

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Evaluación de alteraciones genéticas y de la inmunidad innata
humoral y celular de pacientes sometidos a trasplante
cardíaco**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ikram Ezzahouri El Kahlouki

Director

Javier Alberto Carbone Campoverde

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN DE ALTERACIONES GENÉTICAS Y DE LA INMUNIDAD INNATA
HUMORAL Y CELULAR DE PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

IKRAM EZZAHOURI EL KHALOUKI

DIRECTOR

JAVIER ALBERTO CARBONE CAMPOVERDE

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN DE ALTERACIONES GENÉTICAS Y DE LA INMUNIDAD INNATA
HUMORAL Y CELULAR DE PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

IKRAM EZZAHOURI EL KHALOUKI

DIRECTOR

JAVIER ALBERTO CARBONE CAMPOVERDE

*“El éxito en la vida no se mide por lo que logras
sino por los obstáculos que superas”.*

Jaime Cardoso

A Dios y mis hijos,
mi motor, mi sol
y el orgullo más grande

AGRADECIMIENTOS

Se cierra un ciclo y una etapa que espere tanto tiempo, en estos años pasaron cosas que sin duda supusieron un gran reto para poder finalizar este trabajo. Dos maternidades y algo que nos afectó a todos, la pandemia de COVID-19.

En primer lugar, quiero dar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis Dr. Javier Carbone por confiar en mí, dejarme aprender, por inculcarme la idea de simplificar de lo general a lo particular, en busca de la solución. Por todo el esfuerzo y la dedicación para hacer que esto llegue a su fin, mil gracias.

A la Dra. Elizabeth Sarmiento Marchese por enseñarme la metodología científica. Por tener una visión global de las cosas, gracias por esas charlas que tanto me hicieron reflexionar, para mejorar en todos los aspectos. Os llevare siempre en mi corazón, aparte de excelentes profesionales, sois grandísimas personas.

Por el asesoramiento técnico-científico a la Dra. Carmen Rodríguez-Sainz por apoyar y ayudarme a entender este complejo mundo de la genética. Y por la estancia realizada en su Unidad.

Al Dr. Joaquín Navarro por su asesoría y aspectos logísticos. Al Dr. Antonio Gallego por su inestimable ayuda en la parte celular de inmunidad innata.

Al colaborador externo Dr. Francisco Lozano por su apoyo inicial al estudio genético de MBL y por facilitarnos datos de controles sanos del área de Barcelona. A la Dra. Diana Hernández Flórez por su aportación a este trabajo. A todo el personal del Servicio de Inmunología, Cardiología, Microbiología, y de las Unidades de Enfermería.

A los pacientes, gracias, sin su colaboración nada de esto sería posible.

A mi tutora, la Dra. Narcisa Martínez Quiles, y a la coordinadora del presente programa de doctorado de la UCM la Dra. María Ángeles Vicente, por resolver siempre las dudas, por su ayuda y por los trámites.

Agradezco al Hospital General Universitario Gregorio Marañón y al Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital por todo el apoyo aportado para el desarrollo del presente trabajo y por la tramitación de contratos que me permitieron hacerlo.

A Olga y José, los técnicos de laboratorio de Inmunogenética que me ayudaron al desarrollo del trabajo y por su predisposición a dejarme un hueco para poder procesar las muestras.

A mis compañeros Boris, Sergiu, Mariale, Paulina, Leticia, Sandra, Alba, Rocío, Kristoffer y Sergi por acompañarme en el camino.

XII

A Elena, esa compañera que conocí durante el desarrollo de este trabajo, y que me sirvió para conocer una excelente persona, y como estábamos pasando por lo mismo, siempre nos apoyábamos y nos desahogamos juntas en esos duros momentos, aunque sea por audios de WhatsApp que tanto consuelan. ¡Mil gracias por escucharme, aconsejarme y animarme sobretodo en esa etapa final de reclusión! Una amistad que seguirá.

A mi familia, en especial a mis padres por todo su esfuerzo, mi madre me enseñó valores esenciales como la perseverancia, trabajo y sacrificio.

A mi padre que se fue hace ya unos años, pero sin duda nos quiso tanto que vivirá eternamente en nuestro recuerdo, y sé que desde arriba velará por nosotros, y estará orgulloso.

A mis hijos Anir e Izar que se gestaron durante este periodo, y que de alguna manera fueron mi mayor fuerza para poder acabar y no “tirar nunca la toalla”, dedicado a ellos.

Y por supuesto, a ti Wahim, mi compañero de viaje, te agradezco tanto por estar siempre allí incondicionalmente.

