rs1047286 y rs2230199 del gen C3 entre controles y cada grupo de casos de NAC (NAC, NNAC, NNAC-NB, NNAC-B, No-NNAC, NAC-ND y NAC-OM). Para llevar a cabo estas comparaciones se ha considerado los alelos de predisposición a la enfermedad.

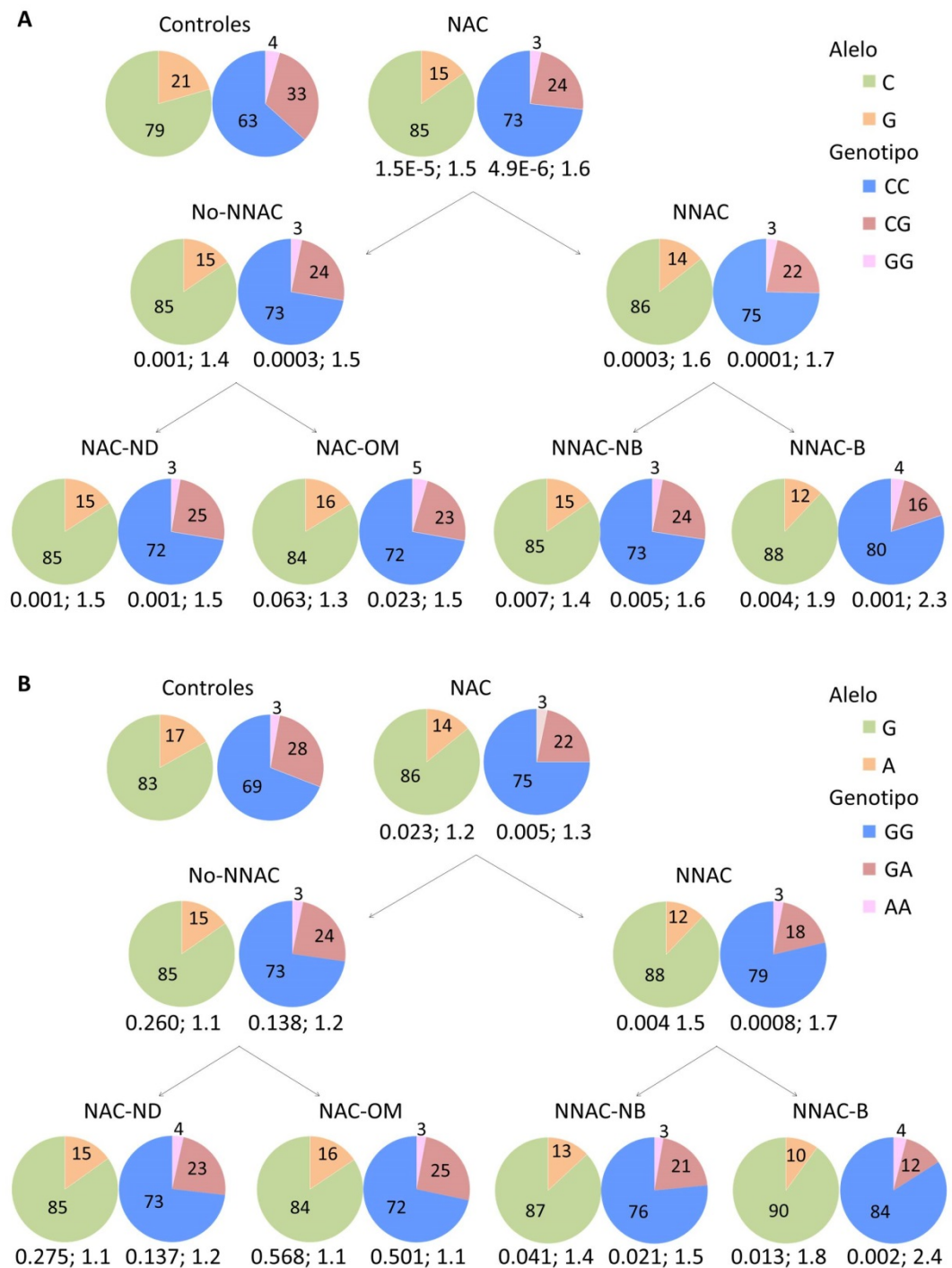
Los resultados muestran que la SNV rs547154 del gen C2 predispone a riesgo de infección sólo ante la presencia de *S. pneumoniae*, no observándose asociación frente a otros microorganismos (ver **tabla 12** para ver en detalle los microorganismos aislados). Tampoco se observó dicha asociación con NNAC-B (**figura 12**). Atendiendo al alelo de predisposición de la SNV rs2230199 a NAC y NNAC, en este caso el alelo de mayor frecuencia (alelo C), los resultados revelan que el alelo C y genotipo CC de la SNV rs2230199 del gen C3 predisponen a NAC ( $p=4,9 \times 10^{-6}$ ; OR 1,6) tanto no neumocócicas (No-NNAC:  $p=0,0003$ ; OR 1.5) como neumocócicas (NNAC:  $p=0,0001$ ; OR 1,7). Atendiendo al OR, esta asociación se vio incrementada en NNAC bacteriémicas (NNAC-B:  $p=0,001$ ; OR 2,3). Sin embargo, a pesar de la asociación de las deficiencias C3 con infecciones bacterianas no se observó predisposición de la SNV rs2230199 a NAC-OM (**figura 13.a**). En el estudio de asociación alélica y genotípica de la SNV rs1047286 del gen C3 entre cada subgrupo NAC y el grupo control, el genotipo de riesgo de predisposición genética a NNAC, el genotipo GG, se asoció a mayor riesgo de NNAC y NNAC-B (**figura 13.b**).



**Figura 12. Frecuencia alélica y genotípica del rs547154 del gen C2 en las distintas poblaciones estudiadas.**

En esta figura se representan las frecuencias alélicas y genotípicas de la SNV rs547154 del gen C2 en cada población y la asociación estadística al comparar entre controles y cada grupo de casos con el grupo control. Los números en cada gráfico representan el porcentaje de cada alelo/genotipo en la población. Debajo de cada gráfico se muestra el resultado de cada análisis de asociación indicando el valor de p; Odds ratio de cada población a nivel alélico o genotípico. El valor de significación tras corrección de Bonferroni se estableció en  $p < 0,0029$ . NS: no se observaron diferencias significativas. El modelo de herencia genotípico es dominante (GT y TT se asocian a mayor riesgo de la enfermedad). El alelo T es el alelo de predisposición a la enfermedad.

NAC: neumonía adquirida en la comunidad; No-NNAC: neumonía adquirida en la comunidad no neumocócica; NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad; NAC-ND: neumonía adquirida en la comunidad de etiología desconocida; NAC-OM: neumonía adquirida en la comunidad causado por otro microorganismo; NNAC-NB: neumonía neumocócica no bacteriémica adquirida en la comunidad; NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriémica adquirida en la comunidad.



**Figura 13. Frecuencias y asociación alélica y genotípica de las SNVs del gen C3 en las distintas poblaciones analizadas.**

**A. Frecuencia alélica y genotípica con modelo de herencia dominante de la SNV rs2230199 del gen C3.** Se representa el riesgo que representa el alelo C y el genotipo CC en las distintas poblaciones de NAC frente a los controles. **B. Frecuencia alélica y genotípica con modelo de herencia dominante de la SNV rs1047286 del gen C3.** Se muestra el riesgo asociado al alelo G y el genotipo GG en las distintas poblaciones de NAC, atendiendo a los datos microbiológicos, frente a los controles. Los números en cada gráfico representan el porcentaje de cada alelo/genotipo en la población. Debajo de cada gráfico se indica el valor de p; OR de cada población a nivel alélico o genotípico. El valor de significación tras corrección de Bonferroni se estableció en  $p < 0,0029$ . NAC: neumonía adquirida en la comunidad; No-NNAC: neumonía adquirida en la comunidad no neumocócica; NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad; NAC-ND: neumonía adquirida en la comunidad de etiología desconocida; NAC-OM: neumonía adquirida en la comunidad debido a otro germen; NNAC-NB: neumonía neumocócica no bacteriana adquirida en la comunidad; NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriana adquirida en la comunidad.

1.1.4 Análisis haplotípico y desequilibrio de ligamiento

Debido a la existencia de desequilibrio de ligamiento entre las SNVs de los genes C2 y CFB (205) y entre las SNVs rs1047286 y rs2230199 del gen C3 (206), realizamos un análisis haplotípico de asociación de esas variantes con susceptibilidad a NNAC y NAC.

Encontramos un fuerte desequilibrio de ligamiento entre las SNV rs9332739 del gen C2 (E314D) y rs4151667 del gen CFB (H9L):  $D'=0,939$ ;  $r^2=0,882$  en controles. Un desequilibrio de ligamiento moderado fue observado entre las variantes intrónicas rs547154 del gen C2 (IVS10) y rs2072633 del gen CFB (IVS17):  $D'=0,959$ ;  $r^2=0,218$  en controles y  $D'=0,814$ ;  $r^2=0,202$  en pacientes con NNAC (**tabla 18**).

**Tabla 18. Desequilibrio de ligamiento entre las SNVs de los genes de complemento de C2 y CFB**

SNV	SNV	CONTROL		NNAC		NAC	
		D'	r <sup>2</sup>	D'	r <sup>2</sup>	D'	r <sup>2</sup>
rs9332739	rs547154	1,0	0,004	1,0	0,006	1,0	0,006
<b>rs9332739</b>	<b>rs4151667</b>	<b>0,939</b>	<b>0,882</b>	<b>0,847</b>	<b>0,448</b>	<b>0,782</b>	<b>0,503</b>
rs9332739	rs2072633	1,0	0,018	1,0	0,021	1,0	0,02
rs547154	rs4151667	1,0	0,004	1,0	0,01	1,0	0,007
<b>rs547154</b>	<b>rs2072633</b>	<b>0,959</b>	<b>0,218</b>	<b>0,814</b>	<b>0,202</b>	<b>0,769</b>	<b>0,166</b>
rs4151667	rs2072633	1,0	0,018	0,544	0,01	0,665	0,011

Se muestran los desequilibrios de ligamiento, DL, ( $D'$  y  $r^2$ ) entre variantes genéticas de los genes C2 y CFB de complemento en controles, en pacientes con neumonía neumocócica adquirida en la comunidad (NNAC) y pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Las gráficas indican el porcentaje de DL en los recuadros a partir de  $D'$ . DL fuerte se indica en rojo oscuro mientras que el rosa, gris claro y el blanco indican débil o nulo DL. El bloque haplotípico establecido se muestra en negrita (Block 1)

Las SNVs rs1047286 y rs2230199 del gen C3 están en desequilibrio de ligamiento ( $D'=0,921$ ;  $r^2=0,665$  en controles y  $D'=0,931$ ;  $r^2=0,722$  pacientes con NNAC) (**tabla 19**).

No se observó asociación haplotípica entre las SNVs analizadas de los genes del complemento C2 y CFB (**tabla 20**). En cambio, el haplotipo que contiene los alelos de mayor

frecuencia de las SNV rs1047286 y rs2230199 de *C3* se asoció con predisposición a NNAC ( $p=0,0003$ ; OR 1,56 IC 95% 1,22-1,98) y NAC ( $p=0,00002$ ; OR 1,45 IC 95% 1,22-1,73) (haplotipo 1, **tabla 21**). Los haplotipos que contienen los alelos de menor frecuencia de la SNV rs2230199-G ( $C3_{102G}$ ) protegen de NNAC y NAC independientemente del alelo de la SNV rs1047286 presente en el haplotipo (haplotipo 2 y 3, **tabla 21**). Debido a la baja frecuencia del haplotipo que contiene el  $C3_{102G}$  y  $C3_{314L}$  (haplotipo 4) no fue posible determinar el papel de éste.

**Tabla 19. Desequilibrio de ligamiento entre las SNVs rs1047286 y rs2230199 del gen *C3***

	DL		Frecuencia alélica (%)			
	D'	r <sup>2</sup>	GC	GG	AG	AC
Control	<b>0,921</b>	0,665	78,4	4,81	5,8	1,1
NNAC	<b>0,931</b>	0,722	85,0	2,8	11,5	0,7
NAC	<b>0,844</b>	0,662	83,1	2,8	12,2	1,9

Se muestran el desequilibrio de ligamiento, DL, (D' y r<sup>2</sup>) entre variantes genéticas del gen *C3* de complemento en controles, pacientes con neumonía neumocócica adquirida en la comunidad (NNAC), pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC).

**Tabla 20. Asociación haplotípica de las SNVs de los genes *C2* y *CFB* con NNAC y NAC**

Haplotipo	L9H	IVS17	IVS10	E318D	Frecuencia (%)			Asociación haplotípica NNAC		Asociación haplotípica NAC	
					Control	NNAC	NAC	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
1	T	A	G	G	24,6	24,6	25,6	1,05 (0,85-1,28)	0,661	1,10 (0,94-1,28)	0,250
2	T	A	T	G	11,8	15,3	13,2	1,41 (1,10-1,82)	0,007	1,18 (0,96-1,44)	0,110
3	T	G	G	G	60,2	53,4	55,0	0,81 (0,67-0,97)	0,024	0,86 (0,75-0,99)	0,32

Se muestra la frecuencia estimada de cada haplotipo (%) y su asociación con susceptibilidad a neumonía neumocócica adquirida en la comunidad (NNAC) o con neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Se indica el valor de p, odds ratio (OR) e intervalo de confianza al 95% (IC 95%)



**Tabla 21. Asociación haplotípica de las SNVs del gen C3 con NNAC y NAC**

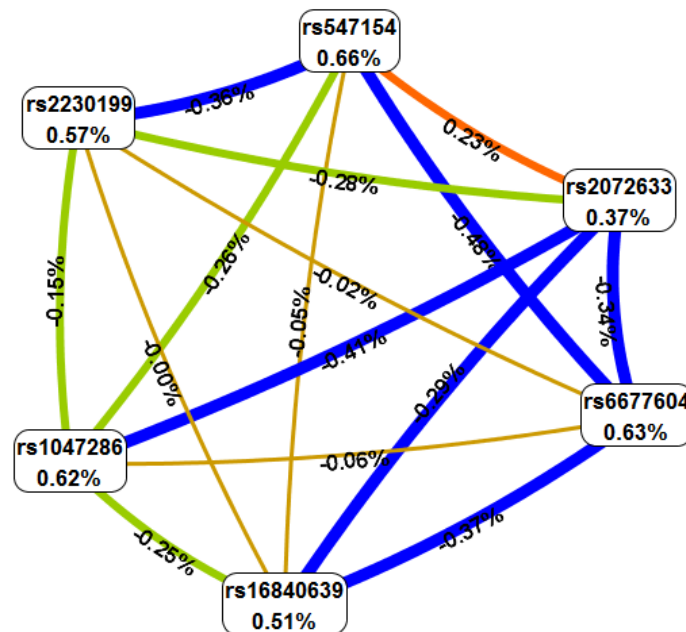
Haplotipo	P314L	R102G	Frecuencia (%)			Asociación haplotípica NNAC		Asociación haplotípica NAC	
			Control	NNAC	NAC	OR (IC 95%)	p-valor	OR (IC 95%)	p
1	G	C	78,4	85,0	83,1	1,56 (1,22-1,98)	0,0003	1,45 (1,22-1,73)	0,00002
2	A	G	15,8	11,5	12,2	0,69 (0,53 - 0,90)	0,006	0,75 (0,62-0,91)	0,003
3	G	G	4,8	2,8	2,8	0,58 (0,35 - 0,95)	0,03	0,58 (0,41-0,83)	0,002
4	A	C	1,1	0,7	1,9	-	-	-	-

Se muestra a frecuencia estimada de cada haplotipo (%) y su asociación con con susceptibilidad neumonía neumocócica adquirida en la comunidad (NNAC) o con neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Se indica el valor de p, odds ratio (OR) e intervalo de confianza al 95% (IC 95%). La asociación con la combinación AC no se pudo determinar debido a su baja frecuencia haplotípica.

### 1.1.5 Análisis de complotipos

Para evaluar si combinaciones de las SNV de los genes *C2*, *C3*, *CFB* o *CFH* interactúan entre si para favorecer un incremento del riesgo a NNAC se aplicó el método de dimensionalidad multifactorial (MDR). Las SNV seleccionadas fueron: la SNV rs547154 del gen *C2*, las SNV rs2230199 y rs1047286 del gen *C3*, la SNV rs2072633 de gen *CFB* y las SNV rs16840639 y rs6677604 del gen *CFH*. La selección se realizó a partir de los resultados obtenidos en el análisis de asociación alélica y genotípica para evaluar la susceptibilidad a NNAC (**tabla 15**). Se incluyeron todas las SNV con un valor de significación  $p < 0,05$ . El modelo predice una interacción redundante entre las SNV rs547154 y rs2230199 y entre la SNV rs1047286 del gen *C3* en relación al riesgo de desarrollar NNAC (**figura 14**). Se observa un efecto sinérgico entre las variantes rs547154 del gen *C2* y la SNV rs2072633 de gen *CFB*.

Con el fin de evaluar el efecto de la interacción gen-gen basada en función de las distintas combinaciones establecidas por las SNV, analizamos las SNV que mostraron mayor asociación a NNAC en el estudio de asociación. Por lo que analizamos la interacción entre las variantes rs547154 del gen *C2* y rs2230199 ( $C3_{R102G}$ ) en pacientes con NNAC y controles mediante regresión logística.



**Figura 14.** Gráfico de interacción que muestra la interacción entre los genes *C2*, *C3*, *CFH* Y *CFB* de complemento relacionados con susceptibilidad a NNAC

El análisis de reducción de dimensionalidad multifactorial (MDR) muestra en cada recuadro el porcentaje de entropía da cada SNV, es decir, el efecto principal de cada SNV a nivel individual. Los valores mostrados en las líneas que conectan las distintas SNV indican el porcentaje de entropía obtenida a partir de la interacción por pares. El color de las líneas indica el tipo de interacción: naranja sugiere una relación sinérgica; amarillo no interacción (las SNV tienen efectos independientes); verde y azul sugieren redundancia.

La combinación de los genotipos más frecuentes fue rs547154-GG con rs2230199-CC con una frecuencia del 50% tanto en los controles como en los casos. Para realizar el análisis, excluimos las combinaciones de genotipos con menos de diez individuos en el grupo de pacientes y controles y se tomó como referencia la combinación del genotipo más frecuente (207). Obtuvimos cinco combinaciones de genotipos que cumplían con estos criterios. La distribución de la combinación del genotipo GT-CC y TT-CC aumentó en pacientes con NNAC y NAC (**tabla 22**), sin embargo, estas asociaciones no superaron el test de Bonferroni ni se vio afectado el OR con respecto al efecto principal de cada SNVs mostrado en las **tablas 15, 16**.

**Tabla 22. Asociación entre las variantes genéticas combinadas de los genes C2 y C3 de complemento**

Combinación genotípica	Frecuencia (%)			Asociación complotípica con NNAC		Asociación complotípica con NAC	
	Control	NNAC	NAC	p	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)
rs547154 - rs2230199							
GG-CC	50,3	50,6	52,3	0,943		0,41	
GG-CG	24,2	15,7	17,4	0,013	0,65 (0,46-0,91)	0,003	0,69 (0,54-0,89)
GG-GG	3,4	3,5	3,0	0,971	0,99 (0,45-1,97)	0,494	0,83 (0,49-1,42)
GT-CC	12,7	20,0	18,2	0,01	1,57 (1,11-2,22)	0,020	1,38 (1,05-1,82)
GT-CG	6,0	6,6	5,7	0,704	1,09 (0,65-1,84)	0,695	0,92 (0,61-1,38)
GT-GG	1,0	0,0	0,3	-	-	-	-
TT-CC	2,0	3,7	2,4	0,09	1,89 (0,90-3,97)	0,592	1,19 (0,63-2,28)
TT-CG	0,3	0,0	0,6	-	-	-	-

Se muestra la frecuencia estimada de cada complotipo (%) y su asociación con neumonía neumocócica adquirida en la comunidad (NNAC) y con neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Se indica el valor de p, odds ratio (OR) e intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Las asociaciones con las combinaciones GT-GG y TT-CC no se pudieron determinar debido a su baja frecuencia. El modelo se realizó mediante regresión logística tomando como referencia la combinación del genotipo más frecuente.

#### 1.1.6 Análisis de la variación del número de copias del gen C4

Las CNV del gen C4A se han asociado previamente a diversas enfermedades autoinmunes como LES y a DMAE (139). Sin embargo, no está claro si las CNV de C4B predisponen a la infección por bacterias encapsuladas (112,150). En el presente estudio se ha analizado la CNV de C4A, C4B, C4S y C4L en 207 pacientes con NNAC y 236 controles adultos.

**CNV del total de C4.** El número de copias totales de C4 varió entre 2 a 8 copias. La media del GCN fue de  $3,92 \pm 0,8$  en NNAC y  $4,03 \pm 0,82$  en controles. No hubo diferencias en la distribución del GCN del total de C4 entre NNAC y controles ( $p=0,188$ ) (figura 15.a). El 12,1% de los pacientes con NNAC y el 19,5% de los controles presentaron 5 copias (GCN=5) de C4 total, mostrando así una tendencia protectora en la población control ( $p=0,034$ ; OR 0,57 IC 95% 0,33-0,96) (tabla 23).

**CNV de los genes C4A y C4B.** El número de copias C4A varió de 0 a 5 copias entre los diferentes individuos. No hubo ninguna diferencia en la distribución del GCN de C4A entre NNAC y los controles ( $p=0,078$ ). Solo se encontró deficiencia de C4A (GCN = 0) en un paciente y en 0 controles ( $p=0,467$ , OR 2,1 IC 95% 1,94-2,37). La frecuencia de individuos con una copia del gen para C4A (GCN=1) fue de 15,0% en NNAC y 9,7% en controles. El grupo de GCN con mayor prevalencia en C4A (GCN=2) tuvo una frecuencia de 64,7% en NNAC y 66,9% en

controles. La media del GCN de *C4A* fue  $2,08 \pm 0,7$  NNAC y  $2,19 \pm 0,7$  en los controles ( $p=0,078$ ) **(figura 15.b y tabla 23)**.

El GCN de *C4B* varió de 0 a 4 copias entre los diferentes individuos. La frecuencia del GCN de *C4B* fue similar en NNAC y controles. El GCN promedio de *C4B* fue  $1,85 \pm 0,73$  y  $1,84 \pm 0,73$  respectivamente ( $p=0,927$ ) **(figura 15.c y tabla 23)**.

**CNV de los genes *C4S* (short-C4) y *C4L* (long-C4).** La distribución del GCN de *C4S* fue similar en los pacientes con NNAC y en los controles ( $p=0,565$ ). La ausencia del gen corto (*C4S*, GCN=0) fue mayor en los controles (28,8%) que en NNAC (24,2%), aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística. El GCN promedio de *C4S* fue  $1,17 \pm 0,92$  en NNAC y  $1,07 \pm 0,90$  en controles ( $p=0,241$ ) **(figura 15.d y tabla 23)**.

El GCN promedio de *C4L* fue  $2,75 \pm 0,88$  en NNAC y  $2,96 \pm 0,97$  en los controles, sin diferencias significativas tras la corrección de Bonferroni ( $p=0,016$ ). La frecuencia de una copia del gen *C4L* (GCN=1) en NNAC y controles fue similar, 6,8% y 6,4% respectivamente. Sin embargo, si se observaron diferencias, aunque no significativas tras corrección de Bonferroni, en la frecuencia de pacientes (32,4%) y controles (22,0%) con dos copias de *C4L* (GCN=2) ( $p=0,014$ ; OR 1,69 IC 95% 1,11-2,59) **(figura 15.e y tabla 23)**. Al comparar los subgrupos de individuos portadores con bajos números de copias (GCN=1 o 2) de *C4L* con los subgrupos de medios y altos números de copias (GCN= 3, 4, 5 y 6) en NNAC y controles, se observó que en los pacientes la presencia de bajo número de copias es más frecuente que en controles ( $p=0,017$ ; OR 1,62 IC 95% 1,01-2,41), aunque esta diferencia no alcanza significación estadística tras corrección de Bonferroni.

El ajuste de Bonferroni sugiere que no existen diferencias significativas entre el número de copias de los genes *C4* total, *C4A*, *C4B*, *C4S* y *C4L* entre pacientes con NNAC y controles.

V. Resultados

Tabla 23. Frecuencias del GCN de C4 total, C4A, C4B, C4S y C4L en pacientes con NNAC y controles

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	Media (SD)	p #
<b>GCN C4</b>											
NNAC	-	-	5 (2,4)	49 (23,7)	120 (58,0)	25 (12,1)	7 (3,4)	0 (0,0)	1 (0,5)	3,92 (0,8)	0,188
Control	-	-	6 (2,5)	47 (19,9)	128 (54,2)	46 (19,5)	8 (3,4)	1 (0,4)	0 (0,0)	4,03 (0,82)	
*p			1,0	0,338	0,43	<b>0,034</b>	0,996	1,00 <sup>‡</sup>	0,467 <sup>‡</sup>		
OR (IC 95%)			0,95 (0,29-3,16)	1,25 (0,79-1,96)	1,16 (0,80-1,70)	0,57 (0,33-0,96)	1,00 (0,36-2,80)	-	2,1 (1,94-2,37)		
<b>GCN C4A</b>											
NNAC	1(0,5)	31 (15,0)	134 (64,7)	34 (16,4)	6 (2,9)	1 (0,5)	-	-	-	2,08 (0,7)	0,078
Control	0 (0,0)	23 (9,7)	158 (66,9)	43 (18,2)	10 (4,2)	2 (0,8)	-	-	-	2,19 (0,7)	
*p	0,467 <sup>‡</sup>	0,093	0,624	0,619	0,451	1,00 <sup>‡</sup>					
OR (IC 95%)	2,1 (1,94-2,37)	1,63 (0,92-2,90)	0,91 (0,61-1,34)	0,88 (0,54-1,45)	0,67 (0,24-1,89)	0,57 (0,05-6,31)					
<b>GCN C4B</b>											
NNAC	6 (2,9)	53 (25,6)	118 (57,0)	27 (13,0)	3 (1,4)	-	-	-	-	1,85 (0,73)	0,927
Control	9 (3,8)	56 (23,7)	137 (58,1)	32 (13,6)	2 (0,8)	-	-	-	-	1,84 (0,73)	
*p	0,793 <sup>‡</sup>	0,648	0,824	0,873	0,877 <sup>‡</sup>						
OR (IC 95%)	0,75 (0,26-2,15)	1,11 (0,72-1,71)	0,96 (0,66-1,40)	0,96 (0,55-1,66)	1,72 (0,28-10,4)						
<b>GCN C4S</b>											
NNAC	50 (24,2)	90 (43,5)	51 (24,6)	13 (6,3)	3 (1,4)	-	-	-	-	1,17 (0,92)	0,241
Control	68 (28,8)	99 (41,9)	57 (24,2)	8 (3,4)	4 (1,7)	-	-	-	-	1,07 (0,90)	
*p	0,268	0,745	0,906	0,182	1,00 <sup>‡</sup>						
OR (IC 95%)	0,79 (0,51-1,20)	0,11 (0,73-1,55)	1,03 (0,67-1,59)	1,91 (0,78-4,70)	0,85 (0,19-3,86)						
<b>GCN C4L</b>											
NNAC	-	14 (6,8)	67 (32,4)	86 (41,5)	37 (17,9)	3 (1,4)	0 (0,0)	-	-	2,75 (0,88)	<b>0,016</b>
Control	-	15 (6,4)	52 (22,0)	110 (46,6)	48 (20,3)	8 (3,4)	3 (1,3)	-	-	2,96 (0,97)	
*p		0,853	<b>0,014</b>	0,284	0,511	0,316 <sup>‡</sup>	0,301 <sup>‡</sup>				
OR (IC 95%)		1,07 (0,50-2,27)	1,69 (1,11-2,59)	0,81 (0,56-1,19)	0,85 (0,53-1,37)	0,42 (0,11-1,60)	0,0 (0,0-2,75)				

Se muestra la frecuencia del número de copias del gen (GCN) del total de C4, C4A, C4B, C4S y C4L en pacientes con neumonía neumocócica adquirida en la comunidad (NNAC) y controles. En cada caso se indica el tamaño muestral y la frecuencia (%).

# Valor de p calculado mediante t-test, representa la significación estadística entre las medias de pacientes con NNAC y controles.

\*Valor de p calculado mediante test de  $\chi^2$  o exacto de Fisher (‡). Representa la significación estadística en cada número de copias entre casos y controles.

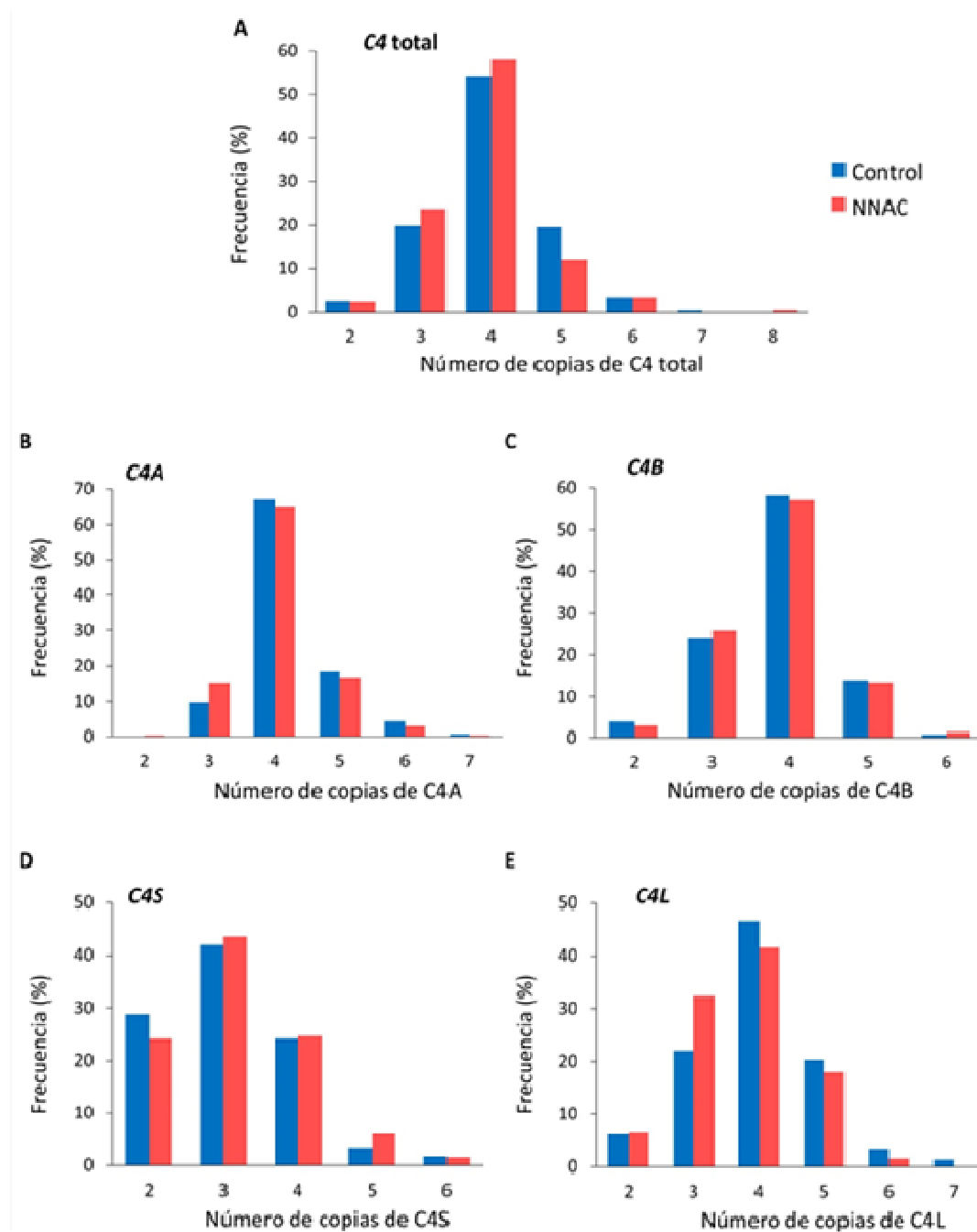


Figura 15. Distribución del número de copias del gen (GCN) *C4* total, *C4A*, *C4B*, *C4S* y *C4L* en controles sanos y pacientes con neumonía neumocócica adquirida en la comunidad (NNAC).

El GCN para el total de *C4* (A), *C4A* (B), *C4B* (C), *C4S* (D) y *C4L* (E) fue determinado en 236 controles sanos (azul) y 207 pacientes con NNAC (rojo).

## **2. Realización de estudios inmunológicos en pacientes pediátricos con enfermedad neumocócica invasiva en la isla de Gran Canaria dirigidos al diagnóstico de inmunodeficiencias.**

Es sabido que diversas IDP predisponen particularmente a infecciones neumocócicas, especialmente las deficiencias de anticuerpos, las deficiencias de complemento, las deficiencias de activación de TLR dependiente de MyD88 y la asplenia congénita (208–210). Sin embargo, estas IDP son consideradas raras. En los últimos años se ha demostrado que la incidencia de las IDP es sensiblemente mayor de lo que se sospechaba, y se ha visto que algunas IDP pueden predisponer especialmente a neumococo. Además, algunos pacientes con determinadas IDP en ocasiones sufren un único episodio grave, o en ocasiones, el episodio de ENI pudiera ser la primera manifestación de su IDP. Dada la morbilidad y mortalidad asociada a las IDP, su diagnóstico temprano es crucial. El segundo objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en la recogida de datos clínicos y epidemiológicos, así como en la realización de estudios inmunológicos, a pacientes pediátricos con ENI grave, incluso con un solo episodio, con la finalidad de analizar la incidencia de factores de riesgo clásicos e IDPs en esta población.