A todos ustedes, y a los que no nombré, les digo ¡gracias!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
SUMMARY	7
 I. INTRODUCCIÓN.....	 11
1. El trasplante cardiaco	13
2. Infecciones en trasplante de órgano solido	17
3. Respuesta de inmunidad innata a la infección en trasplante	19
4. Descripción de biomarcadores de inmunidad innata estudiados en la tesis doctoral	20
4.1. Lectina Fijadora de Manosa MBL	20
4.1.1. Estructura de la MBL	22
4.1.2. Polimorfismos en el gen <i>MBL2</i>	25
4.2. Activación del complemento	30
4.2.1. La vía clásica de activación del complemento	31
4.2.2. La activación de la vía de la lectina	31
4.2.3. Vía alternativa	35
4.3. Gen antagonista del receptor de interleucina-1 <i>IL1RN</i>	35
4.3.1 Estructura de la proteína IL-1Ra	36
4.3.2 Variantes de la proteína <i>IL-1Ra</i> y su receptor	36
4.3.3. Polimorfismos <i>IL1RN</i>	38
4.4. Receptores tipo toll (TLR)	42
4.4.1 Células dendríticas	43
4.4.2 Monocitos	44
5. Superfamilia de receptores tipo toll y su relacion de señalizacion con IL-1r y con la MBL	46
5.1. TLRs y IL1R	46
5.2. TLRs y MBL	48
6. Tratamiento inmunosupresor	49
7. Profilaxis antimicrobiana	50
8. Biomarcadores de riesgo en TOS	53
8.1. MBL	53
8.2. <i>IL1RN</i>	54
8.3. TLRs	54
8.4. Activación de monocitos	56

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57
1. Hipótesis	59
2. Objetivos	59
2.1. Objetivos generales	60
2.2. Objetivos específicos	60
III. MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. Diseño de los estudios.....	63
2. Pacientes	66
3. Metodología del estudio de las variantes alélicas de los genes <i>MBL2</i> e <i>IL1RN</i>	67
3.1. Extracción de DNA genómico.....	67
3.2. Genotipado de <i>MBL2</i>	67
3.2.1. Amplificación mediante PCR de <i>MBL2</i>	67
3.2.2. Secuenciación del fragmento de <i>MBL2</i>	69
3.2.3. Interpretación de los resultados de secuenciación y asignación de genotipos	70
3.3. Genotipado de <i>IL1RN</i>	73
4. Estudio del análisis en suero de MBL.....	75
5. Material y método del estudio de TLRs /activación monocítica	78
5.1. Material de citometría de flujo	78
5.2. Método del estudio	79
6. Análisis estadístico	81
7. Procedimiento de reclutamiento, recepción de muestras, seguimiento y recogida de datos.	83
8. Periodo de realización	83
9. Control de calidad de datos clínicos.....	84
10. Confidencialidad, etica y consentimiento informado	84
11. Limitaciones	84
IV. RESULTADOS.....	85
Estudio 1. Caracterización cinética de la concentración sérica de MBL pre-post TC, y genotipos: implicación clínica	87
1.1. Características clínicas de los pacientes	87
1.1.1. Concentraciones séricas y etiología del trasplante	89
1.1.2. Concentraciones séricas de MBL y clínica	89
1.2. Correlación de concentraciones de la población estudiada con población control procedentes de donantes de sangre como referencia	90
1.3. Correlación fenotipo versus genotipo	91
1.4. Correlación fenotipo versus indicadores inmunocompetencia	92
1.5. Asociación entre concentraciones de MBL e infección	93
1.6. Asociación entre concentraciones de MBL e infección: factores de riesgo asociados	95
1.6.1. Infección por CMV post trasplante cardiaco durante el primer año.....	96

1.6.2. Infección bacteriana post trasplante cardiaco durante el primer año	98
1.6.3. Infección recurrente post trasplante cardiaco durante el primer año	100
Estudio 2. Estudio del genotipo de <i>IL1RN</i> para establecer la prevalencia de mutaciones.	103
2.1. Características demográficas y clínicas de los pacientes	103
2.2. Frecuencia relativa de los genotipos y alelos	105
2.3. Asociación del alelo <i>B</i> con variables clínicas	105
2.3.1. Alelo <i>B</i> y riesgo de muerte asociado	107
Estudio 3. Caracterización cinética de la expresión de TLR2 y TLR4 en distintas subpoblaciones celulares.	111
3.1. Características clínicas de los pacientes	111
3.2. Expresión de TLR2 y TLR4 en distintas subpoblaciones celulares.	113
3.2.1 Expresión basal de TLR2	114
3.2.2. Expresión basal de TLR4.	114
3.2.3. Cinética de expresión de TLR2 y TLR4 en distintas subpoblaciones en distintos tiempos post TC.	115
3.2.4 Expresión de TLR2 y TLR4 en TC frente a controles sanos.	116
3.2.4. Posible implicación clínica	118
3.2.5. Cinética de células dendríticas en trasplante cardiaco	120
Estudio 4. Cinética de subpoblaciones activadas de monocitos y su correlación clínica con variables clínicas.	121
V. DISCUSIÓN	127
VI. CONCLUSIONES	141
VII. BIBLIOGRAFÍA	145
VIII. ANEXOS	163
ANEXO 1. Gen "MBL2" del nucleótido 1 hasta el 7869.	165
ANEXO 2. Hoja de información al paciente y consentimiento informado (Versión 2.0)	171
ANEXO 3. Tabla donde se recogen características del fenotipo/genotipo MBL en distintos estudios	174
ANEXO 4. Tablas suplementarias de la distribución de infecciones en Estudio 1 (MBL)	178
ANEXO 5. Relación de trabajos presentados en Congresos Nacionales e Internacionales por la doctoranda	180