### **2.1. Características de los pacientes hospitalizados por ENI**

#### **2.1.1 Características clínicas y demográficas**

Entre enero del año 2000 y febrero del año 2017 se diagnosticaron 209 pacientes menores de 14 años con ENI en Gran Canaria, de los cuales, 78 requirieron hospitalización. De esos 78 pacientes hospitalizados con ENI las infecciones más frecuentes fueron meningitis (n=28; 36%), seguido de neumonía complicada (n=17; 22%) y neumonía bacteriémica (n=15; 19%). Otras infecciones menos comunes fueron bacteriemia con sepsis (n=7; 9,0%), artritis (n=4; 5,1%) o infecciones en otras localizaciones como mastoiditis y periapendicitis, aunque algunos pacientes presentaron varias manifestaciones simultáneamente (**tabla 24**). La edad media de los niños fue de 34 meses (rango 0 días - 13 años), el 60% de ellos menores de 2 años. Atendiendo a la distribución de sexos, 47 (60,2%) eran hombres y 31 mujeres. El porcentaje de mortalidad fue de un 7,7% (n=6, 2 varones y 4 mujeres). Los meses de mayor incidencia fueron entre enero y marzo (48,7% de los episodios). Quince pacientes de los 78 (19,2%) tenían un factor de riesgo clásico: 2 pacientes con cardiopatía congénita, 2 con broncodisplasia pulmonar (BDP), 2 prematuros, 2 con BDP y prematuros, 1 con retraso ponderal, 1 paciente con trasplante de médula ósea, 1 fístula postquirúrgica, 1 LES, 1 con malformación de Mondini, 1 con aspiración de meconio, 1 con trisomía del cromosoma 21 (**tabla 25**).

**Tabla 24. Características clínico-demográficas de los pacientes con ENI grave**

	ENI (N=78)
	n (%)
<b>Media edad (años <math>\pm</math>SD)</b>	2,8 $\pm$ 3,0
<b>Sexo</b>	
Femenino (%)	31 (39,7)
Masculino (%)	47 (60,3)
<b>Vacunación previa a la infección</b>	
Si	29 (37,2)
No	49 (62,8)
<b>Tipo de vacunación*</b>	
PCV7	16 (53,3)
PCV10	2 (6,7)
PCV13	10 (33,3)
ND	2 (6,7)
<b>Serotipos neumocócicos<sup>#</sup></b>	
4,6B,9V,14,18C,19F y 23F (PCV7)	19 (33,9)
1,5,7F (PCV10)	2 (3,6)
3, 6A,19A (PCV13)	13 (23,2)
23B,24F	7 (12,5)
Otros	15 (26,8)
NA	22
<b>Tipos de infección</b>	
Meningitis	28 (35,9)
Empiema o neumonía necrotizante	17 (21,8)
Neumonía bacteriémica	15 (19,2)
Bacteriemia y sepsis	7 (9,0)
Artritis	4 (5,1)
Neumonía bacteriémica y artritis	2 (2,6)
Neumonía complicada y meningitis	1 (1,3)
Meningitis y mastoiditis	1 (1,3)
Mastoiditis	1 (1,3)
Artritis y mastoiditis	1 (1,3)
Periapendicitis	1 (1,3)
<b>Factores de riesgo clásico</b>	
Factores de riesgo clásico	15 (19,2)
Infecciones recurrentes	5 (6,4)
ENI recurrente	1 (1,3)
Exitus	6 (7,7)

Los valores son: número de individuos (n) y % sobre el total.

\* Pacientes vacunados con al menos una dosis de vacunación antineumocócica (PCV7, 10 o 13) previo al episodio de ENI. Un paciente puede haber tenido más de un tipo de vacuna.

# Los serotipos se indican en función de los serotipos incluidos en cada vacuna antineumocócica conjugada (PCV). PCV7 contiene los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F; PCV10: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F; PCV13: 4, 6B,



9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F, 3, 6A, 19A. Los serotipos incluidos en PCV10 indican los serotipos adicionales de PCV7 (1, 5, 7F); los serotipos incluidos en PCV13 indican los serotipos adicionales de PCV10 (3, 6A, 19A). Los serotipos 23B y 24F fueron los serotipos más frecuentes no incluidos en ninguna PCV.

ENI: enfermedad neumocócica invasiva; N: número total de individuos; SD: desviación estándar; ND: dato no disponible; NA: no analizado

### 2.1.1 Microbiología

En cuanto a la disponibilidad de los datos serotípicos, se dispuso de 56 aislados de *S.pneumoniae*, lo que supone un 71.8% del total de los pacientes con ENI hospitalizados (**tabla 24**). Los serotipos más frecuentes fueron 19A y 14 con un 12,3 y 10,5% respectivamente seguido de 3 y 23B con un 7,0% cada uno. Durante el periodo correspondiente a la instauración de la vacuna heptavalente (PCV7) en España (fechas comprendidas entre junio de 2001 y febrero de 2009) 38 de los 78 pacientes con ENI hospitalizados tuvieron el episodio de ENI en esa época y se les pudo analizar el serotipo. En ese periodo de tiempo los serotipos más frecuentes fueron los serotipos 14 (n=5/38, 13,2%) y 19A (n=4/38, 10,5%). Tras la instauración de la vacuna trecevalente (PCV13), a partir de junio de 2010, 18 pacientes con ENI hospitalizados tuvieron el episodio de ENI en esa época y se les pudo analizar el serotipo. Los serotipos dominantes fueron 24F, 3 y 19A con un 16,7% cada uno (n=3/18). Se registró fallo vacunal en cinco pacientes con vacunación completa, 3 de ellos vacunados con PCV7, 1 con PCV10 y 1 con PCV13. Los serotipos que tuvieron estos pacientes fueron 9V, 19F, 14 y 3 (**tabla 26**). Dos de ellos presentaron factores de riesgo clásico: broncodisplasia pulmonar (ID 5) y cardiopatía congénita (ID 12).

Tabla 25. Factores de riesgo de los pacientes con ENI grave

ID	Factor de riesgo (género)	ENI (edad)	Vacunación previa (nº)	Serotipo	ENI recurrente	Infecciones previas	Infecciones posteriores	Edad*
1	Trasplante de médula ósea (M)	Neumonía bacteriémica (12a)	No	ND	No	Neumonías recurrentes	-	Exitus (12 a)
2	Fístula postquirúrgica (M)	Meningitis (7a)	No	ND	No	No	No	Vivo (24 a)
3	LES (M)	Artritis (7a)	No	21	No	Gastroenteritis aguda (7m) e ITU (12m)	No	Vivo (20 a)
4	Malformación de Mondini (F)	Meningitis (9a)	No	7F	No	No	-	Exitus (9 a)
5	BDP (M)	Neumonía bacteriémica (9m)	PCV7(3)	9V	No	No	-	Exitus (11 m)
6	Cardiopatía congénita (H)	Bacteriemia y sepsis (4m)	PCV7(2)	10	No	No	No	Vivo (13 a)
7	BDP (M)	Neumonía bacteriémica (3m)	No	19F	No	Sepsis temprana ( <i>E.coli</i> )	No	Vivo (13 a)
8	BDP, prematuro (M)	Neumonía bacteriémica (4m)	PCV7(1)	23F	No	No	No	Vivo (12 a)
9	Retraso ponderal (p<3) (M)	Neumonía bacteriémica (6m)	No	23F	No	No	No	Vivo (11 a)
10	BDP, prematuro (25SEG) (M)	Neumonía bacteriémica (20m)	No	23B	No	Bacteriemia neonatal ( <i>E.coli</i> ) (10m)	Celulitis (6a)	Vivo (10 a)
11	Prematuro (M)	Neumonía bacteriémica (13m)	No	19A	No	Muguet (8m)	Neumonía (27m)	Vivo (10 a)
12	Cardiopatía congénita (M)	Neumonía bacteriémica (16m)	PCV7(3)	19F	No	Neumonías recurrentes	No	Vivo (10 a)
13	Trisomía del 21, cardiopatía congénita (M)	Neumonía bacteriémica (5m)	PCV7(1)	7	No	ITU y GEA (rotavirus) (53d), GEA (rotavirus) (3m)	-	Vivo (10 a)
14	Aspiración de meconio (M)	Bacteriemia y sepsis (0m)	No	19A	No	No	No	Vivo (5 a)
15	Prematuro (F)	Neumonía complicada (35m)	No	ND	No	No	No	Vivo (12 a)

En la tabla se muestran los pacientes con factores de riesgo clásico con sus características clínico-demográficas. Se muestra el diagnóstico, el tipo y número de vacunaciones de neumococo previas a la infección, serotipos e infecciones previas y posteriores al episodio de ENI. Se desconoce si es el paciente ID13 ha tenido infecciones posteriores ya que no pudo ser localizado por traslado de hogar a otra provincia. ID: número de identificación; M: masculino; F: femenino; LES: lupus eritematoso sistémico; BDP: broncodisplasia pulmonar; ENI: enfermedad neumocócica invasiva; a: años; m: meses; nº: número de vacunaciones antineumocócicas previas al episodio de ENI; ND: no determinado; ITU: infección del tracto urinario; GEA: gastroenteritis aguda. \*Edad de los pacientes en la fecha que se cierra el estudio (febrero de 2017).

Tabla 26. Fallos vacunales en pacientes con ENI grave

ID	Factor de riesgo (género)	ENI (meses)	IDP	Vacunación previa (nº)	Serotipo	Respuesta vacunal	Edad*
5	BDP (F)	Neumonía bacteriémica (9)	NR	PCV7(3)	9V	NR	Exitus (11 m)
12	Cardiopatía congénita (M)	Neumonía bacteriémica (16)	Di George	PCV7(3)	19F	Baja respuesta a toxoide tetánico	Vivo (10 a)
16	No (M)	Neumonía bacteriémica (47)	NE	PCV10 (4)	14	N	Vivo (8 a)
17	No (M)	Neumonía complicada (38)	NE	PCV13 (4)	3	N	Vivo (7 a)
18	No (M)	Bacteriemia y sepsis (21)	NE	PCV7 (3)	14	N	Vivo (11)

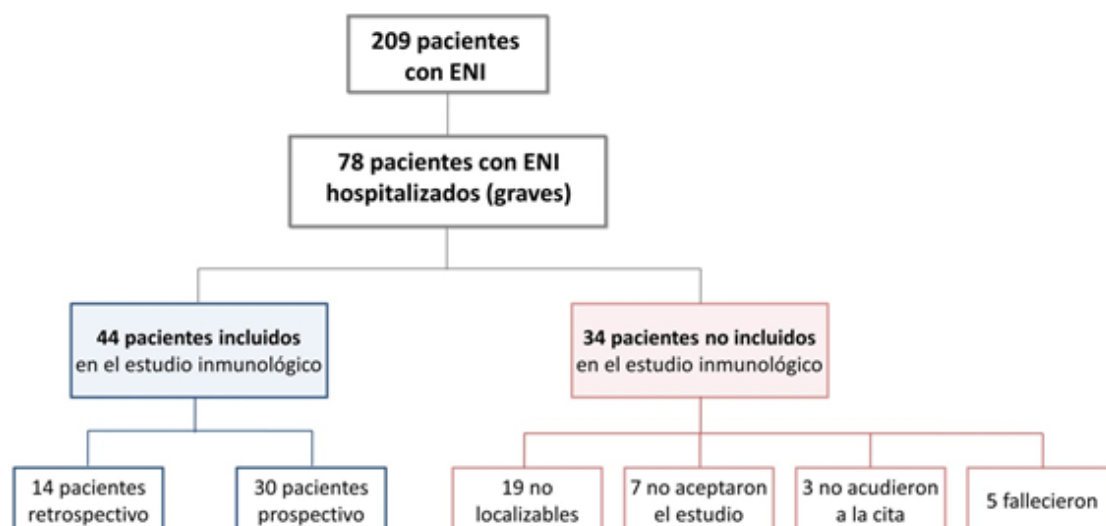
ID: número de identificación del paciente; F: femenino; M: masculino; ENI: enfermedad neumocócica invasiva; IDP: inmunodeficiencia primaria; NR: no realizado estudio; NE: no se detecta IDP tras realizar estudio inmunológico; N: normal, a: años; m: meses. \*Edad de los pacientes en la fecha que se cierra el estudio (febrero de 2017).

## 2.2. Características clínicas e inmunológicas de los pacientes con ENI grave analizados

### 2.2.1 Características clínicas

Se pudo realizar un estudio inmunológico a 44 de los 78 pacientes hospitalizados con ENI; a 34 pacientes no se les realizó el estudio inmunológico porque no fueron localizados, no aceptaron participar en el estudio, no acudieron a la cita o fallecieron (**figura 16**). De esos 44 pacientes, 30 fueron incluidos prospectivamente y 14 retrospectivamente; aunque a 5 de los 14 pacientes incluidos retrospectivamente se les citó para realizar estudios inmunológicos adicionales.

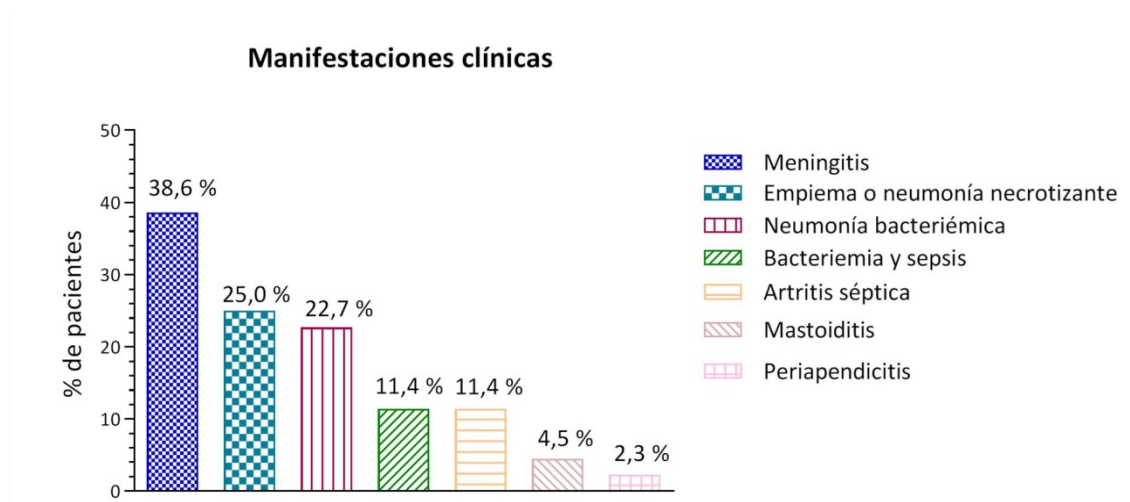
El estudio inmunológico realizado a los 44 pacientes con ENI grave se basó en detectar defectos o alteraciones en el sistema del complemento, la activación de TLRs dependiente de Myd88, subpoblaciones linfocitarias e inmunoglobulinas.



**Figura 16. Representación gráfica de la población sujeto de estudio**

5 de los 14 pacientes incluidos retrospectivamente se les citó para realizar estudios inmunológicos adicionales

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de los 44 pacientes estudiados fueron meningitis (n=17, 38,6%) seguido de empiema o neumonía necrotizante (n=11, 25,0%) (**figura 17**). Un mismo paciente pudo presentar más de una manifestación clínica.



**Figura 17. Manifestaciones clínicas de los pacientes con ENI grave estudiados**

Se muestra el porcentaje de pacientes que presentó cada manifestación clínica. Un mismo paciente pudo presentar más de una presentación clínica.

### 2.2.2 Características inmunológicas

Los estudios inmunológicos permitieron diagnosticar una inmunodeficiencia en ocho pacientes, un 18% de los 44 casos pediátricos hospitalizados por ENI.

Las IDPs que se diagnosticaron son las siguientes (**ver tabla 27**):

- **Ataxia telangiectasia.** Un bebé de 6 meses de edad con retraso ponderal, ingresado por presentar neumonía bacteriémica (ID 9). Presentó linfopenia de linfocitos T y B, déficit selectivo de IgA, una respuesta proliferativa a mitógenos disminuida y valores elevados de  $\alpha$ -fetoproteína. El estudio genético determinó una delección de 28pb en el exón 65 del gen *ATM*, c.9007\_9034del28, p.Asn3003fs\*5. Tras el diagnóstico, se instauró el tratamiento con gammaglobulina intravenosa. La madre del paciente interrumpió un embarazo posterior al demostrarse homocigidad para la mutación. Aunque el paciente no ha presentado infecciones graves posteriores, presenta una ataxia severa.
- **Síndrome de Di George.** Un paciente fue diagnosticado con el síndrome de Di George por presentar un cuadro clínico compatible con una delección 22q11, cardiopatía congénita y fenotipo característico (aplanamiento malar, hipertelorismo, raiz nasal prominente, hipoplasia mandibular y retrognatia y posición baja de las oreja). Posteriormente se confirmó mediante la delección 22q11 asociada al síndrome de Di George (Catch 22) en sangre por hibridación in situ (FISH). El paciente no precisa tratamiento sustitutivo con gammaglobulina intravenosa.
- Un paciente presentó una **trisomía parcial del cromosoma 16** (ID 19) con bajo número de células B con cambio de clase (*switched-memory B cells*) y alto número de células B CD21<sup>low</sup> y deficiencia de IgA e IgG2. Este paciente presentó varios ingresos por infecciones previas y neumonías recurrentes.
- **Síndrome de Charge.** Un niño de 18 meses de edad fue diagnosticado del Síndrome de Charge. Se identificó una mutación de *novo* en heterocigosis, c.5428C>T en el gen *CHD7*, que ocasiona un codón de parada (p.R1810X). No presentó neumonías recurrentes ni infecciones previas.
- **Asplenia congénita.** Dos pacientes fueron diagnosticados con asplenia congénita, se confirmaron mediante ecografía abdominal y la presencia de cuerpos de Holly-Jolly en frotis de sangre. Ninguno de ellos presentó neumonías recurrentes. Tras el diagnóstico se instauró profilaxis con Penicilina vía oral durante 5 años y

vacunación completa contra bacterias encapsuladas (*H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N.meningitidis*).

- **Deficiencia de IRAK-4.** Un paciente presentó una profunda deficiencia de señalización tras agonistas de TLRs. El estudio genético mostró que el paciente era homocigótico para una sustitución G>T en la posición nucleotídica 1204 en el exón 11 del gen *IRAK-4*, la cual genera un codón de parada prematuro en la posición 402 (p.E402X) (211). Dos familiares en cuarto grado de este paciente habían fallecido previamente debido a infecciones invasivas por bacterias piógenas y el estudio genético de biopsias parafinadas mostró que eran homocigotos para la misma mutación. Tras el diagnóstico se instauró tratamiento profiláctico con cotrimoxazol.
- **Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X.** Un niño de 2 años de edad fue diagnosticado de XLA. El análisis inmunológico reveló deficiencia selectiva de IgA e IgG2, bajo porcentaje de linfocitos B (0.84%) y bajos niveles de expresión de BTK. Además, el diagnóstico se confirmó mediante secuenciación del gen *BTK*, detectándose una mutación *missense* que da lugar a un cambio de aminoácido p.S575R. Este paciente tiene cinco familiares que fueron diagnosticados previamente de XLA en edad adulta. A pesar de que se había informado a la familia de que hicieran estudios genéticos a todas las mujeres en edad fértil, y de que la madre era portadora de la mutación, no informó del nacimiento del paciente, por lo que no se le había realizado el estudio genético. El paciente tuvo posteriormente un hermano varón que fue diagnosticado de XLA al nacimiento. Tanto al paciente como a su hermano se les trata con gammaglobulina intravenosa (el hermano nunca ha presentado infecciones graves).

Otro paciente presentó altos niveles séricos de IgE (996.00 UI/mL), eosinofilia y bajo número de linfocitos B transicionales. Su hermano fue diagnosticado con el síndrome de Job (deficiencia de STAT3) debido a una mutación heterocigota dominante negativa en el gen *STAT3*, c.1414A>G. Sin embargo, el paciente no presentó la mutación.

Otro paciente (ID 1) con neumonías recurrentes presentó defectos graves en los linfocitos TCD4 vírgenes, hiperactivación de células T (CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>), baja respuestas proliferativa a anti-CD3 y PHA, bajos niveles de IgM y de C3c y altos niveles de IgG, IgG1 y IgG3. El paciente tenía el antecedente de anemia aplásica severa por lo que fue sometido a trasplante de médula ósea (TMO), posteriormente desarrolló enfermedad injerto contra huésped crónica (EICH).

Dieciocho niños presentaron niveles altos de IgE acorde a los valores de referencia establecidos, de los cuales, diez tenían asma o alergia leve a los ácaros y dos tenían asma grave. Un paciente con niveles altos de IgE (242 UI/ml) y alergia a los ácaros mostró valores altos de la población de células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN: dobles negativos), linfocitosis, eosinofilia y neutropenia. Otro paciente diagnosticado de lupus eritematoso sistémico (LES), mostró altos niveles de IgE (1120 UI/ml), IgG, IgG1, IgG3 e IgM y niveles reducidos del complemento C4. Al llevar a cabo en este niño el estudio de la CNV del gen *C4*, los resultados fueron 1, 5, 3 y 3 copias para C4A, C4B, C4S y C4L respectivamente. Otro paciente (ID 16) con asma moderada presentó niveles altos de IgG, IgG1, IgG2 y fallo vacunal, sin embargo, tras vacunar detectamos una respuesta apropiada de anticuerpos frente a neumococo. Estos pacientes no fueron incluidos como IDPs.

Las IDPs fueron más frecuentes en niños menores de 2 años (5/23, 21.7%) que en niños mayores a 2 años (3/21, 14.3%). No se encontraron diferencias significativas en la distribución por género: 5 niños de 29 tuvieron IDPs (17.2%) mientras que en niñas la relación fue 3/15, lo que supone un 20%. La neumonía bacteriémica fue la forma más frecuente de ENI en los pacientes con IDPs (n=4/8). Solo dos pacientes tuvieron más de un episodio de ENI y 6/8 pacientes no tenían antecedentes clínicos que pudiesen sugerir la presencia de IDPs. En 6 de los 8 pacientes con IDP no se registraron más infecciones después del diagnóstico. Solo un paciente diagnosticado con IDP se ha documentado consanguineidad.

Tabla 27. Inmunodeficiencias primarias diagnosticadas en los pacientes pediátricos con ENI grave

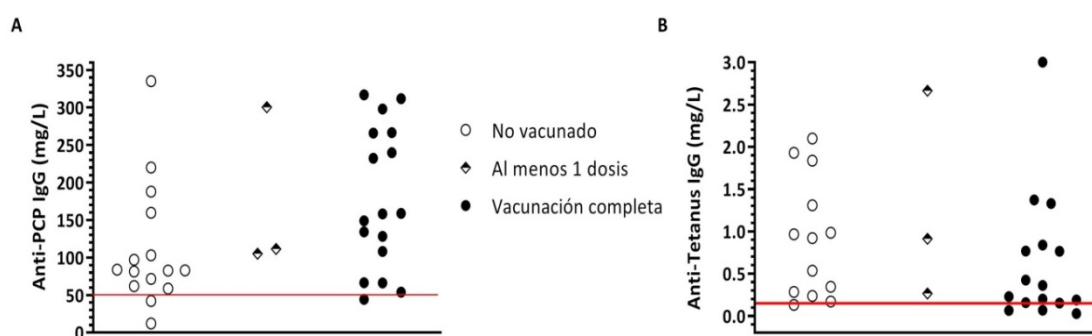
ID	Inmunodeficiencia primaria (género)	IDP (edad)	Consanguineidad	Vacunación previa (nº)	Serotipo	Infecciones previas (edad)	Infecciones posteriores (edad)	Factor de riesgo	Edad* años
9	Ataxia-telangiectasia (M)	Neumonía bacteriémica y SDRA (6m)	SI	No	23F	No	No	Retraso ponderal (p<3)	11
12	Di George (M)	Neumonía bacteriémica (16m)	No	PCV7(3)	19F	Neumonías recurrentes sin ingreso	No	Cardiopatía congénita	10
19	Trisomía 16 con Linfocitos B Sm bajos y alto CD21low. ↓ IgA e IgG2 (F)	Neumonía complicada (7a)	-	No	ND	Neumonías recurrentes, bacteriemia ( <i>S.pyogenes</i> y <i>C.jejuni</i> ) (8a)	Empiema ( <i>S.pneumoniae</i> ) (8a), neumonías recurrentes		12
20	Sd. Charge (F)	Bacteriemia y sepsis (18m)	No	No	15B	No	No	No	11
21	Asplenia congénita, Déficit de IgA (M)	Artritis, bacteriemia y sepsis (6m)	No	No	6	No	No	No	14
22	Asplenia congénita (F)	Meningitis (16m)	No	No	6B	Varicela grave (2m)	No	No	14
23	Deficiencia de IRAK4 (M)	Neumonía bacteriémica y artritis (49m)	No	No	ND	OMA y artritis por <i>S pneumoniae</i> (13m).	Antígeno neumococo en orina (54m). Faringitis, amigdalitis ( <i>S. equi</i> ), amigdalitis y linfadenitis cervical ( <i>S. pyogenes</i> ), (56 and 59m), celulitis y abscesos ( <i>S.aureus</i> ) (5-8y)	No	21
24	Agammaglobulinemia ligada-X (M)	Neumonía bacteriémica (2a)	No	PCV7(2)	19	No	No	No	12

En la tabla se muestran los pacientes con inmunodeficiencia primaria (IDP). Se muestra el número de identificación del paciente (ID), el tipo de IDP, la clínica, el tipo y número de vacunaciones de neumococo previas a la infección, serotipos e infecciones previas y posteriores al episodio de ENI. Sm: *switched memory* (linfocitos B con cambio de clase de inmunoglobulinas); M: masculino; F: femenino; SDRA: síndrome de dificultad respiratoria aguda; ND: no determinado; a: años; m: meses. OMA: otitis media aguda. \*Edad de los pacientes en la fecha que se cierra el estudio (febrero de 2017).



### 2.2.3 Evaluación de los niveles séricos de anticuerpos IgG contra polisacáridos capsulares neumocócicos y contra toxoide tetánico

Se analizaron mediante inmunoensayo los niveles séricos de anticuerpos IgG contra polisacáridos capsulares neumocócicos (PCP) y toxoide tetánico de los pacientes hospitalizados a los que se les hizo el análisis inmunológico, excluyendo a los pacientes con IDP definida, un total de 35 pacientes. Los niveles protectores sugeridos por la empresa proveedora son 43,8 mg/L para IgG frente a neumococo y 0,15 UI/mL para IgG frente a toxoide tetánico. Los niveles séricos de anticuerpos IgG contra PCP fueron normales excepto en tres pacientes: uno corresponde al paciente con anemia aplásica severa (ID 1) con valores de 12,3 mg/L; otro paciente no vacunado con niveles algo disminuidos (42,2mg/L) presentó neumonía complicada, anemia ferropénica, acantosis nigricans y título de isohemaglutinina  $\frac{1}{2}$ , sin embargo, no manifestó infecciones previas ni posteriores a la ENI y los niveles séricos frente a toxoide tetánico fueron normales; otra paciente vacunada tuvo niveles séricos ligeramente bajos de IgG contra PCP (44,3mg/L) y de IgE (10,7 UI/mL), no ha presentado infecciones recurrentes y los niveles séricos frente a toxoide tetánico fueron adecuados (**figura 18**). En cuanto a los resultados obtenidos en el estudio de los niveles séricos de IgG contra toxoide tetánico observamos que cuatro pacientes tenían niveles bajos, dos de ellos además tenían niveles bajos de IgE; sin embargo, sus niveles frente a PCP fueron normales y no presentaron infecciones recurrentes ni factores de riesgo previos.



**Figura 18. Representación gráfica de los niveles séricos de IgG contra polisacáridos conjugados y toxoide tetánico.**

**A)** A la izquierda, representado los niveles de IgG anti polisacáridos capsulares (anti-PCP). **B)** A la derecha, los niveles contra toxoide tetánico.

En ambas gráficas los pacientes están agrupados en función de la vacunación recibida contra neumococo: sin vacunar, con al menos 1 dosis y con vacunación completa. Las líneas rojas horizontales marcan los límites mínimos establecidos como normales. Los niveles protectores sugeridos por la empresa proveedora son 43,8 mg/L para IgG frente a neumococo y 0,15 UI/mL para IgG frente a toxoide tetánico.

Cuando se evaluaron los niveles séricos de anticuerpos IgG contra PCP y toxoide tetánico en los pacientes que presentaron fallo vacunal, todos tenían unos niveles séricos frente a neumococo por encima del umbral mínimo establecido.

### **3. Análisis del posible efecto causal de la inmunodeficiencia primaria producida por la deficiencia de MASP-2**

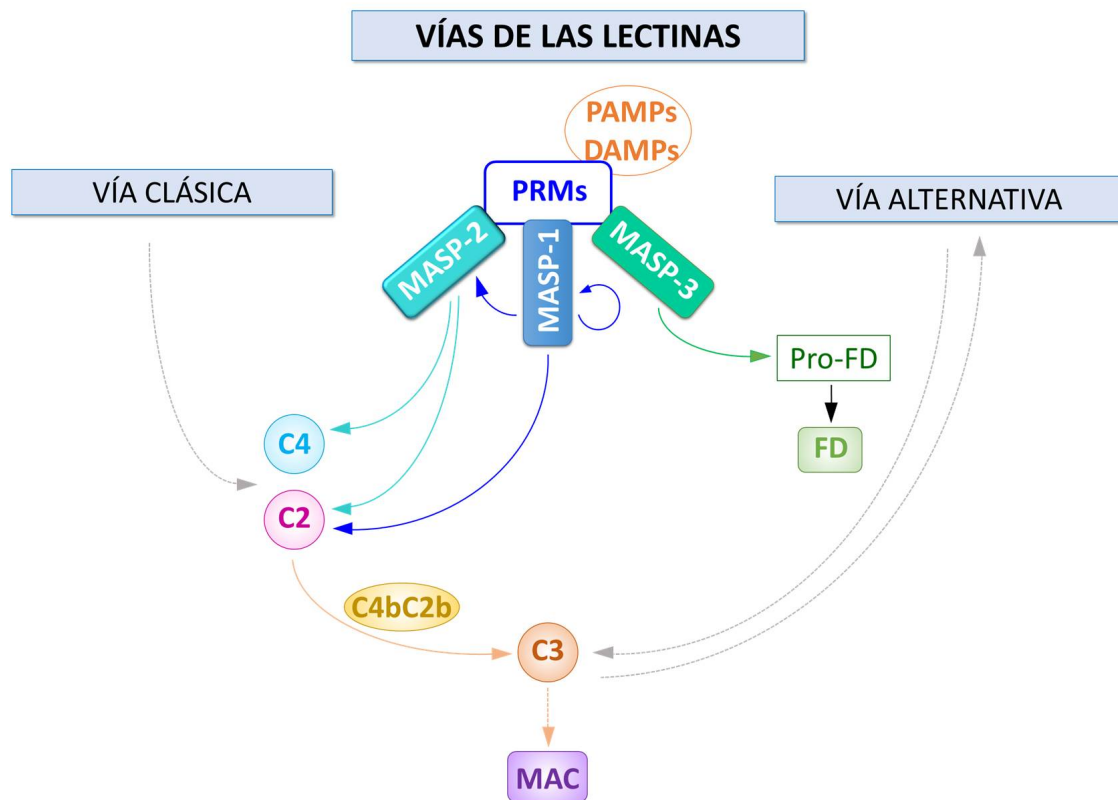
Como se ha mencionado con anterioridad, las deficiencias en componentes de las VC y VA del sistema del complemento están asociadas a infecciones bacterianas, principalmente a *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *Neisseria spp*, especialmente *N. meningitidis*, así como a enfermedades autoinmunes, la mayoría reumáticas (116,121). Sin embargo, hoy en día todavía existe controversia en cuanto al papel de la VL en la predisposición a infección y autoinmunidad (98). Como también se ha comentado, la activación de la VL se produce tras la unión de los PRMs asociados a MASPs, previo reconocimiento por parte de los PRMs de los PAMPS o DAMPs y la posterior hidrólisis de C2. El 60% del C2 es cortado por MASP-1, mientras que el 40% es activado por MASP-2 (212). De hecho, se ha observado que en ausencia de MASP-1 o MASP-2 no se genera C4bC2b a través de la VL ni se produce la activación de dicha vía (98–100) (**figura 19**).

En 2003 se describió el primer caso de deficiencia de MASP-2 (213) en un individuo adulto con desórdenes autoinmunes e inflamatorios, así como infecciones neumocócicas graves y recurrentes. Este paciente, totalmente deficiente en la actividad de la VL, tenía una mutación en homocigosis en el exón 3 del gen *MASP2* (rs72550870, p.D120G, c.359A>G). En individuos con esta mutación en homocigosis se observó una profunda disminución de los niveles séricos de la proteína, siendo prácticamente nulos (51,213). Además, dicha mutación impedía la activación de la VL al interferir la asociación de la MASP-2 existente con los PRMs de la VL (213).