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Exposiciones epidemiológicas relevantes para el trasplante. Fuente: J. A. Fishman 2017 ¹⁰	18
Tabla 2. Algunos microorganismos clínicamente relevantes reconocidos por la lectina de unión a manosa ^{35,36,37,38,39,40,41, 42}	22
Tabla 3. Ubicaciones y alelos de las 6 variantes de <i>MBL2</i> . Fuente: Aino Rantala et al 2008 ⁶⁷	27
Tabla 4. IL-1Ra como agente terapéutico disponible para la modulación de la actividad de IL-1. Fuente: Int. J. Mol. Sci. 2022 ¹¹³ . www.clinicaltrials.gov (accessed on 23 December 2021). 1. Aprobación de la FDA para indicación terapéutica; 2. Ensayo clínico. (CAPS) Síndrome periódico asociado a criopirina.	41
Tabla 5. Receptores TLRs y sus ligandos microbianos asociados. Fuente: Jane A Mitchell et al 2007 ¹³⁴	42
Tabla 6. Abordaje diagnóstico y terapéutico de las enfermedades infecciosas en receptores de trasplante de órgano sólido. Fuente: Modificado de Timsit et al 2019 ⁸	52
Tabla 7. Procedimiento recomendado en la purificación del kit Roche	69
Tabla 8. Procedimiento recomendado del ELISA de MBL	76
Tabla 9. Caracterización inmunofenotípica de los pacientes de trasplante cardíaco.	79
Tabla 10. Características Clínicas de la población de trasplantados cardíacos estudiada	88
Tabla 11. Asociación entre concentraciones pre-trasplante de MBL y la etiología del trasplante	89
Tabla 12. Asociación entre concentraciones pre-trasplante de MBL y variables clínicas	89
Tabla 13. Frecuencia de haplotipos <i>MBL2</i> en la población estudiada y en una población de donantes de sangre como referencia del área de Barcelona (n=101).	90
Tabla 14. Frecuencia de genotipos <i>MBL2</i> en la población estudiada y en una población de donantes de sangre como referencia del área de Madrid (n=61) y Barcelona (n=101).	91
Tabla 15. Comparación de concentraciones de MBL con controles sanos	91
Tabla 16. Correlación genotipo fenotipo de MBL. Concentración sérica pre-trasplante (ng/ml) y genotipo asociado a producción de MBL.	92
Tabla 17. Correlación entre concentraciones pre-trasplante de MBL y parámetros de inmunocompetencia.	93
Tabla 18. Asociación entre concentraciones séricas de MBL e infección por CMV	94
Tabla 19. Asociación entre concentraciones séricas de MBL e infección bacteriana.	94
Tabla 20. Asociación entre concentraciones séricas de MBL e infecciones recurrentes	95
Tabla 21. Regresión logística de asociación entre genotipo de producción insuficiente o baja de MBL* con varias variables de resultado clínico	95
Tabla 22. Regresión logística univariable de variables asociadas a riesgo de desarrollo de infección por CMV post trasplante cardíaco durante el primer año.	96
Tabla 23. Regresión logística multivariable de variables asociadas a riesgo de desarrollo de infección por CMV post trasplante cardíaco durante el primer año.	97
Tabla 24. Regresión logística univariable de variables asociadas a riesgo de desarrollo de infección bacteriana post trasplante cardíaco durante el primer año	99

Tabla 25. Regresión logística multivariable de variables asociadas a riesgo de desarrollo de infección bacteriana post trasplante cardiaco durante el primer año	100
Tabla 26. Regresión logística univariable de variables asociadas a riesgo de desarrollo de infección recurrente post trasplante cardiaco durante el primer año	101
Tabla 27. Regresión logística multivariable de variables asociadas a riesgo de desarrollo de infección recurrente* post trasplante cardiaco durante el primer año	102
Tabla 28. Estudio Genético de Receptor de Antagonista de IL-1. Características demográficas y Clínicas	104
Tabla 29. Frecuencia de polimorfismo del receptor de antagonista de IL-1.	105
Tabla 30. Frecuencias de Alelos 1 y 2 del receptor de antagonista de IL-1.	105
Tabla 31. Asociación entre presencia de alelo B del genotipo del receptor para antagonista de IL-1 con varias variables de resultado clínico y de laboratorio.	106
Tabla 32. Regresión logística de asociación entre alelo B del genotipo del receptor para antagonista de IL-1 con varias variables de resultado clínico	106
Tabla 33. Correlación (diferencia de medias*) entre la presencia del alelo B del receptor del antagonista de IL-1 y concentraciones pre-trasplante de parámetros de inmunocompetencia	107
Tabla 34. Regresión logística univariable de variables asociadas a riesgo de muerte post trasplante cardiaco	108
Tabla 35. Regresión logística multivariable de variables asociadas a riesgo de muerte post trasplante cardiaco*	109
Tabla 36. Evaluación de una variable combinada inmunológica de riesgo de muerte	110
Tabla 37. Estudio Celular de Cinética de Receptores Tipo Toll en Trasplante Cardiaco. Características Clínicas.	112
Tabla 38. Coeficiente de correlación de Spearman's para TLR2 sobre CDm y CDp	113
Tabla 39. Regresión logística univariable de variables asociadas a riesgo de muerte post trasplante cardiaco	118
Tabla 40. Estudio Celular de Cinética de Monocitos Activados en Trasplante Cardiaco. Características Clínicas	121
Tabla 41. Regresión logística univariable de variables asociadas a riesgo de infección bacteriana recurrente post trasplante	125
 Tabla Suplementaria 1. Distribución de tipo de infecciones recurrentes según la etiología. Estudio 1 .	178
Tabla Suplementaria 2. Distribución de microorganismos en las infecciones recurrentes. Estudio 1	178
Tabla Suplementaria 3. Distribución de tipo de infecciones recurrentes según tipo de clínica infecciosa. Estudio 1	179