En 2004, la deficiencia de MASP-2 se incluyó en la clasificación de IDPs como una deficiencia del complemento asociada a infecciones piógenas, enfermedades inflamatorias pulmonares y autoinmunidad (121,214). En 2006 y 2008, nuestro grupo de investigación describió tres adultos sanos con deficiencia de MASP-2 al presentar la mutación p.D102G en el gen *MASP-2* (51,120), esto arrojó dudas sobre la penetrancia clínica de esta deficiencia. Posteriormente, se han descrito otros individuos con esta deficiencia tanto en individuos sanos como en pacientes con gran variedad de desórdenes.

Con el fin de elucidar las consecuencias clínicas de la deficiencia de MASP-2, el tercer objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en analizar la presencia de la mutación p.D120G en diferentes grupos de pacientes adultos y pediátricos, así como en individuos sanos, y revisar

los casos de individuos en homocigosis en p.D120G del gen *MASP2* descritos hasta el momento.



**Moléculas de reconocimiento de patrones (PRMs) de la vía de las lectinas:**  
MBL, FCN-1, FCN-2, FCN-3 and CL-LK (heterocomplejo de CL-10 and CL-11)

**Figura 19. Representación esquematizada de la vía de las lectinas**

La vía de las lectinas (VL) se inicia después del reconocimiento de los PRMs a la superficie de carbohidratos o grupos acetilos en los PAMPs o DAMPs. MASPs inicia la cascada proteolítica tras la unión de los PRMs a la superficie del patógeno o diana autoactivándose primero MASP-1 y luego MASP-2. Ambos activados pueden cortar C2, sin embargo, C4 solo puede ser cortado por MASP-2. En ausencia de MASP-1 o MASP-2 la convertasa clásica de C3, C4bC2b, no puede ser generada a través de la VL ni se puede activar dicha vía. MASP-3 actúa como un activador del precursor del factor D (pro-fD) por lo que induce la activación de la vía alternativa, lo cual sirve como un bucle de amplificación para la vía clásica y de las lectinas. Se ha propuesto la activación de MASP-3 mediante MASP-1 y MASP-2, sin embargo, se requieren realizar más estudios. Además, estudios recientes han mostrado que MASP-2 puede cortar directamente C3 en ausencia de C4 y/o C2 en superficies capaces de activar la VL, no obstante, la importancia fisiológica de esta reacción es todavía dudosa (98-100).

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos; DAMPs: patrones moleculares asociados a daño; PRM: moléculas de reconocimiento de patrones; MASP: serina proteasas asociadas a MBL; MBL: lectina de unión a manosa; FCN-1: ficolina-1 (también comúnmente llamado M-ficolina); FCN-2: ficolina-2 (inicialmente identificado como L-ficolina); FCN-3: ficolina-3 (inicialmente identificado como H-ficolina); CL-10: colectina-10; CL-11: colectina-11; FD: factor D; MAC: complejo de ataque a la membrana

### 3.1. Características demográficas

En este estudio analizamos distintos grupos de pacientes e individuos sanos. En primer lugar, aumentamos el tamaño muestral de los grupos de adultos publicados en la Tesis Doctoral de la Dra. M<sup>a</sup> Isabel García Laorden (90,91). En el caso de los controles adultos se aumentó el tamaño muestral pasando 1083 individuos a 1639. La población control a su vez se dividió en dos subgrupos: voluntarios sanos no relacionados (n= 1119) y controles adultos sin infección (n= 520, formado por pacientes sin historias previas de infecciones respiratorias). En cuanto a la población de pacientes adultos con NAC se amplió el estudio pasando de 961 a 1495 pacientes. La media de edad de los pacientes adultos con NAC fue de  $62,8 \pm 17,7$  años y constituida predominantemente por varones (3,9% mujeres). De los 1495 pacientes con NAC, 461 de las neumonías fueron neumocócicas. Se estudiaron 56 pacientes adicional con LES (n= 186; en estudios previos n= 130). Además, incluimos a 103 pacientes pediátricos con ENI y a un grupo control pediátrico constituido por 311 niños (pacientes atendidos en cirugía menor sin historias previas de enfermedades respiratorias ni procesos inflamatorios al menos tres meses previos a su inclusión). La media de edad de los pacientes pediátricos con ENI fue de  $2,9 \pm 2,5$  años, grupo formado principalmente por varones (36,5% mujeres), y de  $12,7 \pm 13,2$  meses en el grupo control (67,2% mujeres). Los datos demográficos y el número de individuos estudiados en cada grupo se especifican en la **tabla 28**.

**Tabla 28. Características demográficas de los distintos grupos estudiados**

	Población	N	Edad (media $\pm$ SD)	Mujeres (%)
Controles	Controles adultos sanos	1119	$40,9 \pm 14,7$ años	51,8
	Controles adultos sin infección	520	$61,5 \pm 13,9$ años	34,4
	Niños controles sin infección	311	$12,7 \pm 13,2$ meses	67,2
Pacientes	Pacientes adultos con NAC	1495	$62,8 \pm 17,7$ años	33,9
	Niños con ENI	103	$2,9 \pm 2,5$ años	36,5
	Pacientes adultos con LES	186	$45,8 \pm 12,3$ años	91,9

N: tamaño muestral; SD: desviación estándar; %: porcentaje de mujeres

### 3.2. Distribución de la variante rs72550870 en las distintas poblaciones analizadas

Las frecuencias genotípicas de la variante c.359A>G (p.D120G) del gen *MASP2* en los distintos grupos de individuos analizados se muestran en la **tabla 29**. Podemos observar que no se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos de pacientes (NAC, ENI y LES) con sus respectivos grupos controles (de niños y adultos). Las frecuencias alélicas observadas de homocigosidad para la variante p.D120G en controles sanos (niños y adultos) es de 2,6%. Las frecuencias alélicas de la variante p.D120G en los distintos grupos de individuos se muestran en la **tabla 29**. La frecuencia esperada de homocigosidad para la variante p.D120G de nuestros dos grupos controles sanos juntos (niños y adultos n=1430) es por tanto de 6,9 por cada 10.000 individuos.

**Tabla 29. Frecuencias genotípicas de la variante p.D120G del gen *MASP2* en los grupos de individuos analizados**

	Población	N	Frec. alélica		Frec. genotípica			G/G <sup>3</sup> Esperados	p <sup>4</sup>	p <sup>5</sup>
			A	G	A/A	A/G	G/G			
Controles	Controles adultos sanos	1119	2179 (97,4)	59 (2,6)	1063 (95,0)	53 (4,7)	3 (0,3)	0,78 (0,07)		
	Adultos controles sin infección <sup>1</sup>	520	1004 (96,5)	36 (3,5)	484 (93,1)	36 (6,9)	0 (0)	0,62 (0,12)		
	Niños controles sin infección <sup>2</sup>	311	606 (97,4)	16 (2,6)	296 (95,2)	14 (4,5)	1 (0,3)	0,21 (0,07)		
Pacientes	Pacientes adultos con NAC	1495	2909 (97,3)	81 (2,7)	1414 (94,6)	81 (5,4)	0 (0)	1,10 (0,07)	0,213	0,929
	Niños con ENI	103	203 (98,5)	3 (1,5)	100 (97,1)	3 (2,9)	0 (0)	0,02 (0,02)	0,511	0,367*
	Pacientes con LES	186	360 (96,8)	12 (3,2)	174 (93,5)	12 (6,5)	0 (0)	0,19 (0,1)	0,660	0,584

Los valores de las frecuencias genotípicas se representan como el número de individuos y porcentaje (%) sobre el total. NAC: neumonía adquirida en la comunidad (incluyendo 73 pacientes con empiema pleural, 470 con sepsis grave y 79 con síndrome de distrés respiratorio agudo); ENI: enfermedad neumocócica invasiva; LES: lupus eritematoso sistémico; N: número total de individuos de cada población

<sup>1</sup>Grupo control de pacientes sin historia previa relevante de infecciones respiratorias del mismo origen que los pacientes con NAC.

<sup>2</sup>Grupo control de niños atendidos por una cirugía menor sin infecciones respiratorias ni procesos inflamatorios en al menos 3 meses previos a su inclusión.

<sup>3</sup>Número esperado de individuos homocigóticos para el alelo G en cada grupo (%).

<sup>4</sup>Valor de *p* a nivel genotípico.

<sup>5</sup>Valor de *p* en el modelo dominante (AG+GG vs AA).

\* Valor de *p* calculado con el test exacto de Fisher.

En total hemos identificado cuatro individuos controles homocigotos para el alelo G, tres de ellos han sido publicado en estudios previos nuestros, ninguno de ellos tenía historia clínica con infecciones graves ni problemas de autoinmunidad (90,91). El nuevo control homocigoto mutado p.D120G identificado pertenece al grupo control de edad pediátrica sin infecciones respiratorias previas. Este individuo tuvo durante sus 2 primeros años de vida seis episodios de otitis (tres de ellos fueron atendidos en atención primaria, y sólo uno fue supurativo). Entre los 3-5 años tuvo dos episodios de otitis por año, sólo el primero fue tratado con antibióticos. Actualmente este individuo tiene 12 años y no ha tenido más episodios de otitis ni otras enfermedades. En ningún momento ha cumplido con los criterios de diagnóstico de una IDP.

En este estudio no hemos hallado ningún paciente homocigoto para el alelo de menor frecuencia de p.D120G en *MASP2* en los 1495 adultos con NAC analizados (de los cuales 73 tenían empiema pleural, 470 sepsis grave, 79 síndrome de dificultad respiratoria aguda y 461 fueron diagnosticados con NNAC), ni en 186 pacientes con LES (30 de ellos con al menos un episodio de neumonía), ni tampoco en los 103 pacientes pediátricos con ENI.

### **3.3. Pacientes descritos hasta el momento en homocigosis para la mutación p.D120G del gen *MASP2***

La **tabla 30** muestra los once pacientes homocigotos p.D120G encontrados hasta el momento. Además del primer paciente publicado en 2003 (213), se han identificado diez pacientes adicionales portadores homocigotos para la variante 120G de *MASP2* (tres niños y siete adultos) al realizar estudios genéticos de asociación con diferentes enfermedades. Como consecuencia, estos pacientes presentaron un rango heterogéneo de enfermedades: dos pacientes sufrieron infecciones respiratorias recurrentes (215–217), otro fibrosis quística (118), otros dos ingresaron en un centro de enfermedades respiratorias (en la publicación no se especificó el tipo de enfermedad) (218), dos más se diagnosticaron de tuberculosis pulmonar (217), un paciente tuvo cáncer colorrectal (219), otro fue un paciente positivo al virus de la hepatitis C con carcinoma hepatocelular (220), y el último fue una mujer previamente sana, de 66 años de edad sin factores de riesgo, que fue hospitalizada por presentar una NAC no grave (69).

**Tabla 30. Pacientes publicados con deficiencia de MASP-2 debido a la homocigosidad para la mutación p.D120G**

Individuos	Año	Ref.
1. Adulto danés con varias manifestaciones autoinmunes, colitis ulcerosa e infecciones frecuentes, incluyendo neumonías neumocócicas graves	2003	(213, 221)
2. Paciente pediátrico polaco con neumonías recurrentes (estudio realizado en 335 niños polacos con IRR)	2004	(215, 217)
3. Individuo pediátrico danés con FQ (estudio realizado en 102 pacientes con FQ)	2006	(118)
4. Adulto danés ingresado en centro de enfermedades respiratorias (n/d)	2007	(218)
5. Adulto danés ingresado en centro de enfermedades respiratorias (n/d)	2007	(218)
6. Adulto italiano VHC <sup>+</sup> y CHC (estudio realizado en 215 pacientes adultos con CHC)	2008	(220)
7. Individuo pediátrico polaco con IRR y abscesos en la piel (estudio realizado en 331 niños con alergia y/o IRR)	2009	(217)
8. Adulto danés con cáncer colorrectal (estudio realizado en 593 pacientes con cáncer colorrectal)	2011	(219)
9. Adulto polaco con TB pulmonar (estudio realizado en 440 pacientes con TB)	2015	(217)
10. Adulto polaco con TB pulmonar (estudio realizado en 440 pacientes con TB)	2015	(217)
11. Adulto noruego con NAC grave (estudio realizado en 257 pacientes adultos con NAC)	2018	(69)

IRR: infección respiratoria recurrente; FQ: fibrosis quística; CHC: carcinoma hepatocelular; VHC: virus de la hepatitis C; TB: tuberculosis; NAC: neumonía adquirida en la comunidad; n/d: no disponible; Ref.: referencias



### 3.4. Casos descritos de homocigosis para la mutación p.D120G del gen *MASP2* en la población sana

Cabe destacar que hasta la fecha se han identificado también mediante estudios de asociación genética nueve individuos sanos (dos niños y siete adultos), incluyendo nuestros cuatro casos, homocigotos para la mutación p.D120G (**tabla 31**) (90,91,183,187,189–191).

**Tabla 31. Individuos sanos con deficiencia de MASP-2 debido a la homocigosis para la mutación p.D120G publicados**

Individuos	Año	Ref.
1. Adulto británico (de un estudio realizado en 314 tríos familiares con hijos afectados de psoriasis)	2005	(224)
2. Adulto español (de un grupo control de 868 adultos sanos de un estudio con 967 pacientes con NAC, 130 LES y 43 niños con IRR)	2006	(120)
3. Adulto español (de un grupo control de 868 adultos sanos de un estudio con 967 pacientes con NAC, 130 LES y 43 niños con IRR)	2006	(120)
4. Adulto español (de un grupo control de 805 adultos sanos en un estudio con 805 pacientes con NAC y 514 pacientes sin enfermedades infecciosas relevantes)	2008	(51)
5. Adulto italiano (de un grupo control de 162 individuos sanos para el estudio realizado a 215 pacientes adultos con CHC)	2008	(220)
6. Adulto polaco (de un estudio realizado en 179 niños con caries dentales)	2014	(222)
7. Adulto polaco (de un grupo control de 276 individuos sanos en un estudio de 440 pacientes con tuberculosis pulmonar)	2015	(217)
8. Recién nacido prematuro polaco (de un grupo control de 273 recién nacidos sanos en un estudio realizado con bebés con infección con sepsis y sin sepsis)	2016	(119)
9. Individuo pediátrico español (de un grupo control pediátrico sin historias de enfermedades respiratorias)	(este estudio)	(223)

NAC: neumonía adquirida en la comunidad; LES: lupus eritematoso sistémico; IRR: infección respiratoria recurrente; CHC: carcinoma hepatocelular; Ref.: referencias

# **VI. DISCUSIÓN**

---



## **1. Identificación de alelos de predisposición a la infección neumocócica en genes del sistema del complemento.**

El papel del sistema de complemento en la defensa frente a neumococo se demostró en modelos murinos en 1962 (225,226). La demostración definitiva de su papel en humanos, en condiciones naturales, la aporta el campo de las IDP (227). Sin embargo, son escasos los estudios que analizan el papel de variantes del sistema de complemento a nivel poblacional en la susceptibilidad a la infección, particularmente la neumocócica. En esta Tesis Doctoral se ha analizado la asociación de variantes de genes del sistema de complemento (*C2*, *C3*, *C5*, *CFB* y *CFH*) y el número de copias de *C4* total, *C4A*, *C4B*, *C4S* y *C4L* con la infección neumocócica en población española.

Entre las variantes más estudiadas para analizar la asociación de variantes de genes de complemento y enfermedad, se encuentran la CNV de los genes de *C4* (*C4A* y *C4B*). Numerosas publicaciones han puesto de manifiesto la asociación entre las CNV de *C4A*, en concreto los genotipos *C4A\*Q0*, y el desarrollo de LES (139,141,228). Se ha sugerido que la base molecular de esta asociación sería la capacidad de *C4A* de eliminar inmunocomplejos debido a su unión a grupos amino (frecuentes en las proteínas), mientras que *C4B* muestra una mayor afinidad de unión por los carbohidratos (229). Sin embargo, esta asociación no está exenta de controversia debido al fuerte desequilibrio de ligamiento que existe con el MHC clase II. El haplotipo *HLA-DRB1\*03:01* (DR3), en su forma extendida *HLA-A\*01-B\*08-(C4A\*Q0)-C4B1-DRB1\*03:01*, contiene con frecuencia el gen nulo *C4A\*Q0*. Esto hace difícil determinar qué variante del haplotipo es la que confiere susceptibilidad para la enfermedad (139). La unión diferencial a grupos hidroxilos o aminas y la distinta actividad hemolítica entre *C4A* y *C4B* se demostraron utilizando proteínas purificadas, pero no utilizando suero, donde se encuentran gran cantidad de proteínas reguladoras. Además, en estos hallazgos no se demostró la relevancia fisiológica de estos componentes del complemento puesto que las mediciones de la unión covalente de *C4* se llevaron a cabo a partir de componentes de *C4* purificados y no se determinaron *in vivo* en presencia de otras proteínas séricas (230). Se sabe que en LES los niveles de *C4A* y *C4B* varían en paralelo con la actividad de la enfermedad, lo que sugiere que *C4A* no se utiliza de forma selectiva sobre *C4B* (231). Además, algunos estudios han demostrado que tanto las deficiencias completas de *C4A* como las deficiencias completas de *C4B* están asociadas a enfermedades relacionadas con la formación de inmunocomplejos (232).

La primera asociación de la CNV de genes de *C4* con enfermedades infecciosas se remonta a 1989, cuando se observó que el genotipo *C4B\*Q0* se encontraba significativamente

aumentado en niños con meningitis bacteriana (233). Se propuso entonces que la razón de esta asociación sería la capacidad de unión de C4B a carbohidratos de la cápsula bacteriana, que facilitaría la deposición de C4B y la activación subsecuente de la cascada de complemento (229). En otro estudio posterior se observó una mayor frecuencia de este genotipo en niños de raza blanca, pero no en afroamericanos, con infección bacteriémica por neumococo, meningococo o *H. influenzae* (112). Sin embargo, estas frecuencias fueron superiores en lactantes con muerte súbita (234). Estos hallazgos no se replicaron en un estudio que incluyó niños y adultos con bacteriemia o meningitis causada por bacterias encapsuladas (150). Tampoco se asoció la deficiencia *C4B\*Q0* ni *C4A\*Q0* en un análisis de deficiencias del isotipo *C4* en adultos con neumonías recurrentes y/o infección neumocócica bacteriémica (235). Por otro lado, el bajo número de copias de *C4A* (<2) también se ha asociado con rinosinusitis crónica o recurrente en adultos (148) y mayor riesgo de enfermedades autoinmunes, principalmente LES (140).

En general, en los estudios mencionados anteriormente no se determinaron directamente la CNV de *C4A* y *C4B*, sino que se infirieron midiendo las concentraciones relativas de proteínas plasmáticas o séricas de *C4A* y *C4B*. Para ello, se realizó electroforesis en gel de agarosa de alto voltaje de muestras de suero o plasma con EDTA pre-tratado con neuraminidasa y carboxipeptidasa seguido de inmunofijación (236,237). La deficiencia completa o parcial de *C4* se identificó primero como ausencia o concentración sérica reducida de la proteína. Se creía en aquel momento que cada cromosoma 6 presentaba un único gen de *C4A* y *C4B*. Actualmente se conoce que coexisten de una a cuatro copias de genes casi idénticos de *C4A* y *C4B* en un solo cromosoma, creando un efecto de dosis. Además, muchos de estos estudios se realizaron en pequeños grupos de pacientes, y en algún caso con frecuencias muy altas de genotipos *C4A\*Q0*, 10% (235), o *C4B\*Q0*, 8% (148), en comparación con los datos obtenidos en los últimos años mediante estudios genéticos de CNV. Por otra parte, no se conocía la existencia de alelos *C4L* y *C4S*, los cuales influyen en el nivel de expresión proteica y en la actividad sérica de complemento (142). Hoy día sabemos que, para determinar con precisión la CNV y la deficiencia parcial de los genes *C4A* y *C4B*, así como la determinación precisa del número de copias y la de alelos *C4L* y *C4S*, se requiere el análisis genético y la determinación del número de copias de *C4A*, *C4B*, *C4L* y *C4S*. La complejidad en la variación de los genes de *C4* ha impedido su inclusión en estudios de asociación de genomas basados en SNV. Estudios previos han mostrado que no hay SNV que puedan ser utilizados como marcadores del número de copias de los genes *C4A* o *C4B* por lo que los GWAS no detectan dichas variaciones (146). Para tratar de solventar este problema se han desarrollado

varias técnicas. Una de ellas es la PCR cuantitativa (qPCR) basada en la utilización de sondas TaqMan para *C4A*, *C4B*, *C4L* y *C4S* totales. Esta técnica, se desarrolló principalmente para llevar a cabo estudios de replicación, especialmente en casos en los que la concentración de ADN era limitante. Este análisis es delicado y requiere ineludiblemente la validación interna de datos a nivel individual. Esta validación se logra cuando los GCN de *C4* total = GCN de *C4A* + *C4B* = GCN de *C4L* + *C4S*. Se ha demostrado que la estrategia qPCR es sensible y altamente robusta cuando la calidad del ADN genómico es de buena calidad, lo que puede reflejarse en la validación interna de datos. En el presente trabajo se aplicó esta metodología y no se observó ninguna asociación de GCN en *C4*, *C4A*, *C4B*, *C4S* o *C4L* con predisposición a NNAC en adultos ni a ENI en niños.

En los resultados obtenidos en el presente estudio no se han observado diferencias estadísticamente significativas al comparar las frecuencias de alelos o genotipos de los genes *C4A*, *C4B*, *C4L* ni *C4S* entre pacientes con EN, tanto en adultos como en niños, con las de controles adultos y pediátricos sanos. Nuestros estudios sugieren que la deficiencia selectiva de *C4A* o *C4B*, estando presentes genes de una de las dos variantes, puede ser redundante en la defensa frente a neumococo.

En el presente estudio se ha observado una asociación significativa de los alelos  $C3_{R102}$  y  $C3_{P314}$  con la predisposición a NNAC. Tanto la variante  $C3_{102G}$  como la variante  $C3_{314L}$  se han asociado previamente a riesgo de padecer diversas enfermedades mediadas por la activación descontrolada del sistema del complemento, entre ellas DMAE y EDD (161,172,177,206,238,239). Además, también se ha demostrado que  $C3_{102G}$  predispone a nefropatía por IgA, vasculitis sistémica, lipodistrofia parcial y glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II (239). La SNV rs2230199 del gen *C3* se describió por primera vez a nivel proteico en 1967 (240). En función de la movilidad de las variantes sometidas a electroforesis en geles de agarosa, los alelos fueron denominados *C3S* (*slow*) y *C3F* (*fast*) (240,241). Esta SNV se caracteriza por un cambio a nivel genético de una citocina (C) a guanina (G) (g. 6718376 G>C). Esta SNV, una mutación sin sentido (*missense*), ocasiona un cambio de un residuo aminoácido de arginina (R) por uno de glicina (G) (p. $C3_{R102G}$ ) en la proteína *C3*. El alelo *C3S* se corresponde con  $C3_{102R}$  y *C3F* con  $C3_{102G}$  en la nomenclatura actual. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el genotipo homocigoto  $C3_{102R/102R}$  predispone a NNAC en adultos.

En este estudio la asociación genotípica y alélica de la variante  $C3_{R102G}$  fue mayor en pacientes con NAC (independientemente del germen causal) que en pacientes con NNAC. En pacientes con No-NNAC, en particular en pacientes con NAC de etiología desconocida (NAC-

ND) también se detectó una asociación con la variante alélica C3<sub>R102</sub>. Esto puede ser debido a que probablemente el neumococo es el causante de la neumonía en muchos de los pacientes con NAC-ND (242), lo cual justificaría la asociación observada.

Es importante destacar que el riesgo, medido como OR, asociado a C3<sub>R102G</sub> con NNAC-B es mayor que el observado con las NNAC-NB. Este dato no es de extrañar, ya que las infecciones invasivas por neumococo son frecuentes en pacientes con deficiencia de C3. Por el contrario, no se detectó asociación con C3<sub>R102</sub> al analizar pacientes con NAC causada por otro germen distinto a *S.pneumoniae* (NAC-OM).

A pesar de que las frecuencias observadas para el alelo C3<sub>R102</sub> fueron mayores en pacientes con NAC-OM que en controles, no se establecieron diferencias significativas, si bien el riesgo conferido (OR) fue muy similar al observado en pacientes con NAC no neumocócica. La opsonización parece ser el principal mecanismo de defensa para la mayoría de las bacterias Gram-negativas. De hecho, además de neumococo, otros estreptococos y *H. influenzae* son predominantes en pacientes con deficiencias de C2 o C3. Por otra parte, aunque no son frecuentes, estos pacientes son también propensos a infecciones invasivas causadas por bacterias Gram-negativas distintas a *H. influenzae* y meningococo (110,243). No podemos descartar que la ausencia de asociación estadística sea debida al reducido tamaño muestral del grupo de pacientes con OM-NAC.

El residuo 102 del gen C3 se localiza en el dominio de macroglobulina 1 (MG1) de C3, cercano al dominio que contiene un grupo tioéster (TED). MG1 se encarga fundamentalmente de mantener la estructura y la correcta orientación del TED. La interacción de TED con MG1 provoca un cambio conformacional que permite la unión del regulador del complemento fH a C3b (244–246). En la molécula de C3, la arginina-102 (C3<sub>R102</sub>) crea un puente salino con el ácido glutámico-1032 (C3<sub>E1032</sub>) que es esencial para la interacción de C3b con el fH (247). Se ha demostrado en estudios funcionales que la variante génica C3<sub>R102</sub> codifica una proteína con una menor capacidad de activación de la VA de complemento con respecto a la variante C3<sub>102G</sub> (166). Este efecto es debido a que la variante C3<sub>102G</sub> provoca una menor unión de C3b al fH que la variante C3<sub>102R</sub>. La menor afinidad por el fH genera una disminución de la actividad cofactora del fI, lo que explica que en presencia de la variante C3<sub>102G</sub> la tasa de inactivación de C3b disminuya y, como consecuencia, aumente la actividad de la VA (166,247,248). Esto podría explicar la importancia de este polimorfismo en la asociación a la susceptibilidad para la infección neumocócica: los individuos homocigóticos con genotipo CC (C3<sub>R102/R102</sub>), al tener una menor activación del complemento, tendrían más riesgo de padecer una infección.

En el presente estudio también se ha observado una asociación del alelo C3<sub>P314</sub> de rs1047286 con el desarrollo de NNAC. La variante C3<sub>P314L</sub> es originada por un cambio nucleotídico de guanina (G) a adenina (A) (g. 6713251 G>A). Esta SNV *missense* ocasiona un cambio de un residuo aminoácido de prolina (P) por uno de arginina (A) (p.R102G) en la proteína C3. Debido a que estos dos aminoácidos presentan la misma carga, esta SNV no puede ser descrita mediante migración electroforética como en el caso de la SNV C3<sub>R102G</sub> del gen C3. El residuo 314 de C3 se encuentra en el dominio MG3, que es clave en la estabilización de la convertasa de C3 ya que es un sitio de unión para el factor B (249). En los estudios discutidos anteriormente con proteínas purificadas no se ha analizado el efecto de la variante C3<sub>P314L</sub> sobre la actividad de la VA. Sin embargo, se ha demostrado que el suero de individuos que portan la variante C3<sub>P314</sub> produce menor activación de la VA que el de los que tienen la variante C3<sub>314L</sub> (177,250). También se han asociado ambas variantes, C3<sub>102G</sub> y C3<sub>314L</sub>, con una mayor actividad hemolítica de la VA a partir de proteínas purificadas y de suero respectivamente (166,249). Esto podría explicar la asociación observada. La significación de la asociación de estos alelos con NAC y NNAC que hemos observado es menor para C3<sub>P314</sub> que para C3<sub>R102</sub>. Sin embargo, C3<sub>R102</sub> y C3<sub>P314</sub> se encuentran en alto desequilibrio de ligamiento, lo que hace que sea difícil confirmar sus efectos individuales en el riesgo de la enfermedad. Se ha sugerido que C3<sub>102G</sub> proporcionara el mejor modelo de riesgo de enfermedad para DMAE (238,251), aunque el análisis de haplotipo sugirió que el haplotipo que contiene los alelos menos frecuentes de ambas variantes (C3<sub>102G</sub> y C3<sub>314L</sub>) muestra una asociación más fuerte con DMAE (206,252). El análisis haplotípico realizado en el presente estudio sugiere que el alelo menos frecuente de C3<sub>R102G</sub> (C3<sub>102G</sub>) protege contra NNAC y contra NAC, independientemente del alelo de C3<sub>P314L</sub> presente en el haplotipo. Debido a la baja frecuencia, no fue posible determinar el papel de los haplotipos que contenían C3<sub>102G</sub> y C3<sub>314L</sub>.

Hay pocos estudios hasta la fecha en los que se analice la asociación de estas variantes con la predisposición a enfermedades infecciosas (173,253). En un elegante estudio poblacional realizado en 1979 se realizaron estudios de variantes de 26 proteínas en descendientes de colonos holandeses que emigraron a Surinam en el siglo XIX y sobrevivieron a devastadoras epidemias de fiebre tifoidea y amarilla en los años 1845 y 1851 respectivamente con una mortalidad de aproximadamente un 60%. Es destacable que los supervivientes a estas epidemias tuvieron una alta frecuencia del alelo C3 más activo, C3<sub>102G</sub>, en comparación con la población holandesa de origen ( $p = 0.00007$ ). Aunque no puede descartarse un efecto fundador, la variación resultante de este desafortunado experimento de la naturaleza en las frecuencias de los alelos de C3, se cree que fue debida a una presión



selectiva contra el alelo C3<sub>R102</sub> para favorecer la presencia de la variante C3<sub>102G</sub> debido a su efecto protector ante una infección (254).

En un estudio llevado a cabo por Adriani y colaboradores (173), estos autores encontraron en el LCR de pacientes con meningitis bacteriana (principalmente neumocócica) una menor activación del complemento en aquellos pacientes homocigotos para el alelo más frecuente C3<sub>R102</sub> en comparación con los portadores del alelo de menor frecuencia C3<sub>102G</sub>. En su estudio de asociación, encontraron que los homocigotos para el alelo más frecuente C3<sub>R102</sub> tenían una mayor susceptibilidad a la meningitis bacteriana, pero esta asociación no fue estadísticamente significativa tras la corrección para múltiples pruebas. Sin embargo, observaron una asociación significativa del alelo más frecuente C3<sub>314P</sub>. Estos estudios fueron llevados a cabo en controles y pacientes con diferente origen étnico y en el que los pacientes tuvieron meningitis bacteriana causada por diversos microorganismos. Cuando realizaron el mismo análisis en controles y en pacientes con meningitis neumocócica de un mismo origen étnico (blancos) no se encontró asociación de la enfermedad con ninguna de las dos variantes. Una de las razones para explicar estas discrepancias podría ser la alteración de los resultados debido a la gran variabilidad de las frecuencias génicas de estas variantes entre diferentes poblaciones. Por ejemplo, la frecuencia del alelo menor de C3<sub>R102G</sub> en asiáticos es del 0% mientras que en europeos es del 22% ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) (250). En otro estudio realizado por Bianca Woehrl y colaboradores tampoco se encontró una asociación de las variantes C3<sub>R102G</sub> y C3<sub>P314L</sub> con meningitis neumocócica (175). El hecho de que encontremos asociación con neumonía neumocócica y con bacteriemia, y que no se haya observado asociación con meningitis neumocócica en otros estudios, podría explicarse por un efecto y una susceptibilidad diferente en distintos tejidos y órganos. Este fenómeno no es extraño en el campo de las inmunodeficiencias primarias, especialmente en las deficiencias de la inmunidad innata. Así, la deficiencia de TLR-3 predispone a encefalitis por el virus herpes simplex pero no, por ejemplo, a infecciones cutáneas, y raramente se producen infecciones por otros microorganismos; las deficiencias de la inmunidad mediada por IL-17 / IL-22 predispone a la candidiasis mucocutánea crónica, pero muy raramente se producen infecciones invasivas por candidas; los pacientes con deficiencias de los componentes C5-C9 del complemento son susceptibles a la meningitis meningocócica pero no son frecuentes otras infecciones meningocócicas (227,255). En el caso concreto de neumococo, cabe destacar que los pacientes con deficiencias de activación de TLR mediada por MyD88, como las deficiencias de IRAK-4 y MyD88, son propensos a infecciones neumocócicas invasivas, específicamente meningitis y bacteriemia, pero en cambio, la neumonía neumocócica es poco frecuente (45,256–258). Los

principales microorganismos que causan infecciones en pacientes con deficiencia de C3 son neumococo, *H. influenzae* y estreptococos, aunque también se observan infecciones por Neisseria, especialmente *N. meningitidis*. Las infecciones más frecuentes producidas por neumococo y *H. influenzae* en pacientes con deficiencias de C3 y de la VC son las infecciones del tracto respiratorio, en particular neumonía, y bacteriemia (110,243,258). Observamos un escenario similar en pacientes con el proceso de opsonización alterado debido a deficiencias de anticuerpos (259). Estas diferencias no significan que estas moléculas no participen en la defensa en ciertos tejidos u órganos (lo que sí es cierto en algunos casos), sino que son redundantes en condiciones naturales. En un GWAS realizado recientemente, se observó una asociación de una SNV, la rs116264669, ubicada en una región intrónica del gen *CCDC33* con meningitis neumocócica (58). Se demostró que dicha SNV está localizada en una región del genoma que interactúa con el gen *ISLR2* (superfamilia de inmunoglobulina que contiene repeticiones ricas en leucina 2, *Immunoglobulin Superfamily Containing Leucine Rich Repeat 2*). Tanto *CCDC33* como *ISLR2* son expresados principalmente en el cerebro. Este estudio demuestra que a pesar de que la función de *CCDC33* no se ha relacionado directamente con inmunidad, los resultados genómicos funcionales obtenidos sugieren que la SNV se asocia a susceptibilidad a la enfermedad a través de la interacción con el gen *ISLR2* (58). Por lo tanto, una predisposición preferente a la neumonía, en lugar de a meningitis, podría ser, al menos en parte, la razón de las discrepancias observadas entre nuestro estudio y aquellos centrados en meningitis neumocócica (173,175), especialmente cuando están involucradas mutaciones en componentes del complemento que implican una baja actividad, no la pérdida de función de la proteína.

En el presente estudio también se ha encontrado una asociación entre la SNV rs547154 (también conocida como IVS10, variante génica en el intrón 10 de C2) del gen que codifica el componente C2 (IVS10), con NNAC en adultos, aunque no se observó asociación con NAC-ND ni NAC-OM. C2 y el *CFB* se encuentran en el MHC-III. Se han observado dos haplotipos de variantes en C2 y *FB* que ejercen un efecto protector frente al desarrollo de DMAE (156,260): un haplotipo que contiene las SNV p.L9H del *CFB* y la variante p.E318D en C2, así como el haplotipo que contiene las variantes p.R32Q del *CFB* y rs547154 (IVS10) de C2. La variante intrónica rs547154 (IVS10) en el gen C2 está en desequilibrio de ligamiento completo con la variante R32Q en el gen *CFB* (en población europea  $D'=1$ ,  $R^2=1$  [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Hasta la fecha no se han podido demostrar las consecuencias funcionales de la variante rs547154, pero, se cree que la asociación protectora de dicha SNV con la DMAE, está en realidad mediada por  $fB_{R32Q}$  (156,260,261). La variante R32Q del *fB* fue descrita por primera vez en 1972 como BfS y

BfF mediante inmunofijación usando suero fresco después de la electroforesis en gel de agarosa (262). La variante fB<sub>R32Q</sub> se encuentra en el dominio Ba que se libera durante la formación de la convertasa C3bBb. La variante de riesgo fB<sub>R32</sub> muestra una mayor afinidad por C3b en comparación con fB<sub>32Q</sub>, y da lugar a una mayor formación de la proenzima C3bB, mayor formación de convertasa activa y, por lo tanto, mayor actividad lítica a través de la VA (157,166). Dado que C3 es un componente clave y central de las tres vías del complemento, - mientras que el fB solo está involucrado en la VA-, las variantes implicadas en producir baja actividad en C3 podrían tener un mayor impacto en la susceptibilidad neumocócica que las variantes del fB tal como se observa en el presente estudio.

Varias explicaciones podrían justificar la ausencia de asociación con NNAC de los otros SNVs analizados en nuestro estudio. La baja frecuencia de algunas variantes puede influir en la ausencia de asociación. Además, la activación del sistema del complemento es compleja y puesto que está involucrado en muchos procesos de la respuesta inmune e inflamatoria, su activación está altamente regulada (93,96). Por lo tanto, los mecanismos subyacentes en la activación del sistema del complemento causados por cada mutación en la defensa contra neumococos y en las enfermedades inflamatorias mediadas por el complemento pueden ser diferentes. Por ejemplo, la EDD y la DMAE están clínicamente vinculadas, pero muchas de las variantes que afectan a la susceptibilidad de DMAE/EDD (tales como C3<sub>R102G</sub> y C3<sub>P314L</sub>) no tienen ningún efecto sobre el riesgo al SHUa (185). La razón es que las mutaciones que predisponen a SHUa afectan principalmente a la capacidad de prevenir la activación inapropiada de la VA en las superficies celulares, mientras que la DMAE/EDD se produce principalmente cuando la regulación de la fase fluida de la VA se ve afectada. De hecho, solamente se ha asociado un polimorfismo de la VA con DMAE y EDD que a su vez influya en el riesgo de SHUa, este es el rs800292 del factor H, fH<sub>V62I</sub> (179).

La variante génica rs17611 en el gen C5 se ha asociado en estudios previos con la gravedad, pero no con la susceptibilidad, a meningitis bacteriana adquirida en la comunidad en adultos, concretamente con meningitis neumocócica. Este defecto es causado probablemente por el efecto provocado por esta SNV en la generación de la anafilotoxina C5a, una potente molécula pro inflamatoria (175). La ausencia de asociación de esta variante en nuestro estudio no es sorprendente dado que la actividad de opsonización de la vía del complemento no se ve afectada por las deficiencias de la vía terminal, de modo que los pacientes con estas deficiencias no son particularmente propensos a infecciones neumocócicas (114). De hecho, tampoco se encontró asociación de la SNV rs17611 con meningitis bacteriana neumocócica en la misma cohorte del estudio de Adriani previamente comentado (173). Estudios recientes

realizados con ratones con deficiencias del complemento y estudios realizados en humanos revelan que los componentes de la vía terminal del complemento (C5a y C5b-C9) son claves en los daños celulares ocasionados por el SARS-CoV-2 en la COVID-19 (128,129,263).

La SNV Y402H del gen *CFH* es la variante génica con mayor asociación de susceptibilidad a la DMAE. Diferentes estudios de asociación han demostrado que los portadores homocigotos de fH<sub>402H</sub> presentan un riesgo siete veces mayor a DMAE (264,265). Se ha sugerido que esta variante influye en el efecto inhibitor del fH, de forma que produce una disminución del efecto inhibitor sobre el sistema del complemento y un aumento de la inflamación crónica localizada. Sin embargo, no se han detectado diferencias en la regulación de la fase fluida en la activación del complemento entre las variantes fH<sub>Y402</sub> y fH<sub>402H</sub>. Incluso se ha observado que la deficiencia genética del *Cfh* en ratones disminuye en lugar de agravar la DMAE, en contraste con lo que se esperaría que sucediera si su mecanismo de acción fuese a través de la inhibición del complemento (266). No obstante, se ha observado que la variante fH<sub>402H</sub> disminuye la afinidad de unión a numerosos componentes de la retina dañada, entre ellos la heparina, que interviene en la regulación local de la convertasa. Se cree que esta es la razón por la que predispondría a DMAE (261,267). Además, la variante de riesgo para la DMAE de p.Y402H se une más eficientemente que la isoforma sin riesgo a su receptor CD11b/CD47 en los leucocitos, lo que reduce la velocidad de eliminación de los restos celulares (266). Estudios recientes también han sugerido que el papel de la variante fH<sub>Y402H</sub> en la DMAE puede incluso estar regulada a nivel de las lipoproteínas (268). Por lo tanto, parece que el papel de p.Y402H en la DMAE puede ser, al menos en parte, independiente de la activación del complemento. En nuestro estudio no observamos asociación para la SNV fH<sub>Y402H</sub>. En estudios previos tampoco se ha encontrado una asociación de esta variante con meningitis meningocócica. Sin embargo, la SNV p.E936D en el gen del *CFH* y varias SNV en desequilibrio de ligamiento se asociaron con meningitis meningocócica en un GWAS en el que se seleccionaron y estudiaron genes candidatos (64,202). En nuestro estudio no se observó asociación de esta variante a NAC ni NNAC. Actualmente se desconocen las consecuencias funcionales de la variante p.E936D u otra SNV en desequilibrio de ligamiento. No obstante, no se descarta que se produzca la interacción entre proteínas meningocócicas y la unión al hospedador a través del fH o proteínas relacionadas con el fH. Por tanto, la variante p.E936D y otras variantes en desequilibrio de ligamiento con esta SNV podrían predisponer específicamente a infecciones por *N meningitidis*.

En, en este estudio se ha encontrado una asociación de SNV funcionales del gen *C3* (C3<sub>102G</sub> y C3<sub>314L</sub>) con una menor susceptibilidad a neumonía neumocócica en adultos. Mientras

que un polimorfismo, el rs547154, del gen *C2* se asoció con predisposición a ésta. Dichas variantes se han asociado previamente a un aumento o reducción del riesgo a DMAE respetivamente (**tabla 32**). El sistema del complemento es un arma de doble filo influenciado por las variantes genéticas del sistema del complemento. Los resultados obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis planteada previamente, en la que se postulaba que las variantes del sistema de complemento que promueven una mayor activación predispondrían a enfermedades inflamatorias (como DMAE o EDD), mientras que las variantes que presentan una menor activación favorecerían el riesgo de infección (185,269). Hay que destacar que precisamente las variantes R102G del gen *C3* y R32Q del gen *CFB* (en desequilibrio de ligamiento completo con rs547154) eran dos de las tres variantes que se proponía que pudieran tener un mayor efecto (157,166). En el futuro, los estudios dirigidos a establecer la asociación genómica con el desarrollo de enfermedades podrían fomentar terapias eficaces frente a distintas enfermedades. Es el caso de los complotipos asociados con una mayor activación del complemento y con DMAE ya permitirán un tratamiento personalizado en base a la genética del individuo con terapias que inhiban la activación del complemento. Ejemplos de complotipos asociados a DMAE son los constituidos por las SNVs rs2230199 en *C3*, rs641153 en *CFB* y la rs800292 en *CFH* (166) o el formado por las SNVs rs4151667 y rs641153 en el gen *CFB* y la rs800292 en *CFH* (207). En nuestro estudio se observó un efecto redundante entre las variantes asociadas con susceptibilidad a NNAC, de modo que no detectó epistasia entre *C2* y *C3* que aumente el riesgo de desarrollar NNAC. Esto podría ser debido a la existencia de complotipos muy poco frecuentes y a que la combinación pueda afectar al impacto funcional de cada variante. Las terapias que aumenten la activación del complemento podrán ser útiles en la prevención de la NAC y contribuir a evitar infecciones nosocomiales en pacientes con genotipos de riesgo.

**Tabla 32. El sistema de complemento como arma de doble filo: variantes asociadas a riesgo o protección de enfermedades**

Fenotipos asociados al alelo de menor frecuencia					
Gen	SNV	Posición	Riesgo	Protección	Ref.
C2	rs547154	Intrón, IVS10	NNAC	DMAE	(161), este estudio
C3	rs2230199	R102G	DMAE, EDD	NAC, NNAC	(172), este estudio
C3	rs1047286	P314L	DMAE, EDD	NNAC	(113), este estudio

SNV: variación del número de copias; Ref.: referencias bibliográficas; DMAE: degeneración macular del adulto asociado a la edad; EDD: enfermedad de depósitos densos; NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad; NAC: neumonía adquirida en la comunidad

## **2. Realización de estudios inmunológicos en pacientes pediátricos con enfermedad neumocócica invasiva dirigidos al diagnóstico de inmunodeficiencias.**

En este estudio se han tenido en cuenta todos los pacientes pediátricos con ENI ocurridos entre el año 2000 y 2017 en Gran Canaria. Del total de 209 pacientes con ENI identificados, 78 requirieron hospitalización. Un 19.2% de los pacientes con ENI hospitalizados presentaban factores de riesgo clásicos de ENI. Para el estudio de IDP, se consideró a los pacientes que no presentaban un factor de riesgo, salvo en aquellos casos que pudiera ser reflejo de una IDP sintromica. Se pudieron estudiar 44 pacientes, diagnosticándose en 8 de ellos una IDP. Esto supone que un 10% del total de los pacientes pediátricos hospitalizados con ENI y un 18% de los pacientes finalmente analizados presentaban una IDP. La presentación más frecuente entre los pacientes hospitalizados fue meningitis. Entre los pacientes diagnosticados de una IDP, la neumonía bacteriémica fue la presentación más frecuente.

No es fácil definir los criterios que deben hacer sospechar una IDP. Tradicionalmente se han utilizado los criterios propuestos para la fundación Jeffrey Model por un grupo de expertos (270,271). Estos criterios, propuestos en 1993, han sido revisados en los últimos años. Atendiendo a los criterios para pediatría, debe sospecharse una IDP en todo paciente con al menos dos de los siguientes criterios: presentar infecciones bacterianas recurrentes, presentar dos o más infecciones graves (neumonía, meningitis, sepsis, osteomielitis), mostrar una evolución de la infección atípica, necesidad de administrar tratamientos antimicrobianos prolongados y tener infecciones recurrentes con el mismo patógeno (**figura 20**). Sin embargo, se ha cuestionado la idoneidad de esos criterios ya que se centran únicamente en las manifestaciones infecciosas (272–275), sin tener en cuenta otras manifestaciones de IDP, como desregulación inmunológica, autoinmunidad, autoinflamación o cáncer, y por no tener en cuenta que algunos pacientes con un único episodio infeccioso grave, pueden tener una inmunodeficiencia (272–276). En el presente estudio, los pacientes con IDP detectada no siempre presentaron infecciones recurrentes ni los criterios de sospecha clásicamente utilizados de IDP. De hecho, solo dos de los pacientes diagnosticados con una IDP presentaron ENI recurrente y 6 de los 8 pacientes no cumplirían los criterios clásicos de sospecha de IDP de la Fundación Jeffrey Model. Hay, además, que destacar que 6 de los 8 pacientes diagnosticados con una IDP no presentaron infecciones serias tras el diagnóstico. Los resultados observados,

sugieren que debería evaluarse la posibilidad de una IDP en pacientes pediátricos con al menos un episodio de ENI sin factores de riesgo identificados.



- 1.- Cuatro o más nuevas infecciones de oído en un año
- 2.- Dos o más infecciones de senos paranasales graves en un año
- 3.- Dos o más meses de tratamiento con antibióticos con escaso efecto
- 4.- Dos o más neumonías en 1 año
- 5.- Dificultad de un niño pequeño para aumentar de peso y crecer normalmente
- 6.- Abscesos en órganos o abscesos cutáneos profundos recurrentes
- 7.- Afta persistentes en la boca o infecciones micóticas en la piel.
- 8.- Necesidad de recibir antibióticos intravenosos para eliminar las infecciones.
- 9.- Dos o más infecciones graves, incluida la septicemia
- 10.- Antecedentes familiares de IDP

**Figura 20. Criterios propuestos por la fundación Jeffrey Modell para sospechar de inmunodeficiencia primaria en pediatría (adaptado de Jeffrey Modell Foundation, <http://www.info4pi.org/>)**

Atendiendo a los criterios propuestos por la fundación Jeffrey Modell para pediatría, debe sospecharse una IDP en todo paciente con al menos dos de los criterios.

La incidencia de IDP en pacientes con ENI grave en el presente estudio coincide con observada en Francia por Gaschignard y colaboradores en 2014 (208). Sin embargo, hay algunas diferencias entre nuestros resultados y los de Gaschignard et al. En nuestro estudio, 5 (62,5%) de los pacientes con ENI hospitalizados en los que se ha diagnosticado una IDP, eran menores de 2 años de edad, mientras que en el estudio realizado en Francia, la incidencia de IDP fue mayor en pacientes mayores de 2 años (208). La incidencia de ENI en niños menores de 2 años es mayor que en los mayores de 2 años (277). Se ha puesto de manifiesto que las alteraciones inmunológicas o factores de predisposición anatómica a ENI son mayores en pacientes con ENI mayores de 5 años, mientras que en menores de 2 años la principal causa, además de posibles factores de riesgo, sería la inmadurez inmunológica (209). No sabemos a qué pueden deberse las diferencias entre el presente estudio y el de Gaschignard et al. Pudieran ser debidas a las diferencias de predisposición a la infección entre las IDP identificadas en ambos estudios. En el estudio de Gaschignard y colaboradores, un 10% (17) de



los 163 niños con ENI grave estudiados presentaban IDP, siendo la principal IDP identificada la deficiencia de anticuerpos (12 pacientes, incluyendo dos pacientes con XLA), seguido de deficiencias en la inmunita innata (2 casos de deficiencia de C2, 1 con deficiencia de C3, 1 con asplenia y otro con deficiencia de Myd88). Aunque las deficiencias de anticuerpos comienzan a manifestarse generalmente tras los 3-6 meses de edad, tras la disminución de la IgG transplacentaria, no es infrecuente que debuten a edades mayores, incluso tras los dos años de vida. En el estudio realizado por los franceses los dos pacientes con XLA se diagnosticaron a los 4 y 7 años. En nuestro estudio el paciente con XLA, con antecedentes familiares, se diagnosticó a los 2 años. La edad media a la que los pacientes desarrollan síntomas relacionados con esta IDP es menor a un año aunque la edad a la que se diagnostica suele ser mayor de los dos años (278,279). La media de edad en un estudio realizado en Estados Unidos con 201 pacientes diagnosticados de XLA fue de 5,37 años, aunque en pacientes con antecedentes familiares la media de edad fue significativamente menor, 2,59 años (279). En un estudio iraní la media de edad a la que se diagnosticaron los pacientes fue similar, 4,32 años (278). La deficiencia de C2 en pacientes de origen europeo es debida, en un 95% de los casos, a una delección de 28pb en el exón 6 del gen. La incidencia de esta IDP es aproximadamente de 1:10.000-1:20.000 en caucásicos (114,115). Sin embargo, el alelo *C2 28-bp DEL* lo encontramos únicamente en heterocigosis en 1 de 285 controles pediátricos de la isla de Gran Canaria (datos obtenidos del apartado 1.1 de los objetivos de esta Tesis Doctoral), una frecuencia alélica observada para *C2 28-bp DEL* de 0,0018, lo que resulta en una frecuencia de homocigotos esperada de  $3,10 \times 10^{-6}$  (0,31:100.000). Los resultados observados en adultos control de la isla de Gran Canaria fueron similares (frecuencia alélica observada de 0,0014). Estos resultados sugieren que la prevalencia de la deficiencia de C2 en Gran Canaria podría ser menor a la estimada en otras poblaciones europeas. La frecuencia alélica descrita en estudios con donantes de sangre suecos (280) y españoles es de 0,007 (281). Mismas frecuencias alélicas (0,007) se han descrito en estudios realizados con controles norteamericanos blancos (132). Muchos pacientes con deficiencia de C2 no parecen presentar infecciones graves, debido a que la VA está intacta y puede activarse C3 (111). Por lo que no es raro que los pacientes debuten, en el caso que lo haga, con susceptibilidad a la infección en edades más avanzadas.

Podría argumentarse que la alta incidencia de IDP entre pacientes con ENI graves en las islas Canarias es debida a la presencia de efectos fundadores. Sin embargo, son varios los argumentos de los que disponemos para poner en duda que el efecto fundador sea el causante principal de la alta incidencia de IDP en este estudio.

En primer lugar, la población de la provincia de Las Palmas de Gran Canaria ha aumentado de 375.227 habitantes en 1950 a 1.100.480 en 2017. Este incremento fue debido a que a partir de los años 60 aumentó el turismo, la migración interna (entre islas), hubo un aumento significativo de inmigración nacional (procedente del continente español) y de población europea y de otras nacionalidades. Como consecuencia, la población extranjera pasó del 1.25% en 1960 al 11.84% en 2017 (datos procedentes del Instituto Nacional de Estadística). Esto no excluye la existencia de efectos fundadores, pero indica que una parte sustancial del acervo genético de la población de las islas Canarias proviene de otras áreas geográficas, aportando diversidad genética.

En segundo lugar, cuatro de los ocho pacientes de este estudio fueron diagnosticados de IDP no asociadas al efecto fundador. Un paciente presentó una inmunodeficiencia con herencia ligada al cromosoma X (XLA), otro una IDP con herencia AD (Síndrome de Charge) y otros anomalías cromosómicas (Di George y trisomía del 16) que se manifiestan en heterocigosis.

Por último, los padres de los pacientes diagnosticados de ATM y trisomía parcial del cromosoma 16 no eran de origen canario y el abuelo del paciente con síndrome de Di George no era canario.

Sin embargo, a pesar de las razones argumentadas, no puede excluirse la existencia de efecto fundador, como parece ocurrir en nuestros dos pacientes con asplenia congénita aislada. En estos pacientes la asplenia congénita no está causada por mutaciones en el gen *RPSA*, causa más frecuente en este tipo de IDP (282), pero ambos son homocigotos para una mutación en un gen para el que no se ha descrito previamente asociación con enfermedad (comunicación personal Casanova JL y Rodríguez Gallego C, artículo en preparación). En estudios previos, nuestro grupo había demostrado que todos los niños con infecciones por micobacterias diseminadas en Gran Canaria tenían una IDP, englobada en el denominado MSMD (283). Esta IDP en algunos de esos pacientes se debía a un efecto fundador por una mutación poco frecuente en el gen *IFNGR1* (cadena 1 del receptor de IFN- $\gamma$ ), IDP que también se diagnosticó en dos pacientes adultos con micobacteriosis diseminada. En otro de los niños estudiados con micobacteriosis y salmonelosis diseminadas, se diagnosticó una deficiencia de la cadena  $\beta 1$  del receptor de la IL-12 (IL-12R $\beta 1$ ), otra etiología de la MSMD, debida a una mutación presente en otros lugares del mundo (284–287); un familiar adulto y un hermano de este familiar fallecido previamente, presentaron infecciones recurrentes por salmonellas debido a la misma IDP (284). De todos modos, la incidencia de IDP observada en nuestro estudio es similar al estudio realizado en todo el territorio francés (208).

Por otra parte, si nos centramos sólo en los pacientes con IDP asociadas a infecciones graves o recurrentes de la isla de Gran Canaria en los que nuestro grupo ha identificado una causa genética, aparte de los ya descritos en pacientes con ENI pediátrica, 21 pacientes han presentado una IDP por mutaciones AD y 13 pacientes por mutaciones AR. Las IDP por mutaciones AD diagnosticadas GOF de *STAT1* (1 paciente), GOF *PSTPIP1* (1), GOF *STAT3* (1), GOF *PI3KR1* (1), *GATA2* (5 pacientes de 3 familias con diferentes mutaciones), *IKZF1* (1), *BTK* (11 pacientes de 4 familias con diferentes mutaciones, uno de ellos extranjero) (288–291 y artículos en preparación). La incidencia de estas IDP es mayor que la de IDP AR con mutaciones en homocigosis (13 pacientes): *TRNT1* (3), *IL-12RB1* (3 pacientes de una familia), *ITGB2* (1), *RFXANK* (1) e *IFNGR1* (5 pacientes de 4 familias debido al efecto fundador previamente comentado) (284–287 y artículos en preparación). Hay que destacar que los 3 pacientes con deficiencia de *TRNT1* son de una familia en la que, al igual que en la paciente con mutaciones en *ITGB2* y los familiares con deficiencia de *IL12RB1*, la causa de la homocigosis fue la presencia de endogamia (como se detecta también en pacientes de otros países) y que los padres del paciente con mutaciones en *RFXANK* son de origen norteafricano, donde existe un efecto fundador para la mutación detectada. Los pacientes con estas mutaciones AD y AR son sólo aquellos con IDP que presentaron infecciones recurrentes o graves, sin incluir a aquellos con enfermedades autoinflamatorias sin susceptibilidad a la infección o aquellos con otras IDP con desregulación inmunológica sin susceptibilidad a la infección. Por otra parte, el número de pacientes con IDP diagnosticadas en nuestro hospital es mucho mayor, pero a la mayoría de los pacientes no se les ha realizado estudios genéticos.

Con los avances de los últimos años en tecnologías de secuenciación masiva y el abaratamiento de estas técnicas, las guías clínicas las están recomendando como una estrategia coste eficaz. En muchos casos pueden evitar una odisea diagnóstica y orientar el tratamiento adecuado, a menudo personalizado y de precisión, que si se realiza ante las primeras manifestaciones de la enfermedad, salvará vidas y mejorará sustancialmente la calidad de vida de los pacientes (273).

Nuestros resultados son reflejo de que la incidencia de las IDP es mucho mayor de lo sospechado hasta hace pocos años. A medida que la existencia de las IDP y su incidencia real sean conocidas por diferentes especialidades médicas, el número de pacientes diagnosticados con estas enfermedades aumentará significativamente. Entre los factores que influirán en el diagnóstico temprano de estos pacientes jugará un papel muy importante el refuerzo de la sospecha diagnóstica. Hasta hace pocos años se consideraba que las IDP eran enfermedades asociadas a infecciones recurrentes, generalmente causadas por microorganismos

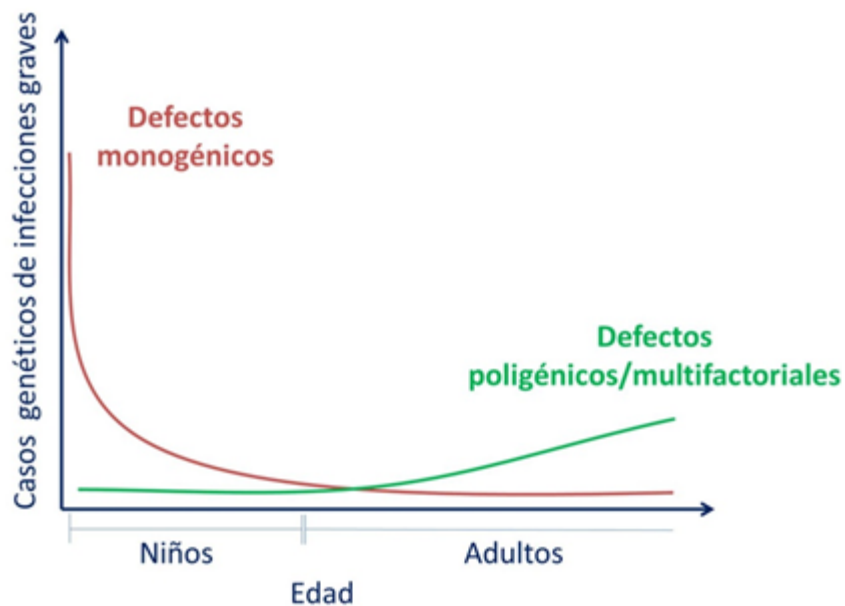
oportunistas. Sin embargo, ya se ha comentado, muchas de ellas presentan también desregulación inmunológica con autoinmunidad, a menudo como primera y/o única manifestación, autoinflamación o cáncer. Muchos especialistas no familiarizados con estas IDP, no tenían tampoco en cuenta que algunos de los pacientes con estas enfermedades pueden presentar un único episodio infeccioso serio. Los ejemplos son ya numerosos. Entre nuestros pacientes pueden citarse las deficiencias de IFNGR1 (dos de ellos adultos) o IL12RB1 (284–287) asociadas a una única infección diseminada por una micobacteria atípica, sin recurrencias, en la mayoría de los pacientes. Otros ejemplos son las deficiencias de GATA2 diagnosticadas en adultos de una familia fallecidos en la pandemia de H1N1 sin infecciones recurrentes previas (291), un paciente adulto previamente sano que falleció por una infección por *Mycobacterium Kansasii* y en otra paciente adulta sana que sufrió una infección fulminante y fatal por virus de Epstein-Bar (resultados pendientes de publicación). Los resultados del presente estudio llevan a sugerir que ante la existencia de una ENI grave en un paciente pediátrico sin factores de riesgo se realice un estudio inmunológico para descartar una IDP, especialmente en pacientes con fallo vacunal. Estos estudios inmunológicos deberían incluir en primera línea un hemograma completo, unas subpoblaciones básicas, medir el nivel de IgG, IgA, IgM e IgE y el análisis funcional de la vía clásica de complemento (incluyendo niveles de C3 y CH50). Además, se recomienda incluir en las exploraciones una ecografía abdominal y un frotis sanguíneo para la detección de cuerpos de Howell-Jolly, para descartar una posible asplenia congénita o asplenia funcional y, en el caso de meningitis, valorar, como se hace en la práctica clínica habitual, una posible fístula del LCR. En determinados casos estará indicado realizar un estudio de la actividad de la vía alternativa de complemento (AP50), especialmente en pacientes con niveles bajos de C3, o el análisis de la señalización de TLRs mediada por MyD88/IRAK-4, especialmente en pacientes con baja respuesta inflamatoria y/o febril o con infecciones recurrentes.

El presente estudio tiene varias limitaciones. Por un lado, no ha sido posible determinar con exactitud el verdadero número de niños con ENI que tenían una IDP, ya no se pudieron incluir en el estudio a los pacientes fallecidos, por lo que estas proporciones podrían incluso ser mayores. Por otro lado, a 34 pacientes (43.6% de los casos con ENI grave) no se les realizó el estudio inmunológico. Según estudios previos realizados, la manifestación clínica más frecuente de ENI relacionada con IDP es la meningitis (208,209). En nuestro estudio fue la neumonía bacteriémica. Estas diferencias podrían deberse a la heterogeneidad en los criterios establecidos para seleccionar a los pacientes con ENI. En el estudio realizado por Gaschignard et al., con un 87% de pacientes con meningitis, un criterio de inclusión fue la hospitalización de

los pacientes, la mayoría incluidos durante o después de la estancia en cuidados intensivos, lo que puede conllevar a un sesgo de la población, con mayor porcentaje de pacientes diagnosticados de meningitis. En otro estudio realizado en Suiza en el que los criterios de inclusión fueron iguales a los del presente estudio, el porcentaje hallado de pacientes con meningitis fue similar (42%) (292). Por otro lado, aunque el Síndrome de Charge es considerado una IDP, los estudios inmunológicos realizados a nuestro paciente (ID 20), incluyendo sus niveles de anticuerpos frente polisacáridos de neumococo y toxoide tetánico fueron normales. No obstante, no hemos realizado el análisis de producción de anticuerpos tras inmunización. En otros pacientes hay una sospecha fundada de que pudieran presentar una inmunodeficiencia, que no ha podido ser demostrada. El paciente con trisomía del cromosoma 21 (ID 13) presentaba infecciones recurrentes. Es sabido que los pacientes con síndrome de Down manifiestan una alta susceptibilidad a infecciones del tracto respiratorio, en parte debido a las alteraciones anatómicas y neurológicas. Además, presentan también una mayor incidencia de autoinmunidad y leucemia, tanto linfocítica como mieloides. Diversos estudios han mostrado que estos pacientes presentan diversas alteraciones inmunológicas, tanto de la inmunidad innata como de la adquirida, entre ellas defectos de generación de linfocitos B de memoria y de producción de anticuerpos, así como desregulación inmunológica. De hecho, en los últimos años se ha propuesto la utilización de profilaxis frente a la infección en estos pacientes. (293–297). En un estudio inicial del paciente los niveles de IgG, IgA e IgM eran normales, aunque presentaba leve linfocitosis y neutropenias. Sin embargo, no pudieron realizarse estudios inmunológicos adicionales debido a que el paciente no pudo ser localizado por traslado de hogar a otra provincia. Otro paciente (ID1), recibió un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) a la edad de 12 años, tras el cual falleció debido a una neumonía neumocócica bacteriémica. El paciente había presentado previamente neumonías recurrentes. Los estudios inmunológicos realizados previo al TPH mostraron una profunda deficiencia de linfocitos T CD4 vírgenes con un defecto de respuesta proliferativa a mitógenos y valores elevados de linfocitos T activados o senescentes (HLA-DR<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>), no pudiendo descartarse que presentara una IDP. Por otra parte, se realizó un estudio de niveles de anticuerpos frente a polisacáridos de neumococo y toxoide tetánico a los pacientes sin factores de riesgo ni IDP diagnosticada. El paciente ID1 presentaba títulos muy bajos de anticuerpos frente a polisacáridos de neumococo aunque, varios de ellos presentaban niveles en el límite de normalidad. Sin embargo, a la mayoría de pacientes no se les realizó un estudio de producción de anticuerpos tras inmunización con polisacáridos no conjugados de neumococo. Por lo que algunos pacientes que presentan una deficiencia de producción de anticuerpos pueden no haber sido diagnosticados (298,299). Los valores de IgG frente a

polisacáridos de neumococo se midieron con un ensayo que mira la IgG total frente a los 23 serotipos incluidos en la vacuna de polisacáridos no conjugados de neumococo. Sin embargo, estos valores fueron determinados en adultos antes de la introducción de la vacuna conjugada y su idoneidad es discutible. Además, unos valores normales no excluyen una producción anómala de anticuerpos frente a polisacáridos de neumococo (300–303). Para identificar a los individuos con una pobre respuesta frente a polisacáridos de neumococo, la Organización Mundial de la Salud establece que debe realizarse la determinación frente a varios polisacáridos individuales, una técnica no realizada actualmente en ningún laboratorio español. Por último, debe tenerse en cuenta que, como se ha comentado previamente, en los últimos años, gracias en gran parte a las nuevas técnicas de estudios exómicos y genómicos, se han identificado muchas IDP que predisponen a uno o pocos microorganismos, en ocasiones con un único episodio infeccioso grave y, en ocasiones, con una penetrancia clínica parcial (227). De hecho, desde el inicio de estudios exómicos diagnósticos, hace aproximadamente 10 años, el número de defectos genéticos causantes de IDP ha pasado unos 150 en 2009 a más de 400 en 2019 (227). Muchos de las IDP descritas no manifiestan alteraciones inmunológicas en los estudios inmunológicos y hematológicos habituales. La realización de estos estudios podría revelar una incidencia incluso mayor a la observada en nuestro estudio.

Los resultados obtenidos podrían ser debidos a que las infecciones primarias en niños son el resultado de variaciones de alta penetrancia en un solo gen (monogénicas), mientras que en adultos son consecuencia de una herencia compleja debida a variaciones poligénicas (**figura 21**) (304); siempre teniendo en cuenta que, tanto en niños como adultos, hay comorbilidades que pueden predisponer *per se* a la infección, aún en ausencia de variantes genéticas de predisposición. Es el caso de pacientes con IDP debidas a defectos del complemento o con agammagolulinemia. Hay incluso IDP con una muy alta susceptibilidad a infección neumocócica fatal en edad pediátrica que prácticamente no presentan infecciones graves en edad adulta, como es el caso son las deficiencias de IRAK4 y Myd88 (305,306). Se cree que el desarrollo de la inmunidad adquirida frente al neumococo vaya compensando gradualmente los defectos congénitos de la inmunidad innata. Por otro lado, en adultos, además de una herencia poligénica y la presencia de comorbilidades que pueden acentuar efectos genéticos menores, o de baja penetrancia, puede haber alteraciones genéticas somáticas y epigenéticas, además del conocido efecto de la inmunosenescencia, que pueden provocar un deterioro progresivo de la inmunidad (**figura 21**).