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Actividad de trasplante cardiaco en España. 1989-2021. Números absolutos y procedimientos por millón de población (pmp). Fuente: ONT. Datos 2021.	14
Figura 2. Número de trasplantes de corazón (adultos y pediátricos) por año y región geográfica. 1988-2017. Fuente: Registro de Trasplantes de la ISHLT 2019 ⁶	14
Figura 3. Porcentajes de trasplantes de órganos sólidos. Fuente: GLOBAL REPORT ON ORGAN DONATION AND TRANSPLANTATION 2020. Obtenido a través de la web GODT. 93 países que representaban el 80% de la población mundial.	15
Figura 4. Actividades de trasplante de corazón. Cifras absolutas (entre paréntesis) y tasas por millón de población (pmp). N= 57 países. Fuente: GLOBAL REPORT ON ORGAN DONATION AND TRANSPLANTATION 2020. Obtenido a través de la web GODT.	16
Figura 5. Funciones de MBL. Fuente: Kravitz et al 2006 ²¹	20
Figura 6. Se muestra estructura de MBL y de las ficolinas. Fuente: Beltrame et al, 2015.	23
Figura 7. Se muestra la variedad de las lectinas, solubles, transmembrana e intracelulares. Fuente: Yang Liu et al 2015.	24
Figura 8. Muestra el gen humano MBL-2 y el producto proteico codificado. Se indican también las posiciones de polimorfismos del exón 1 y los promotores. Fuente: Dommett RM et al 2006.	25
Figura 9. Análisis 3D del monómero de proteína MBL para residuo salvaje y variante en la posición 54 (variante predominante a concentración global); A) Gly 54 (color rojo), forma tres enlaces de hidrogeno (líneas azules, indicadas con líneas de puntos blancos) con residuos cercanos Asp 53 (color azul cielo), Glu 58 y Lys 59 (color morado). B) una red de choques (líneas amarillas, indicadas con líneas de puntos blancas) entre el residuo variante Asp 54 (color verde) con Gly 48 y Asp 53 (color azul cielo). Fuente: Kalia, N. et al 2016 ⁵⁶	26
Figura 10. Estructura genética y funcional de MBL. Fuente: Lee H Bouwman, Bart O Roep, Anja Roos 2006 ⁷¹	28
Figura 11. Ilustra la frecuencia de los distintos haplotipos en poblaciones seleccionadas y destaca el grado de variación étnica. Fuente: R. M. Dommett et al. 2006 ⁴⁷ modificado.	29
Figura 12. Distribución en porcentajes de los siete haplotipos de MBL en diferentes poblaciones seleccionadas. En general, los haplotipos asociados con mutaciones de sentido erróneo (HYPD, LYQC y LYPB) o regulatorias (LXPA) son muy comunes, con frecuencia superan el 30 % en muchas áreas del mundo. Fuente: Casanova and Abel 2004 ⁷²	29
Figura 13. Las vías clásica, de la lectina y alternativa convergen en una vía final común cuando la C3 convertasa (C3) escinden C3 en C3a y C3b. Ac = anticuerpo; Ag = antígeno; C1-INH = inhibidor de C1; MAC = complejo de ataque a la membrana; MASP = serina proteasa asociada a MBL; MBL = lectina de unión a manosa. Fuente: pagina web: https://www.msdmanuals.com (Complement System)	30

Figura 14. Vía de las lectinas en la activación del complemento. En la MBL y las ficolinas se producen cambios conformacionales tras la interacción con glicoproteínas virales a través de residuos de manosa y N -acetilglucosamina asociados con glucano, respectivamente. Esto activa MASP-1 seguido de MASP-2, que inicia una cascada de escisión de factores del complemento, con funciones en la opsonización, la inflamación y la lisis de células infectadas y de patógenos. Fuente: Christopher P. Mason and Alexander W. Tarr. 2015 ³⁵	31
Figura 15. En la figura 15 se muestra la proteína MBL (en verde) asociada con un homodímero MASP-1 con sus dominios de serina proteasa SP (en naranja) que sobresalen de los tallos de colágeno MBL. Fuente: Goran Bajic et al 2015 ⁷⁴	32
Figura 16. Base estructural de la activación del complemento en la ruta de lectinas, La superposición de las estructuras del complejo MBL/MASP-1. A) homodímero de MASP, B) complejo MBL/MASP inactivo, C) complejo MBL/MASP activado. Fuente: Alexandre R. Gingras et al 2011 ⁷⁵ . . .	33
Figura 17. Base estructural de la activación del complemento en la ruta de lectinas, A) estructura dominio CUB2 de MASP. la estructura cristalina del dominio CUB2 (sobresalen del tallo MBL), es un sándwich β que comprende nueve cadenas β , β_2 – β_{10} , unidas por 9 bucles L1–L9, y con enlaces disulfuro entre cadenas que conectan el bucle L1 con la cadena β_4 y el bucle L5 con el bucle L7. El Ca^{2+} está unido a un extremo, intercalado entre los bucles L5 y L9, coordinado con seis ligandos (dos moléculas de agua); dispuestos en una bipirámide tetragonal, su función primero estabiliza los bucles de unión L5 y L9, de MASP y segundo, coordina la disposición específica de residuos ácidos que contactan con la MBL. B) Estructura cristalina de MASP-1 CUB2 (verde) unida al péptido 1 similar al colágeno MBL (blanco). El dominio CUB2 se encuentra principalmente en el exterior del cono creado por las subunidades MBL (izquierda). Fuente: Alexandre R. Gingras et al 2011 ⁷⁵	34
Figura 18. Estructura 3D de IL-1Ra y su complejo de unión con su receptor IL-1R1. Fuente: Barkes-tani et al 2021 ⁹²	36
Figura 19. Estructura del exón/intrón de la IL- 1RN humana y las diversas variantes de empalme de los mismos. Fuente: Gibson et al. 2012 ⁹⁹ . sIL-1RN forma soluble antagonista del receptor de IL1; icIL-1RN1, icIL-1RN2, icIL-1RN3 formas intracelulares antagonista del receptor IL1: 1, 2 y 3 respectivamente	37
Figura 20. Muestra la estructura, función, señalización e interacciones de la familia de receptor IL1. Fuente: Khazim et al. 2018 modificado	38
Figura 21. Diagrama esquemático del gen <i>IL1RN</i> que muestra la posición del polimorfismo VNTR junto con varios alelos. Fuente: Deepika Jaiswal et al 2013 modificado ¹⁰¹	39
Figura 22. Se observa la frecuencia alélica de la población. Estudio realizado en Munich, Alemania; el 88,6% de los pacientes eran de nacionalidad alemana, el 7,6% eran de nacionalidad turca y el resto de bosnia, grecia, croata o serbia. Fuente: Rad et al.2003 ¹⁰²	40
Figura 23. Tratamiento bloqueador de interleucina-1 (IL-1). Anakinra, una forma recombinante del antagonista del receptor de IL-1 humana IL-1 (IL-1Ra). Fuente: Ignacio Rego-Pérez et al 2009 ¹¹²	40
Figura 24. Esquema representativo de las líneas de diferenciación de los distintos componentes celulares del sistema inmune. NK: <i>natural killer</i> J. Monserrat Sanz et al 2017 ¹⁵	43

Figura 25. Lista de marcadores de interés para la identificación de monocitos en función de su estado de maduración y activación. Las flechas muestran el progreso de la maduración de izquierda a derecha. Fuente: C. Lambert et al, 2017 ¹³⁵ modificado.	44
Figura 26. Imágenes 3D de las células de inmunidad innata para el estudio de expresión de TLR. Fuente: https://gskpro.com/es-es/landing-bancoimagenes/	45
Figura 27. Modelo de formación del señalosoma TLR/IL-1R: MyD88: IRAK. A) Organización de dominios de los miembros de la familia TLR/IL-1R (arriba), MyD88 (centro) e IRAK (abajo). B) Modelo de señalización TLR/IL-1R. Arriba a la izquierda: IL-1RI (rosa) unido a IL-1β (amarillo) y co-receptor IL-1RacP (verde claro). Arriba a la derecha: dímero TLR1 (cian)/TLR2 (verde) unido a lipopéptido (magenta). Los dominios TIR del receptor citosólico interactúan con los TIR MyD88 (azul claro) para promover la formación del complejo DD de Myddosome. Los DD MyD88 (azul) se oligomerizan con IRAK4 (rojo) e IRAK1/2 (naranja) para promover la fosforilación y activación de los dominios quinasa IRAK (abajo a la derecha). Fuente: Ferrao et al. 2012 ¹⁵⁹	47
Figura 28. Señalización TLR/IL1R, que comparten vía MyD88. Fuente: Ramadan and Paczesny 2015 ¹⁶³	48
Figura 29. Respuestas inmunitarias innatas iniciadas por TLRs celulares y los patrones reconocimiento moleculares solubles PRMs extracelulares, como MBL. Fuente: Peng Zhang 2015 ¹⁷⁰	49
Figura 30. Cronograma de los fármacos inmunosupresores en trasplante. Fuente: H. PARLAKPINAR AND M. GUNATA 2021 ¹⁷²	50
Figura 31. Se describen potenciales vías aloinmunes activadas por TLR. La injuria aguda por stress oxidativo (por muerte cerebral o isquemia) inducen DAMPs que activan TLR expresados sobre células mononucleares, los que producen citoquinas y factores de crecimiento, amplificando la activación de TLR. La generación de DAMP, que pueden interactuar con las células innatas que expresan TLR promueve una lesión crónica. APC, célula presentadora de antígeno; DAMP, patrón molecular asociado al peligro; RI, lesión por isquemia-reperfusión; TLR, receptor tipo Toll. Fuente: Jeremy S. Leventhal and Bernd Schroppel 2012 ²⁰⁴	55
Figura 31: Visualización con luz UV de un gel de electroforesis, obtenido en el laboratorio, del fragmento de 969 pb abarcando desde el promotor hasta el final del exón 1 del <i>MBL2</i> . Se muestra el pocillo de peso molecular, las muestras y el control de agua (donde no se añade ADN al tubo).	68
Figura 32. Detalle SNPs mencionados anteriormente para los polimorfismos de <i>MBL2</i>	70
Figura 33. Cromatograma del visor Chromas en el cual cada base nitrogenada corresponde con un color (obtenido de una muestra de laboratorio).	71
Figura 34. Foto pantalla para la selección de las características de obtención secuencias de la zona codificante y consiguiente localización de los 3 codones descritos.	72
Figura 35. Foto pantalla de las secuencias de la zona codificante y consiguiente localización de los 3 codones descritos (obtenido de una muestra de laboratorio).	73
Figura 36. Visualización con luz UV de un gel de agarosa (obtenido en el laboratorio), en estas muestras salen bandas del alelo 1 en el intrón 2 del gen <i>IL1RN*</i> (wild type); el número variable de repeticiones en tándem (VNTR).	74