**Figura 21. Modelo genético dependiente de la edad en enfermedades infecciosas graves (adaptado de Alexandre Alcaï y colaboradores, (304))**

Este modelo sugiere que en niños las enfermedades infecciosas graves vienen marcadas por variantes monogénicas (de un solo gen) no mendelianas con penetrancia incompleta. Mientras que, en adultos, la predisposición a enfermedades infecciosas es consecuencia de múltiples factores: variantes poligénicas (varios genes), procesos somáticos y epigenéticos.

En resumen, los presentes resultados, junto con los de estudios previos, sugieren que se debería descartar una IDP (y también secundaria) a todos los pacientes con edad pediátrica hospitalizados por ENI grave aunque no presenten un historial de infecciones recurrentes, al menos en aquellos que no presenten factores de riesgo. La identificación temprana de una inmunodeficiencia y la instauración del tratamiento adecuado permitiría mejorar la calidad de vida y disminuir el riesgo de mortalidad de los pacientes afectados.

### **3. Análisis del posible efecto causal de la inmunodeficiencia primaria producida por la deficiencia de MASP-2**

En el tercer objetivo de la presente Tesis Doctoral propone determinar el posible efecto causal de la IDP producida por la deficiencia de MASP-2 debido a la homocigosis para la variante p.D120G (MASP-2<sub>120G</sub>). Para se realizó un exhaustivo estudio de asociación en pacientes con NAC, ENI o LES, y controles (tanto niños como adultos).

Además de los tres individuos sanos con deficiencia de MASP-2 descritos en investigaciones previas (90,91), se detectó otro caso de deficiencia de MASP-2. Se trata de un individuo de 12 años de edad que, hasta el momento del estudio, no había presentado infecciones graves ni recurrentes, ni enfermedades inflamatorias o autoinmunes, ni ningún otro trastorno relevante.

Los estudios en modelos animales han aportado información crucial para el conocimiento del sistema inmunológico, pero hay muchos ejemplos de resultados contradictorios entre los modelos murinos y el estudio de pacientes con el mismo defecto inmunológico. El estudio de pacientes con IDP es una importante fuente de información para conocer la relevancia de las moléculas afectadas en el humano en condiciones naturales (307). El primer caso de deficiencia de MASP-2 fue descrito en 2003 por Stengaard-Pedersen y colaboradores (213). En esa publicación sugirieron que se trataba de un nuevo defecto monogénico subyacente a una inmunodeficiencia AR que predispone a infecciones graves y a autoinmunidad. Sin embargo, es importante resaltar que este individuo también mostraba niveles séricos de C1q muy bajos (con presencia de autoanticuerpos anti-C1q), de C3 y C4, al que se sumaba un profundo defecto de la actividad de las vías alternativa y clásica de complemento. Estas deficiencias, probablemente secundarias al LES que tenía el paciente, explicarían por sí solas la susceptibilidad a la infección. Este paciente se identificó cuando los sueros de 125 pacientes con sospecha de IDP se analizaron con el fin de determinar la deficiencia de actividad de la VL dependiente de MBL (213,221). Diez pacientes adicionales, homocigotos en p.D120G, MASP-2<sub>120G</sub>, (tres niños y siete adultos), con un rango heterogéneo de enfermedades (no todas infecciosas o autoinmunes), fueron identificados posteriormente en el contexto de estudios genéticos de asociación (69,118,215–220) (**tabla 30**).

Sin embargo, también se han identificado nueve individuos sanos homocigotos para MASP-2<sub>120G</sub>, (dos niños y siete adultos) al realizar estudios de asociación genética (119,217,220,222,224), incluyendo los 3 individuos adultos descritos previamente por nuestro grupo (90,91) y el niño identificado en el presente estudio (223) (**tabla 36**). Nuestro grupo ya



había sugerido que la deficiencia de MASP-2 podría presentar una baja penetrancia (120,308). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la deficiencia de MASP-2 no cumple la premisa de que, para establecer una relación causal entre un genotipo y un fenotipo clínico, el genotipo no debe estar presente en individuos sanos (309). Es cierto que algunas IDP muestran una penetrancia incompleta y en estudios familiares se han identificado individuos sanos con genotipos causales. En cualquier caso, la penetrancia incompleta es la excepción que confirma la regla en la mayoría de las IDP, especialmente en aquellas con herencia AR (307).

Desde 2004, la deficiencia de MASP-2 se ha incluido en la clasificación de IDP como una deficiencia del complemento asociada a una alta susceptibilidad a las infecciones piógenas recurrentes, así como a enfermedad pulmonar inflamatoria y a autoinmunidad (121,214,310). Las deficiencias de C1q, C2 y C4 también han sido incluidas como IDP pero, en este caso, con una baja susceptibilidad a la infección piógena y al LES. Esto parece paradójico, ya que aproximadamente el 50% de los individuos con deficiencia de C1q presentan infecciones significativas por bacterias encapsuladas, alrededor del 50% de las personas con deficiencia de C2 presentan infecciones invasivas, especialmente por neumococo y el 76% de los pacientes con deficiencia de C4 sufren infecciones respiratorias recurrentes, incluidas neumonía y meningitis (109,116,311,312). Del mismo modo, el 80-95%, 25% y 76% de los individuos con deficiencia de C1q, C2 y C4 respectivamente, son diagnosticados de LES, y otro 18% de los pacientes con deficiencia de C2 sufren vasculitis o enfermedad indiferenciada del tejido conectivo (109,116,311,312).

Varias deficiencias de otros componentes de la VL pueden esclarecer el papel de la deficiencia de MASP-2, y de las deficiencias de la VL en general, en la susceptibilidad a infecciones y a enfermedades autoinmunes. La deficiencia de MBL se incluyó inicialmente en la clasificación de IDP como una deficiencia del complemento asociada a las infecciones piógenas, aunque se hacía constar que el nivel de penetrancia era muy bajo (214). Más del 5% de los individuos de la mayoría de poblaciones presentan una completa deficiencia MBL, debida principalmente a la homocigosidad o heterocigosidad compuesta de tres mutaciones comunes en el exón 1 del gen *MBL2* (estas mutaciones originan los alelos variantes conocidos como D, B y C) (98). De hecho, se ha propuesto incluso que, las altas frecuencias observadas a nivel mundial de estos alelos mutantes relacionados con las bajas concentraciones séricas de MBL, pueden deberse a una deriva genética, lo cual pone de manifiesto la neutralidad evolutiva de *MBL2* (313). Estos datos sugieren que la MBL podría ser redundante en las defensas humanas (307,313). A medida que se realizaron estudios más exhaustivos, se obtuvieron resultados contradictorios sobre el papel de la deficiencia de la MBL en la

predisposición a las infecciones graves, especialmente en la sepsis grave y en la infección meningocócica y neumocócica (51,55,317,68,98,122,123,307,314–316). Por lo tanto, aunque no se puede descartar su papel como factor modificador, los resultados sugieren que la deficiencia de MBL es principalmente asintomática. De hecho, en la actualización de 2011 sobre la clasificación de IDPs ésta ya no fue incluida (318).

La colectina-11 humana y murina, pero no la MBL, induce la activación de la VL en la superficie de *S.pneumoniae* y otras bacterias y, además, aumenta la opsonofagocitosis (319–322). Los pacientes con deficiencia AR de colectina-11 o -10 padecen el síndrome de Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevalle (3MC), que se caracteriza por defectos craneofaciales, genitales y a menudo mentales. Sin embargo, los pacientes con deficiencia de colectina-11 y 10, que carecen de la secreción de colectina-11 o -10, no manifiestan una predisposición a la infección, autoinmunidad u otro fenotipo inmunológico (321,323–326). Las mutaciones en el gen *MASP1* también han sido identificadas en pacientes con síndrome 3MC (321,323,325,327,328). El gen *MASP1* codifica, mediante procesamiento alternativo del mRNA, tres productos: las proteasas de serina MASP-1 y MASP-3, y la proteína MAP-1 (también conocido como Map-44) que comparte con las anteriores los ocho primeros exones. Sin embargo, los dominios de serina-proteasa de MASP-1 (exones 13-18) y MASP-3 (exón 12) están codificados por diferentes exones mientras que MAP-1 no tiene dominio serina-proteasa (98–100). La mayoría de las mutaciones en *MASP1* en pacientes con síndrome de 3MC se encuentran en el exón 12, exclusivo de MASP-3. Sin embargo, en nueve pacientes se ha descrito que las mutaciones alteran los tres productos proteicos (325–328). No obstante, no se documentó ningún fenotipo infeccioso o autoinmune en estos pacientes a pesar de la nula actividad de la VL debido a la ausencia de MASP-1 (328,329).

El primer paciente con deficiencia de ficolina-3 se describió en 2009, al medir los niveles de ficolina-3 en un gran número de pacientes con sospecha de inmunodeficiencia (330). El paciente era un adulto con infecciones recurrentes del tracto respiratorio y abscesos cerebrales. Sin embargo, se había sometido a una esplenectomía a los 20 años de edad debido a una trombocitopenia, tenía una deficiencia parcial de IgM y una baja respuesta a la vacuna neumocócica polisacárida. La deficiencia de ficolina-3 la ocasionó una mutación que se estima que ocurre en homocigosidad en 1:10.000 individuos. Tras la descripción de este paciente, la deficiencia de ficolina-3 también se consideró una IDP asociada a una alta susceptibilidad a infecciones piógenas recurrentes y a abscesos (121,311). Posteriormente, al llevar a cabo estudios de asociación, se describieron otros seis pacientes con gran heterogeneidad en sus manifestaciones clínicas, así como un control sano con la deficiencia de ficolina-3

(125,331,332). Además, recientemente se ha sugerido que la deficiencia de ficolina-3 está asociada a la predisposición a LES (331). Sin embargo, el primer paciente descrito fue posteriormente diagnosticado del síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS, con confirmación genética) (98). La deficiencia de IgM y de producción de anticuerpos frente a antígenos polisacáridos era por lo tanto la consecuencia del WAS. Por otra parte, la esplenectomía en ese paciente fue muy probablemente debida a la microtrombocitopenia que presentan los pacientes con WAS. Esta IDP, el WAS, explicaría por sí sola las infecciones que presentaba el paciente, independientemente de la deficiencia de ficolina-3.

Se estima que la deficiencia de MASP-2 debido a la homocigosidad en p.D120G ocurre aproximadamente entre 7 (en el presente estudio) y 15 por cada 10.000 individuos de origen europeo (118,119). Esta frecuencia haría que la deficiencia de MASP-2 fuese la segunda IDP más común después de la deficiencia de IgA, siempre que la deficiencia de MBL no se considere una IDP. En conclusión, tanto la deficiencia de MASP-2, como la deficiencia de MBL, parecen ser una simple consecuencia de un polimorfismo común. Sin embargo, no se puede descartar el papel de la deficiencia de MASP-2 como un posible modificador de la enfermedad en individuos con inmunodeficiencias hereditarias adicionales o en pacientes con enfermedades subyacentes que alteran los mecanismos de defensa inmunológica (98). Siendo ortodoxos, tampoco se puede descartar que algunos de los individuos con deficiencia de MASP-2, incluso los controles sanos adultos, aún no hayan manifestado el fenotipo de la enfermedad. En cualquier caso, el estado de salud se evaluó en al menos cuatro individuos sanos de 19 (222), 29 (217), 37 (91) y 39 (91) años. Cabe destacar que la mujer control sana de 37 años, miembro del personal del hospital (91), actualmente tiene 51 años y continúa estando sana.

Por el contrario, un exceso de activación de la VL también puede ser perjudicial debido a la posibilidad de que se produzca una respuesta proinflamatoria exacerbada y daños adicionales en el individuo. De hecho, la VL, en especial MASP-2, puede comportarse como un arma de doble filo y ser incluso perjudicial en enfermedades graves como infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, daños por isquemia-reperfusión renal y artritis reumatoide (99,100,321,333). Curiosamente, altos niveles de MASP-2 pueden contribuir a una mayor gravedad de la meningitis neumocócica (334). Debido a la baja frecuencia de la variante estudiada, nuestro estudio carece de poder estadístico para evaluar su asociación con la gravedad de la NAC o la ENI (51).

Nuestro estudio tiene varias limitaciones, además de la mencionada anteriormente. La mayoría de las personas en el grupo de NAC sufrieron un único episodio neumónico y, por lo

tanto, no representa una cohorte de IDP. Además, los pacientes con un diagnóstico previo de IDP fueron excluidos de nuestro estudio, y los estudios genéticos o inmunológicos dirigidos al diagnóstico de IDP no se llevaron a cabo en la mayoría de los pacientes y controles, especialmente en adultos.

Una vez que se sospecha una IDP en un paciente, es importante llevar a cabo un diagnóstico molecular confirmativo, ya que puede ayudar a tomar decisiones sobre el manejo, informar sobre el pronóstico y acerca de las medidas profilácticas a adoptar. Sin embargo, la evidencia acumulada hasta la fecha sugiere que MASP-2, e incluso otros componentes de la VL, son en gran medida redundantes en las defensas humanas frente a la infección y que los individuos con deficiencia de MASP-2 no parecen ser particularmente propensos a enfermedades infecciosas o autoinmunes. No obstante, se requiere llevar a cabo estudios con gran número de individuos para poder determinar con mayor seguridad si la deficiencia de MASP-2 influye en la susceptibilidad a la infección en individuos con otros defectos primarios o secundarios en los componentes del sistema inmune.



# **VII. CONCLUSIONES**

---



## CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y discutidos previamente, se puede concluir que:

- 1.1. El alelo rs2230199-C ( $C3_{102R}$ ) del gen *C3* se asocia a una mayor susceptibilidad a NNAC en adultos, especialmente NNAC en adultos.
- 1.2. El alelo rs547154-T del gen *C2*, en completo desequilibrio de ligamiento con la variante  $fB_{R32Q}$  (rs641153-A), se asocia a una mayor susceptibilidad a NNAC en adultos.
- 1.3. Los resultados confirman la hipótesis previamente planteada de que las variantes de baja actividad de complemento rs547154-T del gen *C2*, en completo desequilibrio de ligamiento con la variante  $fB_{R32Q}$  (rs641153-A) y rs2230199-C ( $C3_{102R}$ ) del gen *C3*, que se han asociado a un papel protector frente a enfermedades inflamatorias mediadas por complemento, se asocian a su vez a un mayor riesgo de desarrollar NAC, en particular NNAC. El sistema del complemento es por tanto un arma de doble filo: un sistema poco activo favorece el riesgo de infección (NNAC), mientras que un sistema de complemento activado predispone a enfermedades inflamatorias.
- 1.4. Las deficiencias de *C4A* y de *C4B*, así como las variaciones del número de copias de *C4*, *C4A*, *C4B*, *C4S* o *C4L* no se asocia con predisposición a NAC ni NNAC en adultos.
  - 2.1. Entre un 10% (si se atiende al total de casos) y un 18% (si se atiende a los casos que se han podido estudiar) de los pacientes pediátricos que han requerido hospitalización por una ENI han sido diagnosticados de una inmunodeficiencia primaria.
  - 2.2. La presencia de una ENI grave en un niño, debe hacernos evaluar la posibilidad de una IDP aunque el paciente no cumpla los criterios clásicamente utilizados de sospecha de IDP.



- 3.1. La deficiencia de MASP-2 debida a la homocigosidad para la mutación no se ha asociado con la susceptibilidad a lupus eritematoso sistémico ni a NAC en adultos o ENI pediátrica.
- 3.2. Se describe otro caso deficiencia de MASP-2 debido a la homocigosidad de p.D120G en un individuo sano de edad pediátrica.
- 3.3. Los resultados obtenidos sugieren que la deficiencia de MASP-2 no es por sí sola una IDP o, que su penetrancia clínica sería muy baja.

# **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

---



1. Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, Porat N, Shainberg B, Pinco E, et al. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* by Adults and Children in Community and Family Settings. *Clin Infect Dis* . 2004 Mar 1;38(5):632–9. <https://doi.org/10.1086/381547>
2. Mackenzie GA, Leach AJ, Carapetis JR, Fisher J, Morris PS. Epidemiology of nasopharyngeal carriage of respiratory bacterial pathogens in children and adults: cross-sectional surveys in a population with high rates of pneumococcal disease. *BMC Infect Dis* . 2010;10(1):304. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-304>
3. Yahiaoui RY, den Heijer CDJ, van Bijnen EME, Paget WJ, Pringle M, Goossens H, et al. Prevalence and antibiotic resistance of commensal *Streptococcus pneumoniae* in nine European countries. *Future Microbiol*. 2016 May 18;11(6):737–44.
4. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(6):355–67.
5. Loughran AJ, Orihuela CJ, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. *Microbiol Spectr*. 2019 Mar;7(2):10.1128/microbiolspec.GPP3-0004–2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30873934>
6. Marks LR, Reddinger RM, Hakansson AP. Biofilm Formation Enhances Fomite Survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. Pirofski L, editor. *Infect Immun* . 2014 Mar 1;82(3):1141 LP – 1146.
7. Brooks LRK, Mias GI. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: Aging, diagnostics, and prevention. *Front Immunol*. 2018;9:1366.
8. Chao Y, Marks LR, Pettigrew MM, Hakansson AP. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015 Jan 13;4:194. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25629011>
9. World Health Organization. The top 10 causes of death. 2018. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
10. Maraqa NF. Pneumococcal infections. *Pediatr Rev*. 2014;35(7):299–310.
11. Troeger C, Blacker B, Khalil IA, Rao PC, Cao J, Zimsen SRM, et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis*. 2018 Nov 1;18(11):1191–210.
12. Atkinson W, Hamborsky J WS. Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine- Preventable Diseases*. 12th ed. DC W, editor. Public Health Foundation; 2012.
13. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009;374(9693):893–902.
14. World Health Organization. World Pneumonia Day. 017. <http://www.who.int/life-course/news/events/2017-world-pneumonia-%0Aday/en/>
15. Drijkoningen JJC, Rohde GGU. Pneumococcal infection in adults: burden of disease. *Clin*

- Microbiol Infect. 2014;20(s5):45–51.
16. Zhang X, Wu X, Nong G. Update on protracted bacterial bronchitis in children. *Ital J Pediatr*. 2020;46(1):38. <https://doi.org/10.1186/s13052-020-0802-z>
  17. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016 Oct 8;388(10053):1459–544.
  18. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009 Oct 31;374(9700):1543–56. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61114-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61114-4)
  19. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Trop Med Int Heal*. 2020 Mar 1;25(3):278–80. <https://doi.org/10.1111/tmi.13383>
  20. Niederman MS. Guidelines for the Management of Community-Acquired Pneumonia: Current Recommendations and Antibiotic Selection Issues. *Med Clin North Am*. 2001;85(6):1493–509.
  21. Said MA, Johnson HL, Nonyane BAS, Deloria-Knoll M, O’Brien KL, Andreo F, et al. Estimating the burden of pneumococcal pneumonia among adults: a systematic review and meta-analysis of diagnostic techniques. *PLoS One*. 2013;8(4):e60273.
  22. Rozenbaum MH, Pechlivanoglou P, van der Werf TS, Lo-Ten-Foe JR, Postma MJ, Hak E. The role of *Streptococcus pneumoniae* in community-acquired pneumonia among adults in Europe: a meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2013 Mar;32(3):305–16.
  23. Adegbola RA, Falade AG, Sam BE, Aidoo M, Baldeh I, Hazlett D, et al. The etiology of pneumonia in malnourished and well-nourished Gambian children. *Pediatr Infect Dis J*. 1994 Nov;13(11):975–82.
  24. Orihuela CJ, Tuomanen E. *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. *Gram-Positive Pathog Second Ed*. 2014;7(2):253–67.
  25. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, Barrett NL, Pass M, Lexau C, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA*. 2001 Apr;285(13):1729–35.
  26. Sonko MA, Dube FS, Okoi CB, Diop A, Thiongane A, Senghore M, et al. Changes in the Molecular Epidemiology of Pediatric Bacterial Meningitis in Senegal After Pneumococcal Conjugate Vaccine Introduction. *Clin Infect Dis*. 2019 Sep 5;69(Supplement\_2):S156–63.
  27. Beral AC, Harris D, Dela Cruz CS, Possick JD. Pneumococcal Vaccination Strategies. An Update and Perspective. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Jun;13(6):933–44.
  28. Lundbo LF, Benfield T. Risk factors for community-acquired bacterial meningitis. *Infect Dis (Auckl)*. 2017;49(6):433–44.

29. Cruickshank HC, Jefferies JM, Clarke SC. Lifestyle risk factors for invasive pneumococcal disease: a systematic review. *BMJ Open*. 2014 Jun 1;4(6):e005224.
30. Centers for Disease Control and Prevention. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, *Streptococcus pneumoniae*. 2016.
31. Calbo E, Garau J. Factors affecting the development of systemic inflammatory response syndrome in pneumococcal infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24(3):241–7.
32. de St Maurice A, Schaffner W, Griffin MR, Halasa N, Grijalva CG. Persistent Sex Disparities in Invasive Pneumococcal Diseases in the Conjugate Vaccine Era. *J Infect Dis*. 2016;214(5):792–7.
33. van Aalst M, Lötsch F, Spijker R, van der Meer JTM, Langendam MW, Goorhuis A, et al. Incidence of invasive pneumococcal disease in immunocompromised patients: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis*. 2018;24:89–100.
34. Sohail I, Ghosh S, Mukundan S, Zelewski S, Khan MN. Role of Inflammatory Risk Factors in the Pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. Vol. 9, *Frontiers in Immunology* . 2018. p. 2275.
35. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine for adults with immunocompromising conditions: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2012;61(40):816-819.
36. Casanova J-L. Human genetic basis of interindividual variability in the course of infection. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Dec 22;112(51):E7118 LP-E7127.
37. Alcaïs A, Abel L, Casanova J-L. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J Clin Invest*. 2009 Sep 1;119(9):2506–14.
38. Sørensen TIA, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and Environmental Influences on Premature Death in Adult Adoptees. *N Engl J Med*. 1988 Mar 24;318(12):727–32. <https://doi.org/10.1056/NEJM198803243181202>
39. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol*. 2020;40(1):24–64. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00737-x>
40. Casanova J-L, Abel L. Inborn errors of immunity to infection: the rule rather than the exception. *J Exp Med*. 2005 Jul 18;202(2):197–201.
41. Esteve-Solé A, Sologuren I, Martínez-Saavedra MT, Deyà-Martínez À, Oleaga-Quintas C, Martínez-Barricarte R, et al. Laboratory evaluation of the IFN- $\gamma$  circuit for the molecular diagnosis of Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2018;55(3):184–204.
42. Mayilyan KR. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. *Protein Cell*. 2012;3(7):487–96.
43. Lugo Reyes SO, Suarez F, Herbigneaux RM, Pacquement H, Réguerre Y, Rivire JP, et al.

- Hodgkin lymphoma in 2 children with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(2):543-544.e3.
44. Picard C, Puel A, Bustamante J, Ku C-L, Casanova J-L. Primary immunodeficiencies associated with pneumococcal disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3(6):451–9.
  45. Picard C, Casanova JL, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I $\kappa$ B $\alpha$  deficiency. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(3):490–7.
  46. Weller S, Bonnet M, Delagreverie H, Israel L, Chrabieh M, Maródi L, et al. IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-4–, MyD88–, and TIRAP– but not UNC-93B–deficient patients. *Blood*. 2012 Dec 13;120(25):4992–5001.
  47. Maglione PJ, Simchoni N, Black S, Radigan L, Overbey JR, Bagiella E, et al. IRAK-4 and MyD88 deficiencies impair IgM responses against T-independent bacterial antigens. *Blood*. 2014 Dec 4;124(24):3561–71. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-587824>
  48. Sanders MS, van Well GTJ, Ouburg S, Morré SA, van Furth AM. Genetic variation of innate immune response genes in invasive pneumococcal and meningococcal disease applied to the pathogenesis of meningitis. *Genes Immun*. 2011;12(5):321–34.
  49. Kloek AT, Brouwer MC, van de Beek D. Host genetic variability and pneumococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med Genomics* . 2019;12(1):130. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0572-x>
  50. Martín-Loeches I, Solé-Violán J, Rodríguez de Castro F, García-Laorden MI, Borderías L, Blanquer J, et al. Variants at the promoter of the interleukin-6 gene are associated with severity and outcome of pneumococcal community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med* . 2012;38(2):256–62. <https://doi.org/10.1007/s00134-011-2406-y>
  51. Garcia-Laorden MI, Sole-Violan J, de Castro FR, Aspa J, Briones ML, Garcia-Saavedra A, et al. Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(2).
  52. Solé-Violán J, Rodríguez de Castro F, García-Laorden MI, Blanquer J, Aspa J, Borderías L, et al. Genetic variability in the severity and outcome of community-acquired pneumonia. *Respir Med*. 2010 Mar 1;104(3):440–7.
  53. Solé-Violán J, García-Laorden MI, Marcos-Ramos JA, Rodríguez de Castro F, Rajas O, Borderías L, et al. The Fc $\gamma$  receptor IIA-H/H131 genotype is associated with bacteremia in pneumococcal community-acquired pneumonia. *Crit Care Med*. 2011;39(6).
  54. García-Laorden Mi, Rodríguez de Castro F, Solé-Violán J, Rajas O, Blanquer J, Borderías L, et al. Influence of genetic variability at the surfactant proteins A and D in community-acquired pneumonia: a prospective, observational, genetic study. *Crit Care*. 2011;15(1):R57. <https://doi.org/10.1186/cc10030>
  55. García-Laorden MI, Rodríguez De Castro F, Solé-Violán J, Payeras A, Briones ML, Borderías L, et al. The role of mannose-binding lectin in pneumococcal infection. *Eur Respir J*. 2013;41(1):131–9.

56. Ellis MK, Elliott KS, Rautanen A, Crook DW, Hill AVS, Chapman SJ. Rare Variants in MYD88, IRAK4 and IKBKG and Susceptibility to Invasive Pneumococcal Disease: A Population-Based Case-Control Study. *PLoS One*. 2015 Apr 17;10(4):e0123532.
57. Carrasco-Colom J, Jordan I, Alsina L, Garcia-Garcia J-J, Cambra-Lasaosa FJ, Martín-Mateos MA, et al. Association of Polymorphisms in IRAK1, IRAK4 and MyD88, and Severe Invasive Pneumococcal Disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(9).
58. Lees JA, Ferwerda B, Kremer PHC, Wheeler NE, Serón MV, Croucher NJ, et al. Joint sequencing of human and pathogen genomes reveals the genetics of pneumococcal meningitis. *Nat Commun*. 2019;10(1):1–14.
59. Lundbo LF, Harboe ZB, Clausen LN, Hollegaard M V., Sørensen HT, Hougaard DM, et al. Genetic Variation in NFKBIE Is Associated With Increased Risk of Pneumococcal Meningitis in Children. *EBioMedicine*. 2016;3:93–9.
60. Ferwerda B, Valls Serón M, Jongejan A, Zwinderman AH, Geldhoff M, van der Ende A, et al. Variation of 46 Innate Immune Genes Evaluated for their Contribution in Pneumococcal Meningitis Susceptibility and Outcome. *EBioMedicine*. 2016;10:77–84.
61. Sanders, MS., Van Well, G.T., Ouburg, S., Lundberg, P.S., Van Furth, A.M., Morré, S.A. Single nucleotide polymorphisms in TLR9 are highly associated with susceptibility to bacterial meningitis in children. *Clin Infect Dis*. 2011;52(4):475–80.
62. Gowin E, Świątek-Kościelna B, Kałużna E, Strauss E, Wysocki J, Nowak J, et al. How many single-nucleotide polymorphisms (SNPs) must be tested in order to prove susceptibility to bacterial meningitis in children? Analysis of 11 SNPs in seven genes involved in the immune response and their effect on the susceptibility to bacterial men. *Innate Immun*. 2018;24(3):163–70.
63. Verhein KC, Vellers HL, Kleeberger SR. Inter-individual variation in health and disease associated with pulmonary infectious agents. *Mamm Genome*. 2018;29(1–2):38–47.
64. Davila S, Wright VJ, Khor CC, Sim KS, Binder A, Breunis WB, et al. Genome-wide association study identifies variants in the CFH region associated with host susceptibility to meningococcal disease. *Nat Genet*. 2010;42(9):772–8.
65. Kloek AT, van Setten J, van der Ende A, Bots ML, Asselbergs FW, Serón MV, et al. Exome Array Analysis of Susceptibility to Pneumococcal Meningitis. *Sci Rep* . 2016;6(1):29351.
66. Valls Serón M, Ferwerda B, Engelen-Lee J, Geldhoff M, Jaspers V, Zwinderman AH, et al. V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (AKT3) contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol Commun* . 2016;4(1):50.
67. Rautanen A, Pirinen M, Mills TC, Rockett KA, Strange A, Ndungu AW, et al. Polymorphism in a lincRNA Associates with a Doubled Risk of Pneumococcal Bacteremia in Kenyan Children. *Am J Hum Genet*. 2016 Jun 2;98(6):1092–100.
68. Bautista-Rodriguez C, Launes C, Jordan I, Andres M, Arias MT, Lozano F, et al. Mannose-binding lectin-deficient genotypes as a risk factor of pneumococcal meningitis in infants. *PLoS One*. 2017;12(5):1–9.



69. Siljan WW, Holter JC, Nymo SH, Husebye E, Ueland T, Skattum L, et al. Low levels of immunoglobulins and mannose-binding lectin are not associated with etiology, severity, or outcome in community-acquired pneumonia. *Open Forum Infect Dis.* 2018;5(2):1–7.
70. Beltrame MH, Boldt ABW, Catarino SJ, Mendes HC, Boschmann SE, Goeldner I, et al. MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases. *Mol Immunol.* 2015;67(1):85–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.245>
71. Bouglé A, Max A, Mongardon N, Grimaldi D, Pène F, Rousseau C, et al. Protective Effects of FCGR2A Polymorphism in Invasive Pneumococcal Diseases. *Chest.* 2012;142(6):1474–81.
72. Yuan FF, Marks K, Wong M, Watson S, de Leon E, McIntyre PB, et al. Clinical relevance of TLR2, TLR4, CD14 and FcγRIIA gene polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol.* 2008 Mar 1;86(3):268–70.
73. Jedrzejewski MJ. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001 Jun 1;65(2):187 LP – 207.
74. Brown EJ, Joiner KA, Cole RM, Berger M. Localization of complement component 3 on *Streptococcus pneumoniae*: anti-capsular antibody causes complement deposition on the pneumococcal capsule. *Infect Immun.* 1983 Jan 1;39(1):403 LP – 409.
75. Lo SW, Gladstone RA, van Tonder AJ, Hawkins PA, Kwambana-Adams B, Cornick JE, et al. Global Distribution of Invasive Serotype 35D *Streptococcus pneumoniae* following Introduction of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. *J Clin Microbiol.* 2018;56(7):e00228-18.
76. Swiatlo E, Champlin FR, Holman SC, Wilson WW, Watt JM. Contribution of Choline-Binding Proteins to Cell Surface Properties of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2002;70(1):412-5.
77. Andre GO, Converso TR, Politano WR, Ferraz LFC, Ribeiro ML, Leite LCC, et al. Role of *Streptococcus pneumoniae* Proteins in Evasion of Complement-Mediated Immunity. *Front Microbiol.* 2017 Feb 20;8:224.
78. van den Broek B, de Jonge MI, et al. *Streptococcus pneumoniae* PspC Subgroup Prevalence in Invasive Disease and Differences in Contribution to Complement Evasion. 2018;86(4):e00010-18.
79. Li J, Glover DT, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. PspA and PspC minimize immune adherence and transfer of pneumococci from erythrocytes to macrophages through their effects on complement activation. *Infect Immun.* 2007;75(12):5877–85.
80. Kerr AR, Paterson GK, McCluskey J, et al. The contribution of PspC to pneumococcal virulence varies between strains and is accomplished by both complement evasion and complement-independent mechanisms. *Infect Immun.* 2006;74(9):5319-5324.
81. Hotomi M, Yuasa J, Briles DE, Yamanaka N. Pneumolysin plays a key role at the initial step of establishing pneumococcal nasal colonization. *Folia Microbiol (Praha).* 2016;61(5):375–83.
82. Gutiérrez-Fernández J, Saleh M, Alcorlo M, Gómez-Mejía A, Pantoja-Uceda D, Treviño

- MA, et al. Modular Architecture and Unique Teichoic Acid Recognition Features of Choline-Binding Protein L (CbpL) Contributing to Pneumococcal Pathogenesis. *Sci Rep*. 2016;6(1):38094. <https://doi.org/10.1038/srep38094>
83. Dessing MC, Schouten M, Draing C, Levi M, von Aulock S, van der Poll T. Role Played by Toll-Like Receptors 2 and 4 in Lipoteichoic Acid—Induced Lung Inflammation and Coagulation. *J Infect Dis*. 2008 Jan 15;197(2):245–52. <https://doi.org/10.1086/524873>
84. Yatim KM, Lakkis FG. A Brief Journey through the Immune System. *Clin J Am Soc Nephrol* . 2015 Jul 7;10(7):1274 LP – 1281.
85. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(1):4–9.
86. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):227–35. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>
87. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* . 2015;16(4):343–53. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>
88. den Haan JMM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett*. 2014;162(2, Part B):103–12.
89. Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule Enhances Pneumococcal Colonization by Limiting Mucus-Mediated Clearance. *Infect Immun*. 2007 Jan 1;75(1):83 LP – 90.
90. Paterson GK, Mitchell TJ. Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology*. 2006;152(2):285–93.
91. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):8869–72.
92. Lachmann P. Complement before molecular biology. *Mol Immunol*. 2006;43(6):496–508.
93. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part II: Role in immunity. *Front Immunol*. 2015;6(MAY):1–26.
94. Schmidt CQ, Lambris JD, Ricklin D. Protection of host cells by complement regulators. *Immunol Rev*. 2016 Nov 1;274(1):152–71. <https://doi.org/10.1111/imr.12475>
95. Shao S, Sun X, Chen Y, Zhan B, Zhu X. Complement Evasion: An Effective Strategy That Parasites Utilize to Survive in the Host. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. 2019. p. 532.
96. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol*. 2015;6(JUN):1–30.
97. Bohlson SS, Garred P, Kemper C, Tenner AJ. Complement nomenclature-deconvoluted. *Front Immunol*. 2019;10(JUN):1–6.