Figura 37. Foto tomada por mi compañera Sandra García, mientras yo procesaba una de las placas ELISA de MBL.	75
Figura 38. Foto de dos placas MBL que se obtuvo en el laboratorio del día 30/07/2019, color azul con el sustrato cromogénico tetrametilbencidina TMB, color amarillo con la solución stop de ácido sulfúrico.	76
Figura 39. Se muestra la foto de un ejemplo de placa MBL procesada en el laboratorio, analizada por el software Manta del lector de placas Labtech, anteriormente mencionado, donde se analizaron por duplicado los 8 calibradores, y parte de las muestras, así como los dos controles, positivo y negativo.	77
Figura 40. Se muestra la foto del ajuste escogido para las concentraciones de MBL.	77
Figura 41. Estrategia de análisis CDm y CDp	80
Figura 42. Correlación Genotipo Fenotipo de MBL. Pre-TC: pre-trasplante cardíaco. EE: error standard de media. Genotipo asociado a baja, intermedia y alta producción de concentraciones séricas de MBL (ng/ml).	92
Figura 43. Comparativa de la cinética de células dendríticas mieloides que expresan TLR2 (Unidades en ratio MFI versus MFI)	113
Figura 44. Expresión pre-trasplante de TLR2 en distintas subpoblaciones mononucleares	114
Figura 45. Expresión pre-trasplante de TLR4 en distintas subpoblaciones mononucleares.	114
Figura 46. Cinética de Receptores Tipo Toll 2 en distintas subpoblaciones en trasplante cardíaco ..	115
Figura 47. Cinética de Receptores Tipo Toll 4 en distintas subpoblaciones en trasplante cardíaco ..	116
Figura 48. Comparación de expresión de TLR2 con controles sanos.	117
Figura 49. Comparación de expresión de TLR4 con controles sanos.	117
Figura 50. Asociación entre fenotipo de expresión de TLR2 y 4 en varias subpoblaciones en pacientes trasplantados cardíacos con resultado de muerte post trasplante. *Valores extremos. °Valores fuera de rango.	119
Figura 51. Cinética de células dentriticas tras el trasplante cardíaco. *Valores extremos. °Valores fuera de rango.	120
Figura 52. Cinética de expresión de HLA-DR en monocitos.	122
Figura 53. Cinética de expresión de CD38 y HLA-DR en monocitos.	122
Figura 54. Asociación de infección bacteriana en monocitos HLA-DR	123
Figura 55. Asociación de infección bacteriana recurrente en monocitos HLA-DR.	123
Figura 56. Asociación de infección bacteriana en monocitos CD38 y HLA-DR.	124
Figura 57. Asociación de infección bacteriana recurrente en monocitos CD38 y HLA-DR.	124
Figura 58. Enfoques de investigación clásicos y novedosos para estudiar la genética de las infecciones fúngicas. Fuente Bruno, M.et al., 2021	139

ABREVIATURAS

A

aa: Aminoácido

APC: del inglés *antigen presenting cell*, célula presentadora de antígeno

AJ: Artritis idiopática juvenil sistémica

B

BCR: del inglés *B cell receptor*, receptor de célula B

C

CMV: Citomegalovirus

CRD: Dominio de reconocimiento de carbohidratos

CDm: Células dendríticas mieloides

CDp: Células dendríticas plasmocitoides

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

D

DAMP: Patrón molecular asociado al daño

DIRA: del inglés *Deficiency of Interleukin-1 Receptor Antagonist*, Deficiencia del antagonista del receptor de interleucina-1

E

EBV: Virus Epstein Barr

ECMO: del inglés *extracorporeal membrane oxygenation*

F

FSC: del inglés *forward side scatter*

FMO: del inglés *Fluorescence Minus One*, fluorescencia menos uno

G

GODT: del inglés *The Global Observatory on Donation and Transplantation*. El Observatorio Mundial sobre Donación y Trasplantes

H

HLA-DR: Antígeno leucocitario humano DR

HCMV: Citomegalovirus humano

HCE: Historia clínica electrónica.

HGUGM: Hospital General Universitario Gregorio Marañón

HIV: del inglés *human immunodeficiency virus*, VIH

HTLV-I: del inglés *human T-lymphotropic virus type 1*, virus linfotrópico de células T humanas tipo 1.

I

IRF: Factor regulador de IFN

IL-1R: Receptor de interleucina-1

IcIL-1Ra: Isoforma intracelular IL-1ra

IL-1Ra: Antagonista del receptor de IL-1

IL1RN: Gen antagonista del receptor de IL-1

ISHLT: del inglés *International Society for Heart and Lung Transplantation*, Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón

IISGM: Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón

K

kg: Kilogramo

L
LPS: Lipopolisacárido
M
MBL: Lectina de unión a manosa
MBL2: Gen lectina de unión a manosa
MASP: Serina proteasa asociada a MBL
MASP-1: Serina proteasa-1 asociada a MBL
MASP-2: Serina proteasa-2 asociada a MBL
MyD88: Factor de diferenciación mieloide 88
N
NFκB: Factor nuclear de transcripción Kb
NK: del inglés <i>natural killer</i> , células asesinas naturales
NCBI: del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i> , Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
O
ONT: Organización Nacional de Trasplantes
P
PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos
PRR: Receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos
PRMs: Patrones reconocimiento moleculares solubles
PCR: Proteína C reactiva
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
R
RI: Isquemia-reperfusión
RSV: del inglés <i>respiratory syncitial virus</i>
rs: Número de identificación de referencia del SNP
rpm: Una revolución por minuto
S
SAP: Componente amiloide P sérico
SP-A: Proteína tensioactiva A
SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido
SP: Sangre periférica
T
TLR: Receptores tipo Toll
TRIF: Inductor interferón-β del adaptador que contiene el dominio del receptor Toll-IL-1
TOS: Trasplante de órgano sólido
TC: Trasplante cardíaco
V
VNTR: Número variable de repeticiones en tándem
VHS: Virus herpes simple
VZV: Virus varicela zóster
X
XLA: del inglés <i>X-linked agammaglobulinemia</i> , agammaglobulinemia ligada al sexo
W
WNV: del inglés <i>west Nile virus</i>
WT: del inglés <i>wild type</i> . Forma salvaje

RESUMEN

Introducción

En el contexto de nuevas estrategias terapéuticas inmunosupresoras e inmunomoduladoras en pacientes con trasplantes de órgano sólido (TOS) y de progenitores, de nuevos métodos de soporte vital (ECMO, asistencias circulatorias), de nuevas inmunoterapias en enfermedades reumáticas, autoinmunes sistémicas y autoinflamatorias así como de inmunoterapias avanzadas en oncología, se ha condicionado una creciente población de enfermos con inmunodeficiencia secundaria (inmunosuprimidos) con alto riesgo de incidencia y gravedad de infecciones en las últimas décadas. Esto ha conducido a un incremento en la prevalencia de infecciones oportunistas como el citomegalovirus (CMV), otras reactivaciones virales (virus BK), resistencias microbianas a terapias, todo lo cual se relaciona con la dificultad en el uso de los tratamientos antimicrobianos, hospitalizaciones prolongadas, etc que conllevan cada vez a mayores estancias y gasto hospitalario.

Frente a estos distintos estados de inmunodeficiencia secundaria, activación y desregulación inmunitaria, que pueden conducir a una deficiencia de los mecanismos de defensa, no se realiza un diagnóstico sistemático y protocolizado del estado de inmunocompetencia más allá de unos parámetros básicos de rutina muy limitados. En relación con los costos derivados de la asistencia sanitaria, es evidente su enorme impacto dada la morbilidad y mortalidad de estos eventos especialmente en el ámbito hospitalario.

De allí que toda información que pueda generarse en el campo de la predicción de las infecciones incluyendo biomarcadores inmunitarios que puedan servir para detectar el riesgo de estas complicaciones y de otras como el rechazo o la neoplasia en el trasplante de órgano sólido y por supuesto el riesgo de muerte, es de máximo interés en estos momentos.

Hipótesis

El diagnóstico de la infección en los pacientes con TOS a menudo se retrasa por la presentación clínica inicial tórpida no siempre bien definida, con una aparición secundaria y abrupta de disfunción por distintas causas y otros tipos de alteraciones orgánicas post trasplante. La infección es la primera causa de muerte en estos pacientes durante el primer año post trasplante, de allí la necesidad de búsqueda de biomarcadores inmunitarios asociados al riesgo de infección que puedan servir para alertar al clínico y predecir la aparición de esta complicación lo más pronto posible. Los nuevos desarrollos en técnicas celulares, inmunoquímicas, moleculares, proteómicas y de metabolómica de alto rendimiento han avanzado aún más en la potencial identificación de nuevos biomarcadores inmunitarios que podrían guiar a los médicos en el ajuste de la inmunosupresión y a predecir complicaciones como las infecciones y el estado de aceptación del injerto. Aunque muy pocos han llegado a la rutina en los últimos años.

El rol de la inmunidad innata para el control de infecciones se está investigando más en los últimos años en distintos escenarios clínicos, pero aún hay muy poca información en el modelo de trasplante cardiaco en el que se centra esta tesis. Se han realizado pocos estudios de inmunidad innata genética, humoral y celular para identificar posibles factores inmunitarios de riesgo para el desarrollo de infecciones y otras complicaciones como el rechazo, la neoplasia o la muerte en receptores de corazón.

En esta tesis doctoral planteamos que en el trasplante cardiaco se producen alteraciones en la inmunidad innata que incluyen por una parte cambios significativos en la concentración sérica de lectina ligadora de manosa (MBL); además la expresión de receptores tipo *Toll* (TLRs) en diferentes subpoblaciones celulares, nivel de marcadores de activación de monocitos y alteraciones genéticas de inmunidad innata que pueden explicar, al menos parcialmente, la alta prevalencia de infecciones y/o de otras complicaciones que acontecen tras el trasplante cardiaco.