98. Garred P, Genster N, Pilely K, Bayarri-Olmos R, Rosbjerg A, Ma YJ, et al. A journey through the lectin pathway of complement—MBL and beyond. *Immunol Rev.* 2016;274(1):74–97.
99. Oroszlán G, Dani R, Szilágyi A, Závodszy P, Thiel S, Gál P, et al. Extensive basal level activation of complement mannose-binding lectin-associated serine protease-3: Kinetic modeling of lectin pathway activation provides possible mechanism. *Front Immunol.* 2017;8(DEC):1–14.
100. Dobó J, Kocsis A, Gál P. Be on target: Strategies of targeting alternative and lectin pathway components in complement-mediated diseases. *Front Immunol.* 2018;9(AUG).
101. Hayashi M, Machida T, Ishida Y, Ogata Y, Omori T, Takasumi M, et al. Cutting Edge: Role of MASP-3 in the Physiological Activation of Factor D of the Alternative Complement Pathway. *J Immunol.* 2019 Sep 15;203(6):1411 LP – 1416.
102. Harrison RA. The properdin pathway: an “alternative activation pathway” or a “critical amplification loop” for C3 and C5 activation? *Semin Immunopathol.* 2018;40(1):15–35.
103. Serna M, Giles JL, Morgan BP, Bubeck D. Structural basis of complement membrane attack complex formation. *Nat Commun.* 2016;7(1):10587.
104. Verschoor A, Karsten CM, Broadley SP, Laumonnier Y, Köhl J. Old dogs—new tricks: immunoregulatory properties of C3 and C5 cleavage fragments. *Immunol Rev.* 2016 Nov 1;274(1):112–26. <https://doi.org/10.1111/imr.12473>
105. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(10):729–40. <https://doi.org/10.1038/nri2620>
106. Kopp A, Hebecker M, Svobodová E, Józsi M. Factor H: A complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions. *Biomolecules.* 2012;2(1):46–75.
107. Trouw LA, Daha MR. Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol Lett.* 2011;138(1):35–7.
108. Dustin ML. Complement Receptors in Myeloid Cell Adhesion and Phagocytosis. *Microbiol Spectr.* 2016;4(6).
109. Frank MM, Sullivan KE. Deficiencies of the Complement System. Elsevier. Sullivan K, Stiehm R, editors. *Stiehm’s Immune Deficiencies.* 2014. 731–763 p.
110. Figueroa JE, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev.* 1991 Jul 1;4(3):359 LP – 395.
111. Truedsson L. Classical pathway deficiencies - A short analytical review. *Mol Immunol.* 2015;68(1):14–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.05.007>
112. Bishof NA, Welch TR, Beischel LS. C4B deficiency: A risk factor for bacteremia with encapsulated organisms. *J Infect Dis.* 1990;162(1):248–50.
113. Jönsson G, Truedsson L, Sturfelt G, Oxelius VA, Braconier JH, Sjöholm AG. Hereditary C2 deficiency in Sweden: Frequent occurrence of invasive infection, atherosclerosis, and rheumatic disease. *Medicine (Baltimore).* 2005;84(1):23–34.

114. Sullivan KE. Complement Deficiencies. In: Pediatric Allergy: Principles and Practice . Third Edit. London: Elsevier; 2016. p. 90-100.e4.
115. Jönsson G, Sjöholm AG, Truedsson L, Bengtsson AA, Braconier JH, Sturfelt G. Rheumatological manifestations, organ damage and autoimmunity in hereditary C2 deficiency. *Rheumatology*. 2007 May 3;46(7):1133–9.
116. Ram S, Lewis LA, Rice PA. Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(4), 74. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(4):740–80.
117. Okura Y, Kobayashi I, Yamada M, Sasaki S, Yamada Y, Kamioka I, et al. Clinical characteristics and genotype-phenotype correlations in C3 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* . 2016 Feb 1;137(2):640-644.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.017>
118. Olesen H V., Jensenius JC, Steffensen R, Thiel S, Schiøtz 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.
119. Świerzko AS, Szala-Poździej A, Kilpatrick DC, Sobociński M, Chojnacka K, Sokołowska A, et al. Components of the lectin pathway of complement activation in paediatric patients of intensive care units. *Immunobiology*. 2016;221(5):657–69.
120. García-Laorden MI, García-Saavedra A, de Castro FR, Violán JS, Rajas O, Blanquer J, et al. Low clinical penetrance of mannan-binding lectin-associated serine protease 2 deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Dec 1;118(6):1383–6.
121. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol*. 2018;38(1):96–128.
122. Lundbo LF, Harboe ZB, Clausen LN, Hollegaard MV, Sørensen HT, Hougaard DM, et al. Mannose-binding lectin gene, MBL2, polymorphisms are not associated with susceptibility to invasive pneumococcal disease in children. *Clin Infect Dis*. 2014;59(4):66–71.
123. Mills TC, Chapman S, Hutton P, Gordon AC, Bion J, Chiche JD, et al. Variants in the mannan-binding lectin gene MBL2 do not associate with sepsis susceptibility or survival in a large European cohort. *Clin Infect Dis*. 2015;61(5):695–703.
124. Degn SE, Jensenius JC, Thiel S. Disease-Causing Mutations in Genes of the Complement System. *Am J Hum Genet*. 2011;88(6):689–705.
125. Michalski M, Świerzko AS, Pagowska-Klimek I, Niemir ZI, Mazerant K, Domzalska-Popadiuk I, et al. Primary Ficolin-3 deficiency- Is it associated with increased susceptibility to infections? *Immunobiology*. 2015;220(6):711–3.
126. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(4):288–301.

127. Carpanini SM, Torvell M, Morgan BP. Therapeutic Inhibition of the Complement System in Diseases of the Central Nervous System. *Front Immunol.* 201;10:362.
128. Noris M, Benigni A, Remuzzi G. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact. *Kidney Int.* 2020;S0085-2538(20)30556-1.
129. Chatzidionysiou K, Svenungsson E, Faustini F. Could severe COVID-19 be considered a complementopathy? *Lupus Sci Med.* 2020;7(1):e000415.
130. Risitano AM, Mastellos DC, Huber-Lang M, Yancopoulou D, Garlanda C, Ciceri F, et al. Complement as a target in COVID-19? *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):343–4.
131. Lintner KE, Wu YL, Yang Y, Spencer CH, Hauptmann G, Hebert LA, et al. Early components of the complement classical activation pathway in human systemic autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2016;7:36.
132. Sullivan KE, Petri MA, Schmeckpeper BJ, McLean RH, Winkelstein JA. Prevalence of a mutation causing C2 deficiency in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1994;21(6):1128-1133.
133. Vignesh P, Rawat A, Sharma M, Singh S. Complement in autoimmune diseases. *Clin Chim Acta.* 2017;465:123–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2016.12.017>
134. Zipfel PF, Edey M, Heinen S, Józsi M, Richter H, Misselwitz J, et al. Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS Genet.* 2007;3(3):0387–92.
135. Łukawska E, Polcyn-Adamczak M, Niemir ZI. The role of the alternative pathway of complement activation in glomerular diseases. *Clin Exp Med.* 2018;18(3):297–318.
136. Daha MR, Kooten C Van. Role of complement in IgA nephropathy. *J Nephrol.* 2016;29(1):1–4.
137. Geerlings MJ, de Jong EK, den Hollander AI. The complement system in age-related macular degeneration: A review of rare genetic variants and implications for personalized treatment. *Mol Immunol.* 2017;84:65–76.
138. Pereira KMC, Perazzio S, Faria AGA, et al. Impact of C4, C4A and C4B gene copy number variation in the susceptibility, phenotype and progression of systemic lupus erythematosus. *Adv Rheumatol.* 2019;59(1):36
139. Boteva L, Morris DL, Cortés-Hernández J, Martin J, Vyse TJ, Fernando MMA. Genetically determined partial complement C4 deficiency states are not independent risk factors for SLE in UK and Spanish populations. *Am J Hum Genet.* 2012;90(3):445–56.
140. Li N, Zhang J, Liao D, Yang L, Wang Y, Hou S. Association between C4, C4A, and C4B copy number variations and susceptibility to autoimmune diseases: A meta-analysis. *Sci Rep.* 2017;7(January):1–10.
141. Jüptner M, Flachsbart F, Caliebe A, Lieb W, Schreiber S, Zeuner R, et al. Low copy numbers of complement C4 and homozygous deficiency of C4A may predispose to severe disease and earlier disease onset in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2018;27(4):600–9.

142. Yang Y, Chung EK, Zhou B, Blanchong CA, Yu CY, Füst G, et al. Diversity in Intrinsic Strengths of the Human Complement System: Serum C4 Protein Concentrations Correlate with C4 Gene Size and Polygenic Variations, Hemolytic Activities, and Body Mass Index. *J Immunol* . 2003 Sep 1;171(5):2734 LP – 2745.
143. Saxena K, Kitzmiller KJ, Wu YL, Zhou B, Esack N, Hiremath L, et al. Great genotypic and phenotypic diversities associated with copy-number variations of complement C4 and RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules: a comparison of Asian-Indian and European American populations. *Mol Immunol*. 2009 Apr;46(7):1289–303.
144. Margery-Muir AA, Wetherall JD, Castley ASL, Hew M, Whidborne RS, Mallon DFJ, et al. Establishment of Gene Copy Number–Specific Normal Ranges for Serum C4 and Its Utility for Interpretation in Patients With Chronically Low Serum C4 Concentrations. *Arthritis Rheumatol* . 2014 Sep 1;66(9):2512–20. <https://doi.org/10.1002/art.38680>
145. Liesmaa I, Paakkanen R, Järvinen A, Valtonen V, Lokki M-L. Clinical features of patients with homozygous complement C4A or C4B deficiency. *PLoS One* . 2018 Jun 21;13(6):e0199305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199305>
146. Fernando MMAA, Boteva L, Morris DL, Zhou B, Wu YL, Lokki M-LL, et al. Assessment of complement C4 gene copy number using the paralog ratio test. *Hum Mutat* . 2010 Jul 1;31(7):866–74. <https://doi.org/10.1002/humu.21259>
147. Hauptmann G, Tappeiner G, Schifferli JA. Inherited deficiency of the fourth component of human complement. *Immunodeficiency Rev*. 1988;1(1):3–22.
148. Seppänen M, Suvilehto J, Lokki M-L, Notkola I-L, Järvinen A, Jarva H, et al. Immunoglobulins and complement factor C4 in adult rhinosinusitis. *Clin Exp Immunol* . 2006 Aug 1;145(2):219–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03134.x>
149. Fasano MB, Densen P, McLean RH, Winkelstein JA. Prevalence of Homozygous C4B Deficiency in Patients with Deficiencies of Terminal Complement Components and Meningococemia. *J Infect Dis* . 1990 Nov 1;162(5):1220–1.
150. Cates KL, Densen P, Lockman JC, Levine RP. C4B Deficiency Is Not Associated with Meningitis or Bacteremia with Encapsulated Bacteria. *J Infect Dis* . 1992 May 1;165(5):942–4. <https://doi.org/10.1093/infdis/165.5.942>
151. Rigby WFC, Wu YL, Zan M, Zhou B, Rosengren S, Carlson C, et al. Increased frequency of complement C4B deficiency in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* . 2012 May 1;64(5):1338–44. <https://doi.org/10.1002/art.33472>
152. Szilágyi Á, Füst G. Diseases associated with the low copy number of the *C4B* gene encoding C4, the fourth component of complement. *Cytogenet Genome Res* . 2008;123(1–4):118–30.
153. Flachsbart F, Caliebe A, Heinsen F-A, Hemming-Karlsen T, Schreiber S, Franke A, et al. Investigation of Complement Component C4 Copy Number Variation in Human Longevity. *PLoS One* . 2014 Jan 22;9(1):e86188.
154. Blaskó B, Kolka R, Thorbjörnsdóttir P, Sigurðarson ST, Sigurðsson G, Rónai Z, et al. Low complement C4B gene copy number predicts short-term mortality after acute myocardial infarction. *Int Immunol* . 2007 Nov 20;20(1):31–7.

155. Grassmann F, Cantsilieris S, Schulz-Kuhnt A-S, White SJ, Richardson AJ, Hewitt AW, et al. Multiallelic copy number variation in the complement component 4A (C4A) gene is associated with late-stage age-related macular degeneration (AMD). *J Neuroinflammation* . 2016;13(1):81. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0548-0>
156. Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet* . 2006 Mar 5;38:458. <https://doi.org/10.1038/ng1750>
157. Montes T, Tortajada A, Morgan BP, Rodriguez de Cordoba S, Harris CL. Functional basis of protection against age-related macular degeneration conferred by a common polymorphism in complement factor B. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(11):4366–71.
158. Kaur I, Katta S, Reddy RK, Narayanan R, Mathai A, Majji AB, et al. The involvement of complement factor B and complement component C2 in an Indian cohort with age-related macular degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(1):59–63.
159. Wang X, Zhang Y, Zhang MN. Complement factor B polymorphism (rs641153) and susceptibility to age-related macular degeneration: evidence from published studies. *Int J Ophthalmol*. 2013;6(6):861–7.
160. Hughes AE, Mullan GM, Bradley DT. Complement factor B polymorphism 32W protects against age-related macular degeneration. *Mol Vis* . 2011 Apr 20;17:983–8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21541267>
161. Lu F, Liu S, Hao Q, Liu L, Zhang J, Chen X, et al. Association Between Complement Factor C2/C3/CFB/CFH Polymorphisms and Age-Related Macular Degeneration: A Meta-Analysis . *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018;22(9):526–40.
162. Sumiya M, Tabona P, Arai T, Summerfield JA, Super M, Levinsky RJ, et al. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* . 1991 Jun 29;337(8757):1569–70. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)93263-9](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)93263-9)
163. Lipscombe R, Sumiya M, Hill AVS, Lau Y, Levinsky R, Summerfield J, et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutation in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet*. 1993 Mar 1;2.
164. Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JAL, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* . 1994;40(1):37–44. <https://doi.org/10.1007/BF00163962>
165. Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP SA. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum levels of Mannan-binding protein. *J Immunol*. 1995;6(155):3013–20.
166. Heurich M, Martínez-Barricarte R, Francis NJ, Roberts DL, Rodríguez de Córdoba S, Morgan BP, et al. Common polymorphisms in C3, factor B, and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. *Proc Natl Acad Sci* . 2011 May 24;108(21):8761 LP – 8766.
167. Zhao J, Wu H, Khosravi M, Cui H, Qian X, Kelly JA, et al. Association of genetic variants in complement factor H and factor H-related genes with systemic lupus erythematosus susceptibility. *PLoS Genet*. 2011;7(5):1–9.

168. Xie J, Kiryluk K, Li Y, Mladkova N, Zhu L, Hou P, et al. Fine Mapping Implicates a Deletion of CFHR1 and CFHR3 in Protection from IgA Nephropathy in Han Chinese . *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(10):3187–94.
169. Bresin E, Rurali E, Caprioli J, Sanchez-Corral P, Fremeaux-Bacchi V, Rodriguez de Cordoba S, et al. Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol*. 2013/02/21. 2013 Feb;24(3):475–86.
170. Biebl A, Muendlein A, Kinz E, Drexel H, Kabesch M, Zenz W, et al. Confirmation of host genetic determinants in the CFH region and susceptibility to meningococcal disease in a central European study sample. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(10):1115–7.
171. Bernabéu-Herrero ME, Jiménez-Alcázar M, Anter J, Pinto S, Sánchez Chinchilla D, Garrido S, et al. Complement factor H, FHR-3 and FHR-1 variants associate in an extended haplotype conferring increased risk of atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol* . 2015;67(2, Part B):276–86.
172. Zhang J, Li S, Hu S, Yu J, Xiang Y. Association between genetic variation of complement C3 and the susceptibility to advanced age-related macular degeneration: A meta-analysis. *BMC Ophthalmol*. 2018;18(1):1–14.
173. Adriani KS, Brouwer MC, Geldhoff M, Baas F, Zwinderman AH, Paul Morgan B, et al. Common polymorphisms in the complement system and susceptibility to bacterial meningitis. *J Infect* . 2013;66(3):255–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2012.10.008>
174. Giles JL, Choy E, van den Berg C, Morgan BP, Harris CL. Functional Analysis of a Complement Polymorphism (rs17611) Associated with Rheumatoid Arthritis. *J Immunol* . 2015 Apr 1;194(7):3029 LP – 3034.
175. Woehrl B, Brouwer MC, Murr C, Heckenberg SGB, Baas F, Pfister HW, et al. Complement component 5 contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *J Clin Invest* . 2011/09/19. 2011 Oct;121(10):3943–53.
176. Hageman GS, Anderson DH, Johnson L V, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2005; May 17;102(20):7227 LP – 7232.
177. Abrera-Abeleda MA, Nishimura C, Frees K, Jones M, Maga T, Katz LM, et al. Allelic Variants of Complement Genes Associated with Dense Deposit Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(8):1551–9.
178. Zhang D-F, Li J, Wu H, Cui Y, Bi R, Zhou H-J, et al. CFH Variants Affect Structural and Functional Brain Changes and Genetic Risk of Alzheimer’s Disease. *Neuropsychopharmacology* . 2016;41(4):1034–45.
179. Pickering MC, de Jorge EG, Martinez-Barricarte R, Recalde S, Garcia-Layana A, Rose KL, et al. Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains . *J Exp Med* . 2007 May 21;204(6):1249–56. <https://doi.org/10.1084/jem.20070301>
180. Huang L, Li Y, Guo S, Sun Y, Zhang C, Bai Y, et al. Different hereditary contribution of the



- CFH gene between polypoidal choroidal vasculopathy and age-related macular degeneration in Chinese Han people. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(4):2534–8.
181. Takahashi K, Ezekowitz RAB. The Role of the Mannose-Binding Lectin in Innate Immunity. *Clin Infect Dis* . 2005 Nov 15;41(Supplement\_7):S440–4.
  182. Bouwman LH, Roep BO, Roos A. Mannose-Binding Lectin: Clinical Implications for Infection, Transplantation, and Autoimmunity. *Hum Immunol* . 2006;67(4):247–56.
  183. Pradhan V, Surve P, Ghosh K. Mannose binding lectin (MBL) in autoimmunity and its role in systemic lupus erythematosus (SLE). *J Assoc Physicians India*. 2010 Nov;58:688–90.
  184. Singh SS, Cheung RCF, Ng JHW and TB. Mannose Binding Lectin: A Potential Biomarker for Many Human Diseases . Vol. 23, *Current Medicinal Chemistry*. 2016. p. 3847–60.
  185. Harris CL, Heurich M, Cordoba SR de, Morgan BP. The complotype: Dictating risk for inflammation and infection. *Trends Immunol* . 2012;33(10):513–21.
  186. Hochberg M. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rehum*. 1997;40(9):1725.
  187. Tracy MC, Mathew R. Complicated pneumonia: Current concepts and state of the art. *Curr Opin Pediatr*. 2018;30(3):384–92.
  188. Montella S, Corcione A, Santamaria F. Recurrent pneumonia in children: A reasoned diagnostic approach and a single centre experience. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2).
  189. Prusakowski MK, Chen AP. Pediatric Sepsis. *Emerg Med Clin North Am*. 2017;35(1):123–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.emc.2016.08.008>
  190. Salas A, Carlos CVJ, Antón G, Martínez Q. Documento de consenso SECIP-SEUP sobre manejo de sepsis grave y Shock séptico en pediatría. *Secip - Seup* . 2016;1–76.
  191. Yu CY, Zhou B, Birmingham DJ, Wu YL, Yang Y, Nagaraja HN, et al. Sensitive and Specific Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays to Accurately Determine Copy Number Variations (CNVs) of Human Complement C4A, C4B, C4-Long, C4-Short, and RCCX Modules: Elucidation of C4 CNVs in 50 Consanguineous Subjects with Defined HLA Genotypes. *J Immunol*. 2014;179(5):3012–25.
  192. Muñoz-Almagro C, Gala S, Selva L, Jordan I, Tarragó D, Pallares R. DNA bacterial load in children and adolescents with pneumococcal pneumonia and empyema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(3):327–35.
  193. Tarragó D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D, Arroyo LA, Muñoz-Almagro C, Esteva C, et al. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(9):828–34.
  194. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol*. 2010;162(2):271–9.
  195. van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, Otto SA, Gaiser JF, Janssens-Korpela PL, et al. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell

- compartments. *Clin Immunol* . 2009;133(1):95–107.
196. Piątosza B, Wolska-Kuśnierz B, Pac M, Siewiera K, Gałkowska E, Bernatowska E. B cell subsets in healthy children: Reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2010;78(6 B):372–81.
  197. Garcia-Prat M, Álvarez-Sierra D, Aguiló-Cucurull A, Salgado-Perandrés S, Briongos-Sebastian S, Franco-Jarava C, et al. Extended immunophenotyping reference values in a healthy pediatric population. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2019;96(3):223–33.
  198. Yogev R, Rosenblatt HM, Stiehm ER, Luzuriaga K, Wara DW, Rathore MH, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(5):973–80.
  199. Schatorjé EJH, Gemen EFA, Driessen GJA, Leuvenink J, van Hout RWNM, de Vries E. Paediatric Reference Values for the Peripheral T cell Compartment. *Scand J Immunol*. 2012;75(4):436–44.
  200. von Bernuth H, Ku C-L, Rodriguez-Gallego C, Zhang S, Garty B-Z, Marodi L, et al. A Fast Procedure for the Detection of Defects in Toll-like Receptor Signaling. *Pediatrics* . 2006 Dec 1 [cited 2017 Dec 16];118(6):2498–503.
  201. Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics*. 2003;19(3):376–82.
  202. Martínón-Torres F, Png E, Khor CC, Davila S, Wright VJ, Sim KS, et al. Natural resistance to Meningococcal Disease related to CFH loci: Meta-analysis of genome-wide association studies. *Sci Rep* . 2016;6(October):1–9.
  203. Shaw PX, Zhang L, Zhang M, Du H, Zhao L, Lee C, et al. Complement factor H genotypes impact risk of age-related macular degeneration by interaction with oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci* . 2012 Aug 21;109(34):13757 LP – 13762.
  204. Lau KK, Smith RJ, Kolbeck PC, Butani L. Dense deposit disease and the factor H H402 allele. *Clin Exp Nephrol*. 2008;12(3):228–32. <https://doi.org/10.1007/s10157-008-0031-z>
  205. Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, et al. Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2007;16(16):1986–92.
  206. Park KH, Fridley BL, Ryu E, Tosakulwong N, Edwards AO. Complement component 3 (C3) haplotypes and risk of advanced age-related macular degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(7):3386–93.
  207. Paun CC, Lechanteur YTE, Groenewoud JMM, Altay L, Schick T, Daha MR, et al. A Novel Complotype Combination Associates with Age-Related Macular Degeneration and High Complement Activation Levels in vivo. *Sci Rep* . 2016;6(May):1–8.
  208. Gaschignard J, Levy C, Chrabieh M, Boisson B, Bost-Bru C, Dager S, et al. Invasive pneumococcal disease in children can reveal a primary immunodeficiency. *Clin Infect Dis*. 2014;59(2):244–51.

209. Hénaff F, Levy C, Cohen R, Picard C, Varon E, Gras Le Guen C, et al. Risk Factors in Children Older Than 5 Years With Pneumococcal Meningitis. *Pediatr Infect Dis J* . 2017;36(5):457–61.
210. Alsina L, Basteiro MG, De Paz HD, I?igo M, De Sevilla MF, Trivi??o M, et al. Recurrent invasive pneumococcal disease in children: Underlying clinical conditions, and immunological and microbiological characteristics. *PLoS One*. 2015;10(3):1–13.
211. Cardenes M, von Bernuth H, García-Saavedra A, Santiago E, Puel A, Ku C-L, et al. Autosomal recessive Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency in fourth-degree relatives. *J Pediatr* . 2006 Apr 1;148(4):549–51.
212. Heja D, Kocsis A, Dobo J, Szilagyi K, Szasz R, Zavodszky P, et al. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(26):10498–503.
213. Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Gadjeva M, Møller-Kristensen M, Sørensen R, Jensen LT, et al. Inherited Deficiency of Mannan-Binding Lectin–Associated Serine Protease 2. *N Engl J Med*. 2003;349(6):554–60.
214. Notarangelo L, Casanova JL, Fischer A, Puck J, Rosen F, Seger R, et al. Primary immunodeficiency diseases: An update. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(3):677–87.
215. Cedzynski M, Szemraj J, Swierzko AS, Bak-Romaniszyn L, Banasik M, Zeman K, et al. Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. *Clin Exp Immunol*. 2004;136(2):304–11.
216. Cedzynski M, Atkinson APM, St. Swierzko A, MacDonald SL, Szala A, Zeman K, et al. L-ficolin (ficolin-2) insufficiency is associated with combined allergic and infectious respiratory disease in children. *Mol Immunol*. 2009;47(2–3):415–9.
217. Sokolowska A, Szala A, St Swierzko A, Kozinska M, Niemiec T, Blachnio M, et al. Mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) deficiency in two patients with pulmonary tuberculosis and one healthy control. *Cell Mol Immunol* . 2015;12(1):119–21. <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2014.19>
218. Thiel S, Steffensen R, Christensen IJ, Ip WK, Lau YL, Reason IJM, et al. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun*. 2007;8(2):154–63.
219. Ytting H, Christensen IJ, Steffensen R, Alsner J, Thiel S, Jensenius JC, et al. Mannan-Binding Lectin (MBL) and MBL-Associated Serine Protease 2 (MASP-2) Genotypes in Colorectal Cancer. *Scand J Immunol*. 2011;73(2):122–7.
220. Segat L, Fabris A, Padovan L, Milanese M, Pirulli D, Lupo F, et al. MBL2 and MASP2 gene polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat*. 2008;15(5):387–91.
221. Sørensen R, Thiel S, Jensenius JC. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;27(3):299–319.
222. Olszowski T, Poziomkowska-Gesicka I, Jensenius JC, Adler G. Lectin pathway of

- complement activation in a Polish woman with MASP-2 deficiency. *Immunobiology*. 2014;219(4):261–2.
223. García-Laorden MI, Hernández-Brito E, Muñoz-Almagro C, Pavlovic-Nesic S, Rúa-Figueroa I, Briones ML, et al. Should MASP-2 Deficiency Be Considered a Primary Immunodeficiency? Relevance of the Lectin Pathway. *J Clin Immunol* . 2019; <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00714-4>
224. Stover C, Barrett S, Lynch NJ, Barker JNWN, Burden D, Trembath R, et al. Functional MASP2 single nucleotide polymorphism plays no role in psoriasis. *Br J Dermatol*. 2005;152(6):1313–5.
225. Smith MR, Wood WB Jr.. Heat labile opsonins to pneumococcus. I. Participation of complement . *J Exp Med* . 1969 Dec 1;130(6):1209–27.
226. Shin HS, Smith MR, Wood WB Jr. Heat labile opsonins to pneumococcus. II. Involvement of C3 and C5. *J Exp Med*. 1969 Dec 1;130(6):1229–41.
227. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Al-Herz W, Ailal F, Chatila T, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *J Clin Immunol* . 2020;40(1):66–81. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00758-x>
228. Yang Y, Chung EK, Zhou B, Lhotta K, Hebert LA, Birmingham DJ, et al. The intricate role of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus. *Curr Dir Autoimmun*. 2004;7:98–132.
229. Law SK, Dodds AW, Porter RR. A comparison of the properties of two classes, C4A and C4B, of the human complement component C4. *EMBO J* . 1984 Aug 1;3(8):1819–23. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb02052.x>
230. Reilly BD. Analysis of human C4A and C4B binding to an immune complex in serum. *Clin Exp Immunol* . 1999 Jul;117(1):12–8.
231. Moulds, JM., Warner, NB., Arnett F. Complement component C4A and C4B levels in systemic lupus erythematosus: quantitation in relation to C4 null status and disease activity. *J Rheumatol*. 1993;20(3):443–7.
232. Soto K, Wu YL, Ortiz A, Aparício SR, Yu CY. Familial C4B deficiency and immune complex glomerulonephritis. *Clin Immunol* . 2010;137(1):166–75.
233. Rowe PC, McLean RH, Wood RA, Leggiadro RJ, Winkelstein JA. Association of Homozygous C4B Deficiency with Bacterial Meningitis. *J Infect Dis* . 1989 Sep 1;160(3):448–51. <https://doi.org/10.1093/infdis/160.3.448>
234. Opdal SH, Vege Å, Saugstad OD, Rognum TO. Is partial deletion of the complement C4 genes associated with sudden infant death? *Eur J Pediatr* . 1994;153(4):287–90. <https://doi.org/10.1007/BF01954522>
235. Ekdahl K, Truedsson L, Sjöholm AG, Braconier JH. Complement Analysis in Adult Patients with a History of Bacteremic Pneumococcal Infections or Recurrent Pneumonia. *Scand J Infect Dis* . 1995 Jan 1;27(2):111–7.
236. Awdeh ZL, Alper CA. Inherited structural polymorphism of the fourth component of

- human complement. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Jun;77(6):3576–80.
237. Sim E, Cross SJ. Phenotyping of human complement component C4, a class-III HLA antigen. Biochem J. 1986 Nov;239(3):763–7.
238. Pericak-Vance MA, Gallins P, Schnetz-Boutaud N, Postel EA, Agarwal A, Scott WK, et al. C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration. Hum Mol Genet. 2008;17(12):1821–4.
239. Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Complement C3 and its polymorphism: Biological and clinical consequences. Pathology. 2014;46(1):1–10.
240. WIEME RJ, DEMEULENAERE L. Genetically Determined Electrophoretic Variant of the Human Complement Component C'3. Nature . 1967;214(5092):1042–3.
241. Botto M, Fong KY, So AK, Koch C, Walport MJ. Molecular basis of polymorphisms of human complement component C3. J Exp Med . 1990;172(4):1011–7.
242. Ruiz-González A, Falguera M, Nogués A, Rubio-Caballero M. Is *Streptococcus pneumoniae* the leading cause of pneumonia of unknown etiology? A microbiologic study of lung aspirates in consecutive patients with community-acquired pneumonia. Am J Med . 1999 Apr 1;106(4):385–90. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)00050-9)
243. Pettigrew HD, Teuber SS, Gershwin ME. Clinical Significance of Complement Deficiencies. Ann N Y Acad Sci . 2009 Sep 1;1173(1):108–23.
244. Nishida N, Walz T, Springer TA. Structural transitions of complement component C3 and its activation products. Proc Natl Acad Sci. 2006;103(52):19737–42.
245. Janssen BJC, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris JD, Gros P. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. Nature. 2006;444(7116):213–6.
246. Abdul Ajees A, Gunasekaran K, Volanakis JE, Narayana SVL, Kotwal GJ, Krishna Murthy HM. The structure of complement C3b provides insights into complement activation and regulation. Nature. 2006;444(7116):221–5.
247. Rodriguez E, Nan R, Li K, Gor J, Perkins SJ. A Revised Mechanism for the Activation of Complement C3 to C3b: A MOLECULAR EXPLANATION OF A DISEASE-ASSOCIATED POLYMORPHISM . J Biol Chem . 2015 Jan 23;290(4):2334–50.
248. López-Perrote A, Harrison RES, Subías M, Alcorlo M, Rodríguez de Córdoba S, Morikis D, et al. Ionic tethering contributes to the conformational stability and function of complement C3b. Mol Immunol . 2017;85:137–47.
249. Mohlin FC, Gros P, Mercier E, Gris JCR, Blom AM. Analysis of C3 gene variants in patients with idiopathic recurrent spontaneous pregnancy loss. Front Immunol. 2018;9(AUG):1–13.
250. Bazyar N, Azarpira N, Khatami SR, Galehdari H. The investigation of allele and genotype frequencies of human C3 (rs2230199) in south Iranian population. Mol Biol Rep . 2012;39(9):8919–24. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1759-9>

251. Sepp T, Armbrecht AM, Matharu BK, Wright AF, Yates JRW, Bird AC, et al. Complement C3 Variant and the Risk of Age-Related Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 2007;357(6):553–61.
252. Despret DDG, van Duijn CM, Oostra BA, Uitterlinden AG, Hofman A, Wright AF, et al. Complement Component C3 and Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* . 2009;116(3):474-480.e2.
253. Kraivong R, Vasanawathana S, Limpitikul W, Malasit P, Tangthawornchaikul N, Botto M, et al. Complement alternative pathway genetic variation and Dengue infection in the Thai population. *Clin Exp Immunol* . 2013 Nov;174(2):326–34.
254. De Vries RRP, Khan PM, Bernini LF, Loghem E van, Van Rood JJ. GENETIC CONTROL OF SURVIVAL IN EPIDEMICS. *Int J Immunogenet*. 1979 Aug 1;6(4):271–87.
255. Casanova J-L. Severe infectious diseases of childhood as monogenic inborn errors of immunity. *Proc Natl Acad Sci* . 2015 Dec 22;112(51):E7128 LP-E7137.
256. Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, et al. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine (Baltimore)*. 2010 Nov;89(6):403–25.
257. von Bernuth H, Picard C, Puel A, Casanova J-L. Experimental and natural infections in MyD88- and IRAK-4-deficient mice and humans. *Eur J Immunol*. 2012 Dec;42(12):3126–35.
258. Rebeca, Perez de Diego, Carlos R-G. Other TLR pathway defects. In: Sullivan K, Stiehm D, editors. *Immunological Disorders in Infants and Children*. Sixth. USA: Elsevier Health Sciences; 2014. p. 687–710.
259. Jones TPW, Buckland M, Breuer J, Lowe DM. Viral infection in primary antibody deficiency syndromes. *Rev Med Virol* . 2019 Jul 1;29(4):e2049.
260. Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* . 2006;38(9):1055–9.
261. Park DH, Connor KM, Lambris JD. The Challenges and Promise of Complement Therapeutics for Ocular Diseases. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. 2019. p. 1007.
262. Alper CA, Boenisch T, Watson L. GENETIC POLYMORPHISM IN HUMAN GLYCINE-RICH BETA-GLYCOPROTEIN . *J Exp Med* . 1972 Jan 1;135(1):68–80.
263. Kulasekararaj AG, Lazana I, Large J, Posadas K, Eagleton H, Lord Villajin J, et al. Terminal complement inhibition dampens the inflammation during COVID-19. *Br J Haematol* . n/a(n/a). <https://doi.org/10.1111/bjh.16916>
264. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai J-Y, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):385-389.
265. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*. 2005 Apr;308(5720):419–21.

266. Calippe B, Augustin S, Beguier F, Charles-Messance H, Poupel L, Conart J-B, et al. Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation. *Immunity* . 2017 Feb 21;46(2):261–72. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.006>
267. Harrison RES, Morikis D. Molecular Mechanisms of Macular Degeneration Associated with the Complement Factor H Y402H Mutation. *Biophys J* . 2019 Jan 22;116(2):215–26. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.12.007>
268. Landowski M, Kelly U, Klingeborn M, Groelle M, Ding J-D, Grigsby D, et al. Human complement factor H Y402H polymorphism causes an age-related macular degeneration phenotype and lipoprotein dysregulation in mice. *Proc Natl Acad Sci* . 2019 Feb 26;116(9):3703 LP – 3711.
269. van den Broek B, van der Flier M, de Groot R, de Jonge MI, Langereis JD. Common Genetic Variants in the Complement System and their Potential Link with Disease Susceptibility and Outcome of Invasive Bacterial Infection. *J Innate Immun*. 2020;12(2):131–41.
270. Modell V, Gee B, Lewis DB, Orange JS, Roifman CM, Routes JM, et al. Global study of primary immunodeficiency diseases (PI)—diagnosis, treatment, and economic impact: an updated report from the Jeffrey Modell Foundation. *Immunol Res* . 2011;51(1):61. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8241-y>
271. Jeffrey Modell Foundation. 10 warning signs of primary immunodeficiency . 2013. p. 1. <http://www.info4pi.org/library/educational-materials/10-warning-signs>
272. Bjelac JA, Yonkof JR, Fernandez J. Differing Performance of the Warning Signs for Immunodeficiency in the Diagnosis of Pediatric Versus Adult Patients in a Two-Center Tertiary Referral Population. *J Clin Immunol* . 2019;39(1):90–8.
273. Elisa Cordero, Walter Goycochea Valdivia, Ana Mendez Echevarria, Luis M. Allende, Laia Alsina MBG-M et al. Consensus. Diagnosis and management of patients with primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;(in press).
274. Soler-Palacín P, de Gracia J, González-Granado LI, Martín C, Rodríguez-Gallego C, Sánchez-Ramón S. Primary immunodeficiency diseases in lung disease: warning signs, diagnosis and management. *Respir Res*. 2018 Nov;19(1):219.
275. Sánchez-Ramón S, Bermúdez A, González-Granado LI, Rodríguez-Gallego C, Sastre A, Soler-Palacín P. Primary and Secondary Immunodeficiency Diseases in Oncohaematology: Warning Signs, Diagnosis, and Management. *Front Immunol*. 2019;10:586.
276. de Vries E, Driessen G. Educational paper: Primary immunodeficiencies in children: a diagnostic challenge. *Eur J Pediatr* . 2010/12/18. 2011 Feb;170(2):169–77.
277. Cartwright K. Pneumococcal disease in western Europe: Burden of disease, antibiotic resistance and management. *Eur J Pediatr*. 2002;161(4):188–95.
278. Moin M, Aghamohammadi A, Farhodi A, Pourpak Z, Rezaei N, Movahedi M, et al. X-Linked Agammaglobulinemia: A Survey of 33 Iranian Patients. *Immunol Invest* . 2004 Jan 1;33(1):81–93. <https://doi.org/10.1081/IMM-120027687>

279. Winkelstein JA, Marino MC, Lederman HM, Jones SM, Sullivan K, Burks AW, et al. X-Linked Agammaglobulinemia: Report on a United States Registry of 201 Patients. *Medicine (Baltimore)* . 2006;85(4).
280. Truedsson L, Sturfelt G, Nived O. Prevalence of the Type I Complement C2 Deficiency Gene in Swedish Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Lupus*. 1993;2(5):325–7.
281. Antolín SC, Del Rey Cerros MJ, Sierra EM, Miñarro DO, Clemente J, Martínez LA, et al. Frequency in Spanish population of familial complement factor 2 type I deficits and associated HLA haplotypes. *Hum Immunol*. 2005 Oct;66(10):1093–8.
282. Bolze A, Boisson B, Bosch B, Antipenko A, Bouaziz M, Sackstein P, et al. Incomplete penetrance for isolated congenital asplenia in humans with mutations in translated and untranslated RPSA exons. *Proc Natl Acad Sci* . 2018 Aug 21;115(34):E8007 LP-E8016. <http://www.pnas.org/content/115/34/E8007.abstract>
283. Sologuren I, Boisson-Dupuis S, Pestano J, Vincent QB, Fernández-Pérez L, Chapgier A, et al. Partial recessive IFN- $\gamma$ R1 deficiency: genetic, immunological and clinical features of 14 patients from 11 kindreds. *Hum Mol Genet*. 2011;20(8):1509–23.
284. de Beaucoudrey L, Samarina A, Bustamante J, Abel L, Sanal O, Casanova J-L, et al. Revisiting Humal IL-12R $\beta$ 1 Deficiency. *Medicine (Baltimore)*. 2010;89(6):381–402.
285. Cárdenes M, Angel-Moreno A, Fieschi C, Sologuren I, Colino E, Molinés A, et al. Oesophageal squamous cell carcinoma in a young adult with IL-12R beta 1 deficiency. Vol. 47, *Journal of medical genetics*. England; 2010. p. 635–7.
286. Ouederni M, Sanal O, Ikinçiogullari A, Tezcan I, Dogu F, Sologuren I, et al. Clinical features of Candidiasis in patients with inherited interleukin 12 receptor  $\beta$ 1 deficiency. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2014 Jan;58(2):204–13.
287. Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E, Feinberg J, Bustamante J, Breiman A, et al. Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications. *J Exp Med*. 2003 Feb;197(4):527–35.
288. Toubiana J, Okada S, Hiller J, Oleastro M, Lagos Gomez M, Aldave Becerra JC, et al. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype. *Blood* . 2016 Jun 23;127(25):3154–64. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-679902>
289. Holzinger D, Fassl SK, de Jager W, Lohse P, Röhrig UF, Gattorno M, et al. Single amino acid charge switch defines clinically distinct proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1 (PSTPIP1)-associated inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol* . 2015/05/27. 2015 Nov;136(5):1337–45.
290. Martínez-Saavedra MT, García-Gomez S, Domínguez Acosta A, Mendoza Quintana JJ, Páez JP, García-Reino EJ, et al. Gain-of-function mutation in PIK3R1 in a patient with a narrow clinical phenotype of respiratory infections. Vol. 173, *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*. United States; 2016. p. 117–20.
291. Sologuren I, Martínez-Saavedra MT, Solé-Violán J, de Borges de Oliveira Jr E, Betancor E, Casas I, et al. Lethal Influenza in Two Related Adults with Inherited GATA2 Deficiency.



- J Clin Immunol . 2018 May;38(4):513–26. <https://doi.org/10.1007/s10875-018-0512-0>
292. Venetz I, Schopfer K, Mühlemann K, Group SPS. Paediatric, invasive pneumococcal disease in Switzerland, 1985–1994. *Int J Epidemiol* . 1998 Dec 1;27(6):1101–4. <https://doi.org/10.1093/ije/27.6.1101>
  293. Satgé D, Seidel MG. The Pattern of Malignancies in Down Syndrome and Its Potential Context With the Immune System. *Front Immunol*. 2018;9(December):3058.
  294. Verstegen RHJ, Driessen GJ, Bartol SJW, van Noesel CJM, Boon L, van der Burg M, et al. Defective B-cell memory in patients with Down syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Dec;134(6):1346-1353.e9.
  295. Huggard D, Doherty DG, Molloy EJ. Immune Dysregulation in Children With Down Syndrome. *Front Pediatr*. 2020;8:73.
  296. Carsetti R, Valentini D, Marcellini V, Scarsella M, Marasco E, Giustini F, et al. Reduced numbers of switched memory B cells with high terminal differentiation potential in Down syndrome. *Eur J Immunol*. 2015 Mar;45(3):903–14.
  297. Farroni C, Marasco E, Marcellini V, Giorda E, Valentini D, Petrini S, et al. Dysregulated miR-155 and miR-125b Are Related to Impaired B-cell Responses in Down Syndrome. *Front Immunol*. 2018;9:2683.
  298. Sorensen RU, Edgar D. Specific Antibody Deficiencies in Clinical Practice. *J allergy Clin Immunol Pract*. 2019 Mar;7(3):801–8.
  299. Lopez B, Bahuaud M, Fieschi C, Mehlal S, Jeljeli M, Rogeau S, et al. Value of the Overall Pneumococcal Polysaccharide Response in the Diagnosis of Primary Humoral Immunodeficiencies. *Front Immunol*. 2017;8:1862.
  300. Barrett DJ, Ammann AJ. Pneumococcal vaccine in sickle cell disease: IgG and IgM antibody response. *Rev Infect Dis*. 1981;3 Suppl:S179-82.
  301. Moschese V, Cavaliere FM, Graziani S, Bilotta C, Milito C, Chini L, et al. Decreased IgM, IgA, and IgG response to pneumococcal vaccine in children with transient hypogammaglobulinemia of infancy. *J Allergy Clin Immunol* . 2016 Feb 1;137(2):617–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.06.014>
  302. Janssen WJM, Nierkens S, Sanders EA, Boes M, van Montfrans JM. Antigen-specific IgA titres after 23-valent pneumococcal vaccine indicate transient antibody deficiency disease in children. *Vaccine* . 2015;33(46):6320–6.
  303. Paris K, Sorensen RU. Assessment and clinical interpretation of polysaccharide antibody responses. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2007 Nov 1;99(5):462–4.
  304. Alcaïs A, Quintana-Murci L, Thaler DS, Schurr E, Abel L, Casanova J-L. Life-threatening infectious diseases of childhood: single-gene inborn errors of immunity? *Ann N Y Acad Sci* . 2010 Dec 1;1214(1):18–33. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05834.x>
  305. Ku CL, Picard C, Erdős M, Jeurissen A, Bustamante J, Puel A, et al. IRAK4 and NEMO mutations in otherwise healthy children with recurrent invasive pneumococcal disease. *J Med Genet*. 2007;44(1):16–23.

306. Gobin K, Hintermeyer M, Boisson B, Chrabieh M, Gandil P, Puel A, et al. IRAK4 Deficiency in a Patient with Recurrent Pneumococcal Infections: Case Report and Review of the Literature. *Front Pediatr* . 2017;5:83.
307. Casanova JL, Abel L. Human genetics of infectious diseases: Unique insights into immunological redundancy. *Semin Immunol* . 2018;36(December):1–12.
308. García-Laorden MI, Rodríguez-Gallego C. Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease-2 (MASP-2) Deficiency BT. *Encyclopedia of Medical Immunology: Immunodeficiency Diseases*. In: MacKay I, Rose NR, editors. New York, NY: Springer New York; 2017. p. 1–6. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9209-2\\_7-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9209-2_7-1)
309. Casanova J-L, Conley ME, Seligman SJ, Abel L, Notarangelo LD. Guidelines for genetic studies in single patients: lessons from primary immunodeficiencies. *J Exp Med*. 2014;211(11):2137–49.
310. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Ailal F, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, et al. The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol*. 2018;38(1):129–43.
311. Van Schaarenburg RA, Schejbel L, Truedsson L, Topaloglu R, Al-Mayouf SM, Riordan A, et al. Marked variability in clinical presentation and outcome of patients with C1q immunodeficiency. *J Autoimmun* . 2015;62:39–44.
312. Jonsson G, Oxelius V-A, 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*. 2014;177(1):722–8.
313. Verdu P, Barreiro LB, Patin E, Gessain A, Cassar O, Kidd JR, et al. Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of MBL2 deficiency alleles. *Hum Mol Genet*. 2006;15(17):2650–8.
314. Luo J, Xu F, Lu GJ, Lin HC, Feng ZC. Low mannose-binding lectin (MBL) levels and MBL genetic polymorphisms associated with the risk of neonatal sepsis: An updated meta-analysis. *Early Hum Dev* . 2014;90(10):557–64.
315. ZHANG A-Q, YUE C-L, PAN W, GAO J-W, ZENG L, GU W, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms and the risk of sepsis: evidence from a meta-analysis. *Epidemiol Infect*. 2014;142(10):2195–2206.
316. Darton TC, Jack DL, Johnson M, Borrow R, Guiver M, Kaczmarek EB, et al. MBL2 deficiency is associated with higher genomic bacterial loads during meningococemia in young children. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(12):1337–42.
317. Lundbo L, Sørensen H, Clausen L, Hollegaard M, Hougaard D, Konradsen H, et al. Mannose-Binding Lectin Gene, MBL2, Polymorphisms Do Not Increase Susceptibility to Invasive Meningococcal Disease in a Population of Danish Children. *Open Forum Infect Dis*. 2015; 2(4):ofv127.
318. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: An update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front Immunol*. 2011;2(NOV):1–26.

319. Ali YM, Lynch NJ, Haleem KS, Fujita T, Endo Y, Hansen S, et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog.* 2012;8(7):46.
320. Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Kleim NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun.* 2000;68(2):688–693.
321. Howard M, Farrar CA, Sacks SH. Structural and functional diversity of collectins and ficolins and their relationship to disease. *Semin Immunopathol.* 2018;40(1):75–85.
322. Hwang I, Mori K, Ohtani K, Matsuda Y, Roy N, Kim YU, et al. Collectin Kidney 1 Plays an Important Role in Innate Immunity against *Streptococcus pneumoniae* Infection. *J Innate Immun.* 2017;9(2):217–8.
323. Rooryck C, Diaz-Font A, Osborn DPS, Chabchoub E, Hernandez-Hernandez V, Shamseldin H, et al. Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nat Genet.* 2011;43(3):197–203.
324. Venkatraman Girija U, Furze CM, Gingras AR, Yoshizaki T, Ohtani K, Marshall JE, et al. Molecular basis of sugar recognition by collectin-K1 and the effects of mutations associated with 3MC syndrome. *BMC Biol.* 2015;13(1).
325. Urquhart J, Roberts R, de Silva D, Shalev S, Chervinsky E, Nampoothiri S, et al. Exploring the genetic basis of 3MC syndrome: Findings in 12 further families. *Am J Med Genet Part A.* 2016;170(5):1216–1224.
326. Munye MM, Diaz-Font A, Ocaña L, Henriksen ML, Lees M, Brady A, et al. COLEC10 is mutated in 3MC patients and regulates early craniofacial development. *PLoS Genet.* 2017;13(3):1–15.
327. Sirmaci A, Walsh T, Akay H, Spiliopoulos M, Şakalar YB, Hasanefendioğlu-Bayrak A, et al. MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of carnevale, malpuech, OSA, and michels syndromes. *Am J Hum Genet.* 2010;87(5):679–86.
328. Atik T, Koparir A, Bademci G, Foster J, Altunoglu U, Mutlu GY, et al. Novel MASP1 mutations are associated with an expanded phenotype in 3MC1 syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10(1):1–10. <http://dx.doi.org/10.1186/s13023-015-0345-3>
329. Degn SE, Jensenius JC, Thiel S. Response to Comment on “Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1 Is Crucial for Lectin Pathway Activation in Human Serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 Is Required for Alternative Pathway Function.” *J Immunol.* 2013;190(6):2477–8.
330. Munthe-Fog L, Hummelshøj T, Honoré C, Madsen HO, Permin H, Garred P. Immunodeficiency Associated with FCN3 Mutation and Ficolin-3 Deficiency. *N Engl J Med.* 2009 Jun 18;360(25):2637–44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900381>
331. Trolborg A, Steffensen R, Trendelenburg M, Hauser T, Winther KG, Hansen AG, et al. Ficolin-3 Deficiency Is Associated with Disease and an Increased Risk of Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Immunol.* 2019; 39(4):421–429

332. Babaha F, Abolhassani H, Hamidi Esfahani Z, Yazdani R, Aghamohammadi A. A new case of congenital ficolin-3 deficiency with primary immunodeficiency. *Expert Rev Clin Immunol.* 2020 Jul;
333. Banda NK, Acharya S, Scheinman RI, Mehta G, Takahashi M, Endo Y, et al. Deconstructing the Lectin Pathway in the Pathogenesis of Experimental Inflammatory Arthritis: Essential Role of the Lectin Ficolin B and Mannose-Binding Protein–Associated Serine Protease 2. *J Immunol.* 2017;199(5):1835–45.
334. Kasanmoentalib ES, Valls Seron M, Ferwerda B, Tanck MW, Zwinderman AH, Baas F, et al. Mannose-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):1–10. <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-016-0770-9>



# **IX. ANEXOS**


---

## **Publicaciones**





# Should MASP-2 Deficiency Be Considered a Primary Immunodeficiency? Relevance of the Lectin Pathway

M. Isabel García-Laorden<sup>1,2</sup> · Elisa Hernández-Brito<sup>3,4</sup> · Carmen Muñoz-Almagro<sup>5,6,7</sup> · Svetlana Pavlovic-Nesic<sup>8</sup> · Iñigo Rúa-Figueroa<sup>9</sup> · M. Luisa Briones<sup>10</sup> · Olga Rajas<sup>11</sup> · Luis Borderías<sup>12</sup> · Antoni Payeras<sup>13</sup> · Leonardo Lorente<sup>14</sup> · Jordi Freixinet<sup>15</sup> · Jose Ferreres<sup>16</sup> · Ignacio Obando<sup>17</sup> · Nereida González-Quevedo<sup>3</sup> · Felipe Rodríguez de Castro<sup>4,18</sup> · Jordi Solé-Violán<sup>1,19</sup> · Carlos Rodríguez-Gallego<sup>3,20</sup> 

Received: 15 June 2019 / Accepted: 29 October 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

## Abstract

Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease-2 (MASP-2) is an indispensable enzyme for the activation of the lectin pathway of complement. Its deficiency is classified as a primary immunodeficiency associated to pyogenic bacterial infections, inflammatory lung disease, and autoimmunity. In Europeans, MASP-2 deficiency, due to homozygosity for *c.359A > G* (p.D120G), occurs in 7 to 14/10,000 individuals. We analyzed the presence of the p.D120G mutation in adults (increasing the sample size of our previous studies) and children. Different groups of patients (1495 adults hospitalized with community-acquired pneumonia, 186 adults with systemic lupus erythematosus, 103 pediatric patients with invasive pneumococcal disease) and control individuals (1119 healthy adult volunteers, 520 adult patients without history of relevant infectious diseases, and a pediatric control group of 311 individuals) were studied. Besides our previously reported MASP-2-deficient healthy adults, we found a new p.D120G homozygous individual from the pediatric control group. We also reviewed p.D120G homozygous individuals reported so far: a total of eleven patients with a highly heterogeneous range of disorders and nine healthy controls (including our four MASP-2-deficient individuals) have been identified by chance in association studies. Individuals with complete deficiencies of several pattern recognition molecules of the lectin pathway (MBL, collectin-10 and collectin-11, and ficolin-3) as well as of MASP-1 and MASP-3 have also been reviewed. Cumulative evidence suggests that MASP-2, and even other components of the LP, are largely redundant in human defenses and that individuals with MASP-2 deficiency do not seem to be particularly prone to infectious or autoimmune diseases.

**Keywords** MASP-2 · MBL · primary immunodeficiency · complement · lectin pathway · ficolin-3 · collectin

## Introduction

Deficiencies in components of the classical and alternative pathways of the complement system are associated to bacterial infections, particularly by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria spp.*, particularly *N. meningitidis*, as well as to autoimmune, mainly rheumatic, diseases [1, 2]. The role of deficiencies of the components of the lectin pathway (LP)

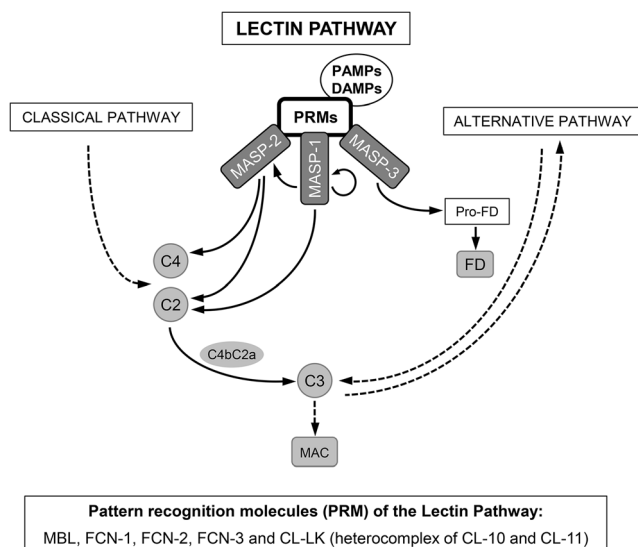
on predisposition to infection and autoimmunity is controversial [3]. The LP is triggered by the pattern recognition molecules (PRMs), mannose-binding lectin (MBL); ficolin-1, ficolin-2, and ficolin-3; and collectin (CL)-10 and CL-11 after binding to surfaces displaying various arrays of carbohydrates or acetyl groups [3]. These PRMs circulate in heterocomplexes with MBL-associated serine proteases (MASPs), which initiate the proteolytic cascade of the LP after binding of the PRM to their ligands. There are three MASPs, MASP-1, MASP-2, and MASP-3. MASP-2 is, together with MASP-1, indispensable for the activation of the LP (Fig. 1) [3–5]. Both activated MASP-1 and MASP-2 can cleave C2, but C4 is cleaved only by MASP-2. In the absence of MASP-1 or MASP-2, the classical C3 convertase C4bC2a cannot be generated through the LP, and no LP activation is observed.

M. Isabel García-Laorden and Elisa Hernández-Brito contributed equally to this work.

✉ Carlos Rodríguez-Gallego  
jrodgal@gobiernodecanarias.org

Extended author information available on the last page of the article





**Fig. 1** The lectin pathway (LP) initiates after binding of pattern recognition molecules (PRMs) to surfaces displaying various arrays of carbohydrates or acetyl groups in PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) or DAMPs (damage-associated molecular patterns). Several PRM of the LP have been identified so far: mannose-binding lectin; ficolin-1, ficolin-2, and ficolin-3; and collectin (CL)-10 and CL-11. CL-10 and CL-11 were found to circulate as heteromeric complexes (CL-LK) of one CL-L1 and two CL-K1 polypeptide chains, able to activate the LP. The serine proteases that initiate the proteolytic cascade of the LP are the MBL-associated serine proteases (MASPs), which circulate in complex with the PRM. When the PRMs of the LP bind to the target surface, zymogen MASP-1 autoactivates first and then activates zymogen MASP-2. Both activated MASP-1 and MASP-2 can cleave C2, but C4 is cleaved only by MASP-2. In the absence of MASP-1 or MASP-2, the classical C3 convertase C4bC2a cannot be generated through the LP, and no LP activation is observed. MASP-3 is the primary physiological activator of pro-factor D under resting conditions in human blood, inducing the activation of the alternative pathway, which serves as an amplification loop for the classical and the lectin pathways. Activation of MASP-3 by MASP-1 and MASP-2 has been also proposed. In addition, it was recently shown that MASP-2 can directly cleave C3 in the absence of C4 and/or C2 on LP-activating surfaces [3–5]. PAMPs pathogen-associated molecular patterns, DAMPs damage-associated molecular patterns, PRM pattern recognition molecules, MASP MBL-associated serine proteases, MBL mannose-binding lectin, FCN-1 ficolin-1 (also commonly termed M-ficolin), FCN-2 ficolin-2 (initially identified as L-ficolin), FCN-3 ficolin-3 (initially identified as H-ficolin), CL-10 collectin-10 (also known as collectin liver 1, CL-L1), CL-11 collectin-11 (also known as collectin kidney 1, CL-K1), FD factor D, MAC membrane attack complex

Deficiency of MASP-2 was first reported in 2003 [6] in an adult individual suffering from autoimmune and inflammatory disorders, as well as severe and recurrent pneumococcal infections. This patient, who was totally deficient in LP activity, was found to be homozygous for a mutation in exon 3 of the *MASP2* gene (rs72550870, p.D120G, c.359A > G). This mutation results in a significant decrease in serum levels of the protein, reaching very low levels in homozygous individuals [6, 7]. But, more importantly, it abrogates the LP activation by preventing the interaction of MASP-2 with the PRMs of the LP [6].

Since 2004, MASP-2 deficiency has been included in the classification of primary immunodeficiencies (PID) as a complement deficiency associated to pyogenic infections, inflammatory lung disease, and autoimmunity [2, 8]. In 2006 and 2008, we reported three MASP-2-deficient healthy adults homozygous for p.D120G in *MASP2* [7, 9], casting doubts about the clinical penetrance of this deficiency. Other deficient individuals, both healthy subjects and patients with a heterogeneous variety of disorders, have also been reported.

In order to shed light on the clinical consequences of MASP-2 deficiency, we have analyzed the presence of the p.D120G mutation in different groups of adult and pediatric patients and healthy individuals. In addition, we have reviewed *MASP2* p.D120G homozygous individuals reported so far.

## Methods

### Patients and Controls

The present study analyzes different groups of patients and healthy individuals. We have increased the sample size of the adult groups published in our previous studies [7, 9]. In addition, we have included pediatric patients with invasive pneumococcal disease (IPD), as well as a pediatric control group. The groups of adult individuals included in the present study comprise 1495 patients hospitalized with community-acquired pneumonia (CAP, 461 with pneumococcal CAP) from 6 Spanish hospitals (mean age,  $62.8 \pm 17.7$  years, 33.9% females), a control group of 520 patients without history of relevant infectious diseases from the same origin than CAP patients (mean age  $61.5 \pm 13.9$  years, 34.4% females), 1119 unrelated healthy volunteers (blood and bone marrow donors and hospital staff) (mean age  $40.9 \pm 14.7$  years, 51.8% females), and 186 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) (mean age  $45.8 \pm 12.3$  years, 91.9% females). The pediatric groups analyzed are composed of 103 patients with IPD (mean age  $2.9 \pm 2.5$  years, 36.5% females) from 3 Spanish hospitals, as well as 311 children from a control group (patients attended for minor surgery with no history of respiratory diseases and without occurrence of inflammatory processes in at least 3 months previous to their inclusion) (mean age  $12.7 \pm 13.2$  months, 67.2% females). Individuals with ancestors other than Spanish were excluded from the study.

The diagnosis of CAP was based on the presence of acute onset of signs and symptoms suggestive of lower respiratory tract infection and on radiographic evidence of a new pulmonary infiltrate with no alternative known cause. IPD was considered in cases of infection requiring hospitalization and confirmed when *S. pneumoniae* was detected by culture or molecular methods from a normally sterile site (blood, cerebrospinal, synovial or pleural fluid, but not sputum). Patients with

SLE were diagnosed according to the American College of Rheumatology 1997 modified criteria [10].

Analysis was done as part of research projects originally approved by the Ethic Committee of the Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrin, Canary Islands Spain, and Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain, and informed consent was obtained from all individuals (or representative). Research reported in the manuscript is in compliance with the Helsinki Declaration.

## Genotyping

Genomic DNA was isolated from whole blood according to standard phenol-chloroform procedure or by the means of automated nucleic acid purification systems (MagNA Pure, Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA, or iPrep, Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, or Nuclisens EasyMag System, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France). *MASP2* p.D120G mutation was analyzed by PCR-RFLP as previously described [9]. Homozygous individuals were confirmed by Sanger sequencing with a different set of primers [7, 9].

## Identification of Previous Cases

*MASP2* p.D120G homozygous individuals previously reported were identified by extensive searching in PubMed, using the search terms “mannose-binding lectin-associated serine protease 2,” “mannose-binding protein-associated serine protease 2,” “mannan-binding lectin-associated serine protease 2,” “MASP-2,” and “MASP2.”

## Statistical Analysis

Frequencies of the different genotypes are presented as number of individuals and percentage from total. Expected numbers of

*MASP2* p.D120G homozygous individuals were calculated based on the frequency of the mutated allele. Comparison of *MASP2* genotypes was performed using the Chi-square test or Fisher's exact test when needed, considering statistical significance when  $P < 0.05$ . Statistical analysis was performed using SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## Results

Table 1 shows the frequency of the genotypes of the *c.359A > G* variant (p.D120G) of the *MASP2* gene in the studied populations. We had previously reported three *MASP2*-deficient individuals with no history of serious infections or autoimmunity [7, 9]. A new *MASP2* p.D120G homozygous individual has now been found in the control group of children without records of respiratory diseases. Six episodes of otitis were documented during his first 2 years of life (three of the episodes were attended at primary care centers, and only one of them was suppurative). Between the age of 3 and 5, he had two episodes of otitis per year; only the first of them was treated with antibiotics. This individual is currently 12 years old, and no further episodes of otitis or other diseases have been recorded. He has never fulfilled diagnostic criteria of PID.

We have not found any *MASP2* p.D120G homozygote among 1495 adults with CAP (of which 73 had pleural empyema, 470 severe sepsis, 79 acute respiratory distress syndrome, and 461 were diagnosed with pneumococcal CAP), 103 children with IPD, and 186 patients with SLE (30 of them with at least one episode of pneumonia). No differences in genotypic or allelic frequencies were found when comparing the groups of patients to their control populations. The expected frequency of homozygosity for the p.D120G variant of our two healthy control populations together (adults and children,  $N = 1430$ ) is of 6.9 in every 10,000 individuals.

**Table 1** Genotypes of the *MASP2* p.D120G mutation (A > G) in the groups of individuals analyzed

	<i>N</i>	<i>A/A</i>	<i>A/G</i>	<i>G/G</i>	Expected <i>G/G</i> <sup>1</sup>
Healthy adults	1119	1063 (95.00)	53 (4.74)	3 (0.27)	0.78 (0.07)
Adult no infection controls <sup>2</sup>	520	484 (93.08)	36 (6.92)	0 (0)	0.62 (0.12)
Children no infection controls <sup>3</sup>	311	296 (95.18)	14 (4.50)	1 (0.32)	0.21 (0.07)
Adult CAP patients	1495	1414 (94.58)	81 (5.42)	0 (0)	1.10 (0.07)
Children with IPD	103	100 (97.09)	3 (2.91)	0 (0)	0.02 (0.02)
SLE patients	186	174 (93.55)	12 (6.45)	0 (0)	0.19 (0.1)

Values are number of individuals (%). CAP community-acquired pneumonia (including 73 patients with pleural empyema, 470 with severe sepsis, and 79 with acute respiratory distress syndrome), IPD invasive pneumococcal disease, SLE systemic lupus erythematosus

<sup>1</sup> Number of expected individuals homozygous for the G allele (%)

<sup>2</sup> Control group of 520 patients without history of relevant infectious diseases from the same origin as CAP patients

<sup>3</sup> Control group of children attended for minor surgery with no history of relevant respiratory diseases and without occurrence of inflammatory processes in at least 3 months previous to their inclusion

Table 2 shows the eleven p.D120G homozygous patients reported in the scientific literature so far. Besides the first patient reported in 2003 [6], ten additional p.D120G homozygous patients (three children and seven adults) have been subsequently identified by chance while performing association studies. These patients presented with a heterogeneous range of diseases: two patients suffered from recurrent respiratory infections [11–13], another one suffered from cystic fibrosis [14], two others were admitted to a lung clinic (no specific disease was reported) [15], two more suffered from pulmonary tuberculosis [13], one patient had colorectal cancer [16], another one was an hepatitis C virus positive individual with hepatocellular carcinoma [17], and the last one was a previously healthy female, aged 66 and with no particular trend to infection, who was hospitalized at general ward due to non-severe CAP [18]. Noteworthy, nine healthy individuals (two children and seven adults) homozygous for p.D120G, including our four cases, have also been found in genetic association studies (Table 3) [7, 9, 13, 17, 20, 21].

## Discussion

We have performed an extensive study aimed to analyze MASP-2 deficiency due to the p.D120G variant in a large group of patients with CAP, IPD, or SLE and a large group of controls (both children and adults). Besides our three previously reported healthy individuals with MASP-2 deficiency [7, 9], we herein report another *MASP2* p.D120G homozygous individual who does not present particularly severe or recurrent infections, nor inflammatory or autoimmune diseases, or any other relevant disorder.

The study of individuals with PID has proven to be an important source of information on the relevance of the affected molecules in humans *in nature* [23]. The first case of MASP-2 deficiency, described in 2003 by Stengaard-Pedersen et al [6],

suggested that this was a new monogenic defect underlying an autosomal recessive immunodeficiency, predisposing to severe infections and autoimmunity. It is worth noting that this individual also showed low levels of C1q (with presence of anti-C1q autoantibodies), C3, and C4 and severely impaired classical and alternative pathways activity. This patient was identified when sera from 125 patients with suspected PID were analyzed for MBL-dependent LP activity deficiency [6, 22]. Ten additional p.D120G homozygous patients (three children and seven adults), with a heterogeneous range of diseases, have been identified by chance in subsequent association studies [11–18] (Table 3). However, nine healthy individuals (two children and seven adults) homozygous for p.D120G have also been found by chance in genetic association studies [7, 9, 13, 17, 19–21, and this study]. Taken together, these findings suggest that MASP-2 deficiency no longer fulfills the premise that to establish a causal relationship between a genotype and a clinical phenotype, the genotype must not occur in healthy individuals [24]. Certainly, some PID show an incomplete penetrance, and healthy individuals with causative genotypes have been identified in familial studies. In any event, incomplete penetrance through life is the exception rather than the rule for most PID, particularly for those PID with autosomal recessive inheritance [23].

Since 2004, MASP-2 deficiency has been included in the classification of PID as a complement deficiency associated to high susceptibility to recurrent pyogenic infections, as well as to inflammatory lung disease and autoimmunity [2, 8, 25]. C1q, C2, and C4 deficiencies are also included as PID but, in this case, with low susceptibility to pyogenic infection and to SLE. This seems paradoxical, since approximately 50% of C1q-deficient individuals present with significant infections by encapsulated bacteria, around 50% of those with C2 deficiency have invasive infections, particularly by pneumococcus, and 76% of C4 deficient patients suffer from recurrent respiratory infections, including pneumonia and meningitis [1, 26–28]. Likewise, 80–95%, 25%, and 76% of individuals with deficiency of C1q, C2, and

**Table 2** Reported patients with MASP-2 deficiency due to homozygosity for the p.D120G mutation

Reported <i>MASP2</i> p.D120G homozygous individuals	Year	Ref
Patients (source)		
1. Adult Danish individual with several autoimmune manifestations, ulcerative colitis, and frequent infections, including severe pneumococcal pneumonias	2003	[6, 22]
2. Pediatric Polish individual with recurrent pneumonias (from a study of 335 Polish children with RRI)	2004	[11, 13]
3. Pediatric Danish individual with CF (from a group of 109 patients with CF)	2006	[14]
4. Adult Danish individual admitted to the Lung Clinics (n.a.)	2007	[15]
5. Adult Danish individual admitted to the Lung Clinics (n.a.)	2007	[15]
6. HCV <sup>+</sup> Italian adult individual with HC (from a study of 215 adult patients with HC)	2008	[17]
7. Pediatric Polish individual with RRI and skin abscesses (from a study of 331 children with allergy and/or RRI)	2009	[13]
8. Adult Danish individual with colorectal cancer (from a study of 593 patients with colorectal cancer)	2011	[16]
9. Adult Polish individual with pulmonary TB (from a study of 440 TB patients)	2015	[13]
10. Adult Polish individual with pulmonary TB (from a study of 440 TB patients)	2015	[13]
11. Adult Norwegian individual with non-severe CAP (from a study of 257 adult CAP patients)	2018	[18]

RRI recurrent respiratory infection, CF cystic fibrosis, HC hepatocellular carcinoma, HCV hepatitis C virus, TB tuberculosis, CAP community-acquired pneumonia, n.a. not available

**Table 3** Reported healthy individuals with MASP-2 deficiency due to homozygosity for the p.D120G mutation

Reported <i>MASP2</i> p.D120G homozygous individuals	Year	Ref
1. Adult British individual (from a study of 314 family-based trios with offspring affected with psoriasis)	2005	[19]
2. Adult Spanish individual (from a control group of 868 healthy adults in a study of adult CAP patients, adult SLE patients, and children with RRI)	2006	[9]
3. Adult Spanish individual (from a control group of 868 healthy adults in a study of adult CAP patients, adult SLE patients, and children with RRI)	2006	[9]
4. Adult Spanish individual (from a control group of 805 healthy adults in a study of adult CAP patients and patients without relevant infectious diseases)	2008	[7]
5. Adult Italian individual (from a control group of 162 healthy individuals for a study of adult patients with HC)	2008	[17]
6. Adult Polish individual (from a study of 179 children with dental caries)	2014	[20]
7. Adult Polish individual (from a control group of 276 healthy individuals for a study of TB patients)	2015	[13]
8. Pre-term Polish newborn (from a control group of 273 healthy newborns for a study of children with sepsis and non-septic infected babies)	2016	[21]
9. Pediatric Spanish individual (from a control group of children with no history of respiratory diseases)	(current study)	

*CAP* community-acquired pneumonia, *SLE* systemic lupus erythematosus, *RRI* recurrent respiratory infection, *HC* hepatocellular carcinoma, *TB* tuberculosis

C4, respectively, are diagnosed with SLE, and another 18% of C2-deficient patients suffer from undifferentiated connective tissue disease or vasculitis [1, 26–28].

Several deficiencies of other components of the LP may shed light on the role of MASP-2 deficiency and LP deficiencies in general, in the susceptibility to infectious and autoimmune diseases. MBL deficiency was originally included in the classification of PID as a complement deficiency associated to pyogenic infections, although its very low clinical penetrance was stated [8]. More than 5% of individuals lack functional serum MBL, mostly due to homozygosity or compound heterozygosity for three common mutations in exon 1 of the *MBL2* gene [3]. It was even proposed that the high worldwide frequencies of MBL-deficient alleles may be due to random drift, underscoring the evolutionary neutrality of *MBL2* [29]. These data also suggested that MBL is largely redundant in human defenses [23, 29]. As further large studies were carried out, controversial data about the role of MBL deficiency in predisposition to severe infection, particularly to severe sepsis and to meningococcal and pneumococcal infection, were reported [3, 7, 23, 30–37]. Overall, although a role as a modifying factor cannot be excluded, the results suggest that the deficiency is mostly asymptomatic and, in 2011's update of PID [38], it was no longer included. Human and mouse CL-11, but not MBL, drive LP activation on the surface of *S. pneumoniae* and other bacteria, and it increases opsonophagocytosis [39–42]. Patients with autosomal recessive CL-11 or CL-10 deficiency suffer from Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevale (3MC) syndrome, characterized by craniofacial, genital, and often mental defects. However, CL-11- and CL-10-deficient patients, who lack CL-11 or CL-10 secretion, do not manifest a predisposition to infection, autoimmunity, or another immunological phenotype [41, 43–46]. Mutations at the *MASP1* gene were also identified in patients with 3MC syndrome [41, 43, 45, 47, 48]. The *MASP1* gene gives rise to three alternative splice products, MASP-1, MASP-3, and Map-44, which share the first eight exons. However the serine protease domains of MASP-1 (exons 13–18) and MASP-3 (exon 12) are

coded by different exons (no serine protease domain is present in Map-44) [3–5]. Most mutations in *MASP1* in patients with 3MC syndrome lie in the exon 12, unique to MASP-3. However, in nine patients, the mutations disrupt the three protein products [45–48]. Nevertheless, no infectious or autoimmune phenotype was documented in these patients despite the undetectable LP activity due to the absence of MASP-1 [48, 49]. The first patient with ficolin-3 deficiency was reported in 2009 when ficolin-3 levels were measured in a large series of patients with suspected immunodeficiencies [50]. The patient was an adult with recurrent respiratory tract infections and cerebral abscesses. However, he had undergone splenectomy at the age of 20 due to thrombocytopenia, and he had partial IgM deficiency and a low response to pneumococcal polysaccharide vaccine. The deficiency was due to a mutation that is estimated to occur in homozygosity in 1/10,000 individuals. Ficolin-3 deficiency was also considered a PID associated to high susceptibility to recurrent pyogenic infections and to abscesses [2, 25]. Five additional patients with a rather heterogeneous range of clinical manifestations and a healthy control were later found by chance in association studies to have genetically proven ficolin-3 deficiency [51, 52]; a role as a predisposing factor for SLE was recently suggested [52]. Nevertheless, the first reported patient [50] was later diagnosed with genetically proven Wiskott-Aldrich syndrome [3].

MASP-2 deficiency due to homozygosity for p.D120G is estimated to occur approximately in 7 (as in the current study) to 15 in every 10,000 individuals of European origin [14, 21]. This frequency would make MASP-2 deficiency the second most common PID after IgA deficiency, provided that MBL deficiency is not a PID. Nevertheless, MASP-2 deficiency, as the MBL deficiency, seems to merely be a consequence of a common polymorphism.

Our study has several limitations. In our group of CAP patients, most individuals suffered from one only episode of CAP, and hence it does not represent a PID cohort. In addition, patients with a diagnosed PID were excluded from our study, and genetic or immunological studies aimed to the diagnosis of PID were not

carried out to most, particularly adult, patients and controls. A role of MASP-2 deficiency as a potential disease modifier in individuals with additional inherited immune deficiencies or in patients with underlying diseases impairing immune defense mechanisms cannot be ruled out [3]. We cannot either rule out that some of the MASP-2-deficient individuals, even healthy controls, had not yet manifested the disease phenotype. In any event, health status was evaluated in at least four healthy controls aged 19 [20], 29 [13], 37 [9], and 39 [9] years. Remarkably, the 37-year-old healthy control female, a member of the hospital staff [9], is currently 51 years old, and she remains healthy. Conversely, an excess of LP activation might be also harmful due to the possibility of an unbalanced proinflammatory response and an additional host injury. Indeed, the LP, particularly MASP-2, may behave as a double-edged sword and be even detrimental in serious disease conditions such as myocardial infarction, stroke, renal ischemia-reperfusion injury, and rheumatoid arthritis [4, 5, 41, 53]. Interestingly, increased levels of MASP-2 may contribute to poor disease outcome of pneumococcal meningitis [54]. Due to the low frequency of the studied variant, our study lacks statistical power to evaluate its association with outcome of CAP or IPD [7].

Once a PID is suspected in a patient, a molecular, confirmative diagnosis may help to make decisions about management, prognosis, and prophylactic measures, as well as to assist in genetic counseling. Cumulative evidence suggests that MASP-2, and even other components of the LP, are largely redundant in human defenses and that individuals with MASP-2 deficiency do not seem to be particularly prone to infectious or autoimmune diseases. Studies with very large groups of individuals would be required in order to firmly conclude whether MASP-2 deficiency could influence susceptibility to infection in individuals with other primary or secondary defects in components of the immune system.

**Acknowledgments** We are grateful to the patients and healthy individuals for their trust.

**Author Contributions** IG-L carried out experiments, analyzed data, critically discussed the results, and wrote the manuscript. EH-B carried out experiments and analyzed data. CM-A, SP-N, IR-F, OR, MLB, LB, AP, LL, JFr, JFe, and IO provided clinical samples and data. NG-Q carried out experiments. FR and JS-V provided clinical samples and data and critically reviewed the manuscript. CR-G designed the work, critically discussed the results, and wrote the manuscript. All authors reviewed the final version of the manuscript.

**Funding** This work was partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Health (FIS PI13/01456 and PI16/00759 to CR-G, and PI13/01729 to CM-A, with the funding of European Regional Development Fund-European Social Fund -FEDER-FSE), from Grupo DISA (OA18/017) to CR-G, and from SEPAR (Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery-Fundación Española del Pulmón) to FR; EH-B was supported by a grant from Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

**Data Availability** All relevant data is contained within the manuscript. The raw datasets analyzed for this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

## Compliance with Ethical Standards

**Ethics Statement** All procedures were carried out according to the Declaration of Helsinki, and approval was obtained from the Ethic Committee of the Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrin.

**Informed Consent** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References


- Ram S, Lewis LA, Rice PA. Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clin Microbiol Rev*. 2010. <https://doi.org/10.1128/CMR.00048-09>.
- Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10875-017-0464-9>.
- Garred P, Genster N, Pilely K, Bayarri-Olmos R, Rosbjerg A, et al. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol Rev*. 2016. <https://doi.org/10.1111/immr.12468>.
- Oroszlán G, Dani R, Szilágyi A, Závodszy P, Thiel S, Gál P, et al. Extensive basal level activation of complement mannose-binding lectin-associated serine protease-3: kinetic modeling of lectin pathway activation provides possible mechanism. *Front Immunol*. 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01821>.
- Dobó J, Kocsis A, Gál P. Be on Target: strategies of targeting alternative and lectin pathway components in complement-mediated diseases. *Front Immunol*. 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01851>.
- Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Gadjeva M, Møller-Kristensen M, Sørensen R, Jensen LT, et al. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *N Engl J Med*. 2003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022836>.
- García-Laorden MI, Sole-Violan J, Rodríguez de Castro F, Aspa J, Briones ML, García-Saavedra A, et al. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.05.037>.
- Notarangelo L, Casanova JL, Fischer A, Puck J, Rosen F, Seger R, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update. *J Allergy Clin Immunol*. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.06.044>.
- García-Laorden MI, García-Saavedra A, de Castro FR, Violán JS, Rajas O, Blanquer J, et al. Low clinical penetrance of mannose-binding lectin-associated serine protease 2 deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.08.004>.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997. <https://doi.org/10.1002/art.1780400928>.
- Cedzynski M, Szemraj J, Swierczko AS, Bak-Romaniszyn L, Banasik M, Zeman K, et al. Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. *Clin Exp Immunol*. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02453.x>.
- Cedzynski M, Atkinson AP, St Swierczko A, MacDonald SL, Szala A, Zeman K, et al. L-ficolin (ficolin-2) insufficiency is associated with

- combined allergic and infectious respiratory disease in children. *Mol Immunol*. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.08.028>.
13. Sokolowska A, Szala A, St Swierzko A, Kozinska M, Niemiec T, Blachnio M, et al. Mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) deficiency in two patients with pulmonary tuberculosis and one healthy control. *Cell Mol Immunol*. 2015;12:119–21. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.19>.
  14. Olesen HV, Jensenius JC, Steffensen R, Thiel S, Schiøtz PO. The mannan-binding lectin pathway and lung disease in cystic fibrosis—disfunction of mannanbinding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) may be a major modifier. *Clin Immunol*. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.08.014>.
  15. Thiel S, Steffensen R, Christensen IJ, Ip WK, Lau YL, Reason IJ, et al. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun*. 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364373>.
  16. Ytting H, Christensen IJ, Steffensen R, Alsner J, Thiel S, Jensenius JC, et al. Mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 (MASP-2) genotypes in colorectal cancer. *Scand J Immunol*. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02480.x>.
  17. Segat L, Fabris A, Padovan L, Milanese M, Pirulli D, Lupo F, et al. MBL2 and MASP2 gene polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat*. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2007.00965.x>.
  18. Siljan WW, Holter JC, Nymo SH, Husebye E, Ueland T, Skattum L, et al. Low levels of immunoglobulins and mannose-binding lectin are not associated with etiology, severity, or outcome in community-acquired pneumonia. *Open Forum Infect Dis*. 2018. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy002>.
  19. Stover C, Barrett S, Lynch NJ, Barker JN, Burden D, Trembath R, et al. Functional MASP2 single nucleotide polymorphism plays no role in psoriasis. *Br J Dermatol*. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06547.x>.
  20. Olszowski T, Poziomkowska-Gęścicka I, Jensenius JC, Adler G. Lectin pathway of complement activation in a Polish woman with MASP-2 deficiency. *Immunobiology*. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.10.009>.
  21. Świerzek AS, Szala-Póździej A, Kilpatrick DC, Sobociński M, Chojnacka K, Sokołowska A, Michalski M, Mazerant K, Jensenius JC, Matsushita M, Krajewski WR, Szczapa J, Bąk-Romaniszyn L, Zeman K, Cedzyński M. Components of the lectin pathway of complement activation in paediatric patients of intensive care units. *Immunobiology* 2016;221(5):657–669.
  22. Sørensen R, Thiel S, Jensenius JC. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunopathol*. 2005. <https://doi.org/10.1007/s00281-005-0006-z>.
  23. Casanova JL, Abel L. Human genetics of infectious diseases: Unique insights into immunological redundancy. *Semin Immunol*. 2018;36:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.12.008>. Epub 2017 Dec 16.
  24. Casanova JL, Conley ME, Seligman SJ, Abel L, Notarangelo LD. Guidelines for genetic studies in single patients: lessons from primary immunodeficiencies. *J Exp Med*. 2014. <https://doi.org/10.1084/jem.20140520>.
  25. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Ailal F, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, et al. The 2017 IUIS phenotypic classification for primary immunodeficiencies. *J Clin Immunol*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10875-017-0465-8>.
  26. van Schaarenburg RA, Schejbel L, Truedsson L, Topaloglu R, Al-Mayouf SM, Riordan A, et al. Marked variability in clinical presentation and outcome of patients with C1q immunodeficiency. *J Autoimmun*. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.06.002>.
  27. Frank MM, Sullivan KE. Deficiencies of the complement system. In: Sullivan KE, Stiehm R, editors. *Stiehm's immune deficiencies*. Elsevier, Academic Press; 2014, pp. 731–763
  28. Jönsson 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. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.722>.
  29. Verdu P, Barreiro LB, Patin E, Gessain A, Cassar O, Kidd JR, et al. Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of MBL2 deficiency alleles. *Hum Mol Genet*. 2006. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl193>.
  30. García-Laorden MI, Rodríguez de Castro F, Solé-Violán J, Payeras A, Briones ML, Borderías L, et al. The role of mannose-binding lectin in pneumococcal infection. *Eur Respir J*. 2013. <https://doi.org/10.1183/09031936.00174111>.
  31. Luo J, Xu F, Lu GJ, Lin HC, Feng ZC. Low mannose-binding lectin (MBL) levels and MBL genetic polymorphisms associated with the risk of neonatal sepsis: An updated meta-analysis. *Early Hum Dev*. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2014.07.007>.
  32. Zhang AQ, Yue CL, Pan W, Gao JW, Zeng L, Gu W, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms and the risk of sepsis: evidence from a meta-analysis. *Epidemiol Infect*. 2014. <https://doi.org/10.1017/S0950268813003361>.
  33. Lundbo LF, Harboe ZB, Clausen LN, Hollegaard MV, Sørensen HT, Hougaard DM. Mannose-binding lectin gene, MBL2, polymorphisms are not associated with susceptibility to invasive pneumococcal disease in children. *Clin Infect Dis*. 2014. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu276>.
  34. Darton TC, Jack DL, Johnson M, Borrow R, Guiver M, Kaczmarski EB, et al. MBL2 deficiency is associated with higher genomic bacterial loads during meningococemia in young children. *Clin Microbiol Infect*. 2014. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12745>.
  35. Mills TC, Chapman S, Hutton P, Gordon AC, Bion J, Chiche JD, et al. Variants in the mannose-binding lectin gene MBL2 do not associate with sepsis susceptibility or survival in a large European cohort. *Clin Infect Dis*. 2015. <https://doi.org/10.1093/cid/civ378>.
  36. Lundbo LF, Sørensen HT, Clausen LN, Hollegaard MV, Hougaard DM, Konradsen HB, et al. Mannose-binding lectin gene, MBL2, polymorphisms do not increase susceptibility to invasive meningococcal disease in a population of Danish children. *Open Forum Infect Dis*. 2015. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv127>.
  37. Bautista-Rodríguez C, Launes C, Jordan I, Andres M, Arias MT, Lozano F, et al. Mannose-binding lectin-deficient genotypes as a risk factor of pneumococcal meningitis in infants. *PLoS One*. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178377>.
  38. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol*. 2011. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00054>.
  39. Ali YM, Lynch NJ, Haleem KS, Fujita T, Endo Y, Hansen S, et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog*. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002793>.
  40. Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, et al. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun*. 2000. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.688-693.2000>.
  41. Howard M, Farrar CA, Sacks SH. Structural and functional diversity of collectins and ficolins and their relationship to disease. *Semin Immunopathol*. 2018;40:75–85. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0642-0>.
  42. Hwang I, Mori K, Ohtani K, Matsuda Y, Roy N, Kim Y, et al. Collectin kidney 1 plays an important role in innate immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Innate Immun*. 2017. <https://doi.org/10.1159/000453316>.

43. Rooryck C, Diaz-Font A, Osborn DP, Chabchoub E, Hernandez-Hernandez V, Shamseldin H, et al. Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nat Genet.* 2011. <https://doi.org/10.1038/ng.757>.
44. Venkatraman Girija U, Furze CM, Gingras AR, Yoshizaki T, Ohtani K, Marshall JE, et al. Molecular basis of sugar recognition by collectin-K1 and the effects of mutations associated with 3MC syndrome. *BMC Biol.* 2015;13:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0136-2>.
45. Urquhart J, Roberts R, de Silva D, Shalev S, Chervinsky E, Nampoothiri S, et al. Exploring the genetic basis of 3MC syndrome: Findings in 12 further families. *Am J Med Genet A.* 2016. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37564>.
46. Munye MM, Diaz-Font A, Ocaña L, Henriksen ML, Lees M, Brady A, et al. COLEC10 is mutated in 3MC patients and regulates early craniofacial development. *PLoS Genet.* 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006679>.
47. Sirmaci A, Walsh T, Akay H, Spiliopoulos M, Sakalar YB, Hasaneffendioglu-Bayrak A, et al. MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Camevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes. *Am J Hum Genet.* 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.09.018>.
48. Atik T, Koparir A, Bademci G, Foster J 2nd, Altunoglu U, Mutlu GY, et al. Novel MASP1 mutations are associated with an expanded phenotype in 3MC1 syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2015. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0345-3>.
49. Degn SE, Jensen L, Hansen AG, Duman D, Tekin M, Jensenius JC, et al. Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. *J Immunol.* 2012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201736>.
50. Munthe-Fog L, Hummelshøj T, Honoré C, Madsen HO, Permin H, Garred P. Immunodeficiency associated with FCN3 mutation and ficolin-3 deficiency. *N Engl J Med.* 2009. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900381>.
51. Michalski M, Świerzko AS, Pagowska-Klimek I, Niemir ZI, Mazerant K, et al. Primary ficolin-3 deficiency—is it associated with increased susceptibility to infections? *Immunobiology.* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.01.003>.
52. Troldborg A, Steffensen R, Trendelenburg M, Hauser T, Winther KG, Hansen AG, et al. Ficolin-3 deficiency is associated with disease and an increased risk of systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol.* 2019;39:421–9. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00627-2>.
53. Banda NK, Acharya S, Scheinman RI, Mehta G, Takahashi M, Endo Y, et al. Deconstructing the lectin pathway in the pathogenesis of experimental inflammatory arthritis: essential role of the lectin ficolin B and mannose-binding protein-associated serine protease 2. *J Immunol.* 2017. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700119>.
54. Kasanmoentalib ES, Valls Seron M, Ferwerda B, Tanck MW, Zwinderman AH, Baas F, et al. Mannose-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *J Neuroinflammation.* 2017;14:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0770-9>.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Affiliations

M. Isabel García-Laorden<sup>1,2</sup> · Elisa Hernández-Brito<sup>3,4</sup> · Carmen Muñoz-Almagro<sup>5,6,7</sup> · Svetlana Pavlovic-Nesic<sup>8</sup> · Iñigo Rúa-Figueroa<sup>9</sup> · M. Luisa Briones<sup>10</sup> · Olga Rajas<sup>11</sup> · Luis Borderías<sup>12</sup> · Antoni Payeras<sup>13</sup> · Leonardo Lorente<sup>14</sup> · Jordi Freixinet<sup>15</sup> · Jose Ferreres<sup>16</sup> · Ignacio Obando<sup>17</sup> · Nereida González-Quevedo<sup>3</sup> · Felipe Rodríguez de Castro<sup>4,18</sup> · Jordi Solé-Violán<sup>1,19</sup> · Carlos Rodríguez-Gallego<sup>3,20</sup> 

<sup>1</sup> CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Research Unit, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>3</sup> Department of Immunology, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>4</sup> Department of Medical and Surgical Sciences, School of Medicine, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>5</sup> Paediatric Infectious Diseases Research Group, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Spain

<sup>6</sup> CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>7</sup> School of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

<sup>8</sup> Department of Pediatrics, Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>9</sup> Rheumatology Service, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>10</sup> Department of Respiratory Diseases, Hospital Clínico y Universitario de Valencia, Valencia, Spain

<sup>11</sup> Department of Respiratory Diseases, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spain

<sup>12</sup> Department of Respiratory Diseases, Hospital San Jorge, Huesca, Spain

<sup>13</sup> Department of Internal Medicine, Hospital Son Llatzer, Palma de Mallorca, Spain

<sup>14</sup> Intensive Care Unit, Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Spain

<sup>15</sup> Department of Thoracic Surgery, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>16</sup> Intensive Care Unit, Hospital Clínico y Universitario de Valencia, Valencia, Spain

<sup>17</sup> Department of Pediatrics, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

<sup>18</sup> Department of Respiratory Diseases, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

# **IX. ANEXOS**

---

## **Resumen**





*Streptococcus pneumoniae* es una bacteria encapsulada Gram positiva que frecuentemente se encuentra formando parte de la microbiota de la nasofaringe de forma transitoria y asintomática, pero que puede migrar a tejidos y órganos estériles y causar enfermedades neumocócicas invasivas (ENI) o no invasivas. *S. pneumoniae* ha desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmunológica, entre los que destacan las diferencias antigénicas de los polisacáridos capsulares. Actualmente son muchas las evidencias que sugieren un elevado componente hereditario del huésped en la susceptibilidad a las infecciones y en la gravedad con la que cursa la infección. Existen distintos tipos de herencia implicados en la predisposición a la infección que pueden clasificarse en monogénica (un solo gen implicado), o poligénica (varios genes implicados). Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son un claro ejemplo de predisposición genética al desarrollo de enfermedades con un patrón de herencia monogénico. En los últimos años se ha demostrado que la incidencia de las IDP es sensiblemente mayor de lo que se sospechaba, y se ha visto que algunas IDP pueden predisponer especialmente a neumococo. Por otro lado, demostrar que una enfermedad está asociada a una predisposición poligénica es difícil, ya que, por un lado se requiere realizar estudios de asociación (caso-control) con gran tamaño muestral, y por el otro la baja penetrancia de cada gen y los efectos aditivos de estos pueden enmascarar los resultados. Los estudios llevados a cabo para investigar las posibles predisposiciones poligénicas a enfermedades se han llevado a cabo mediante el análisis de variaciones de un solo nucleótido (SNV). El sistema del complemento es un mecanismo de defensa crucial en la defensa del huésped contra los microorganismos. No obstante, una activación en exceso o en defecto puede ser perjudicial para el huésped y provocar en él enfermedades autoinmunes o inflamatorias crónicas y aumentar la susceptibilidad a infecciones. Diversas SNVs en el sistema de complemento se han asociado a enfermedades inflamatorias crónicas. Sin embargo, solo unas pocas variantes distintas de las clasificadas como IDP se han asociado con infecciones bacterianas. Hoy en día todavía existe controversia en cuanto al papel de la vía de las lectinas (MASP-2, MBL) en la predisposición a infección y autoinmunidad.

El primer objetivo abordado en esta Tesis Doctoral ha sido realizar un estudio de asociación genética para investigar el papel de variantes genéticas del sistema del complemento en la susceptibilidad a neumonía adquirida en la comunidad (NAC), en concreto a NAC neumocócica (NNAC) en adultos. El segundo objetivo ha consistido en la recogida de datos clínicos y epidemiológicos, así como en la realización de estudios inmunológicos a pacientes pediátricos con ENI grave, incluso con un solo episodio, con la finalidad de analizar la incidencia de factores de riesgo clásicos e IDP en esta población. Con el fin de elucidar las

consecuencias clínicas de la deficiencia de MASP-2, el tercer objetivo fue analizar la presencia de la mutación p.D120G en diferentes grupos de pacientes adultos y pediátricos, así como en individuos sanos y analizar el efecto causal de la deficiencia de MASP-2.

A partir de los resultados obtenidos, esta Tesis Doctoral confirma la hipótesis planteada: las variantes de baja actividad de complemento rs547154-T del gen C2, en completo desequilibrio de ligamiento con la variante fBR32Q (rs641153-A) y rs2230199-C (C3<sub>102R</sub>) del gen C3, que se han vinculado a un papel protector frente a enfermedades inflamatorias mediadas por complemento, se asocian a un mayor riesgo de desarrollar NAC, en particular NNAC. El sistema del complemento es por tanto un arma de doble filo: un sistema poco activo favorece el riesgo de infección (NNAC), mientras que un sistema de complemento activado predispone a enfermedades inflamatorias. Además, este trabajo ha permitido demostrar que la presencia de una ENI grave en un niño, debe hacernos evaluar la posibilidad de una IDP, aunque el paciente no cumpla los criterios clásicamente utilizados de sospecha de IDP. Por último, los resultados obtenidos sugieren que la deficiencia de MASP-2 no es por sí sola una IDP o, en cualquier caso, que su penetrancia clínica sería muy baja.

**Palabras clave:** enfermedades neumocócicas invasivas (ENI), inmunodeficiencias primarias (IDP), neumonía adquirida en la comunidad (NAC), neumonía neumocócica adquirida en la comunidad (NNAC), variaciones de un solo nucleótido (SNV), herencia monogénica, herencia poligénica.

# **IX. ANEXOS**

---

## **Summary**



*Streptococcus pneumoniae*, Gram positive encapsulated bacteria, is a common colonizer of the human nasopharynx. Although frequently asymptomatic, it can migrate to sterile tissues and organs and cause non-invasive or invasive pneumococcal disease (IPD). *S. pneumoniae* has evolved numerous mechanisms to evade the immune response, such as the antigenic differences of capsular polysaccharides. Currently there are evidences that suggests a high hereditary component of the host in the susceptibility to infections and in the severity with which the infection occurs. There are different types of inheritance involved in the predisposition to infection that can be classified as monogenic (a single gene involved), or polygenic (several genes involved). Primary immunodeficiencies (IDP) are a clear example of genetic predisposition to diseases with a monogenic inheritance pattern. In recent years, the incidence of PIDs has been shown to be significantly higher than previously suspected, and it has been found that some PIDs can especially predispose to pneumococcus. Demonstrating that a disease is associated with a polygenic predisposition is difficult, since, on the one hand, association studies (case-control) with large sample sizes are required, and on the other hand, the low penetrance of each gene and their additive effects can mask the results. Studies carried out to investigate possible polygenic predispositions to diseases have been carried out by analyzing single nucleotide variations (SNV). The complement system is an important mechanism against microorganisms in human immunity. However, over or under activation can be detrimental to the host, causing autoimmune or chronic inflammatory diseases or increasing the risk for infection. Several SNVs in the complement system have been associated with chronic inflammatory diseases. However, only a few variants, other than those classified as IDP, have been associated with bacterial infections. There is currently controversy over the role of the lectin pathway (MASP-2, MBL) in the predisposition to infection and autoimmunity.

The first objective in this Doctoral Thesis has been to carry out a genetic association study to investigate the role of genetic variants of the complement system in the susceptibility to community-acquired pneumonia (CAP), specifically to pneumococcal CAP in adults. The second objective in the present work has been the collection of clinical and epidemiological data, as well as the performance of immunological studies, in pediatric patients with severe IPD, even with only one episode, in order to analyze the incidence of classical risk factors and IDP in this population. In order to elucidate the clinical consequences of MASP-2 deficiency, the third objective has been to analyze the presence of the p.D120G mutation in different groups of adult and pediatric patients, as well as in healthy individuals, and to analyze the causal effect of IDP produced by MASP-2 deficiency.

This Doctoral Thesis confirms the hypothesis: the variants of low complement activity rs547154-T of the *C2* gene, in complete linkage disequilibrium with the variant fBR32Q (rs641153-A), and rs2230199-C (*C3*<sub>102R</sub>) of the *C3* gene, which have been associated with a protective role against complement-mediated inflammatory diseases, are in turn associated with a higher risk for CAP, particularly NNAC. The complement system is therefore a double-edged sword: an inactive system favors the risk for infection (PCAP), while an activated complement system predisposes to inflammatory diseases. In addition, this work has shown that the presence of a severe IPD in children should make us evaluate the possibility of an IDP even if the patient does not meet the classically used criteria for suspected of IDP. Finally, the results obtained suggest that MASP-2 deficiency is not in itself an IDP or that its clinical penetrance is very low.

**Keywords:** invasive pneumococcal diseases (IPD), primary immunodeficiencies (IDP), community acquired pneumonia (CAP), pneumococcal community acquired pneumonia (PCAP), single nucleotide variants (SNV), monogenic inheritance, polygenic inheritance.