Objetivos

Dentro de la inmunidad innata, diana principal de esta tesis, se han seleccionado dos proteínas cuya misión es actuar de sensores de reconocimiento de microbios ajenos como son los TLRs y la MBL, unos transmembrana y la otra soluble, respectivamente. Un objetivo es caracterizar la cinética de estos biomarcadores en distintos tiempos antes y después del trasplante. Otro objetivo es realizar un estudio genético de MBL y de otra proteína potencialmente implicada en procesos inflamatorios, un receptor de citocinas como es el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) y ver si es útil para identificar riesgo de infecciones y otras complicaciones. Todo ello se lleva a cabo en trasplante cardiaco. Finalmente, también se pretende evaluar el impacto del trasplante cardiaco sobre el estado de activación de los monocitos y si hay asociación de los mismos sobre el desarrollo de infecciones.

Metodología

Para llevar a cabo este trabajo se realizaron diferentes estudios:

- 1) Estudio prospectivo observacional de seguimiento realizado desde el periodo pre-trasplante cardiaco, cuando el paciente es incluido en la lista de espera, hasta los días 7 y 30 post-trasplante mediante la observación de la concentración sérica de MBL. Como análisis retrospectivo se evaluó la relación existente entre la concentración de MBL y el genotipo de *MBL2* entre pacientes que presentaron infección post trasplante y los que no.
- 2) Estudio transversal observacional en pacientes sometidos a trasplante cardiaco mediante la determinación del genotipo del *IL1RN* para establecer la prevalencia de mutaciones. Evaluar retrospectivamente, tras conocer la prevalencia de mutaciones, si existe asociación entre genotipos del *IL1RN* con el desarrollo de complicaciones post trasplante como infección y otras complicaciones.
- 3) Estudio prospectivo observacional de seguimiento realizado desde el momento pre-trasplante hasta los días 7, 30 y 90 post trasplante cardiaco, observando la cinética de expresión de TLR2

y TLR4 en distintas subpoblaciones celulares. Un análisis retrospectivo posterior puso de manifiesto la asociación entre estos biomarcadores y complicaciones clínicas.

- 4) Mediante otro estudio prospectivo observacional de seguimiento, se caracterizó la cinética de expresión de marcadores de activación (HLA-DR y CD38) en monocitos en sangre periférica, con un posterior análisis retrospectivo mediante la asociación entre estas subpoblaciones y la presencia de infecciones post trasplante.

Los resultados más relevantes fueron

Estudio 1. En trasplantados cardiacos se observa una buena correlación entre el fenotipo y genotipo de MBL. Los niveles del trasplantado son significativamente más bajos que en controles sanos y bajan al mes en relación con el basal pre-trasplante. La concentración de MBL del día 30 y el genotipo de producción intermedia y baja de MBL se asociaron al riesgo de desarrollo de enfermedad por citomegalovirus (CMV). La combinación de genotipo de producción de MBL intermedio o bajo con la presencia de hipogammaglobulinemia IgG del día 7 post trasplante identifica mejor a pacientes en riesgo de infección por CMV.

Estudio 2. El alelo *B* mutado del antagonista del receptor de IL-1 es un factor de riesgo de muerte post trasplante cardiaco. Esta alteración combinada con hipogammaglobulinemia IgG del día 7 post trasplante hace que el tamaño del efecto sea aún mayor.

Estudio 3. Los receptores TLR2 y TLR4 se expresan mayoritariamente en células dendríticas mieloides y plasmocitoides en pacientes en lista de espera de trasplante cardiaco. Tras el trasplante se producen cambios significativos de descenso de TLR2 en células dendríticas y monocitos y aumento de TLR4 en células dendríticas mieloides habiendo una clara tendencia de riesgo de muerte con estas alteraciones.

Estudio 4. Tras el trasplante cardiaco hay un descenso en el porcentaje de monocitos que expresan CD38 y HLADR. Porcentajes más bajos de estas células son un factor de riesgo de infección bacteriana además de infección bacteriana recurrente.

Como conclusiones de esta tesis doctoral

Hay una buena correlación entre genotipo de MBL y su concentración en suero y ambos componentes se asocian con riesgo de desarrollo de infección por CMV y de infección recurrente en el periodo post trasplante cardiaco.

A nivel del antagonista del receptor de la IL-1, su alelo mutado *B* se asocia con riesgo de muerte en trasplantados cardiacos.

Hay una expresión diferencial de TLR-2 y TLR-4 entre las células presentadoras de antígeno clásicas, en la cinética se observa que sufren cambios significativos en el periodo temprano post trasplante en las distintas subpoblaciones linfocitarias que pueden dar lugar a complicaciones.

En el periodo temprano post trasplante se produce un descenso del porcentaje de monocitos activados CD14+CD38+DR+ y CD14+DR+ y valores más bajos de los mismos, se asocian a riesgo de infección bacteriana e infección bacteriana recurrente en pacientes sometidos a trasplante cardiaco.

La validación futura de estos resultados de evaluación de la inmunidad innata, podría derivar en mejores protocolos para seleccionar receptores cardíacos en ensayos de evaluación de profilaxis antimicrobiana anticipada o prolongada.

SUMMARY

Introduction

In the context of new immunosuppressive and immunomodulatory therapeutic strategies in patients with solid organ transplantation (SOT), of new methods of life support (ECMO, circulatory assistance), of new immunotherapies in rheumatic, systemic autoimmune and autoinflammatory diseases, as well as of advanced immunotherapies in oncology, a growing population of patients with secondary immunodeficiency (immunocompromised) has been conditioned with a high risk of incidence and severity of infections in recent decades. This has led to an increase in the prevalence of opportunistic infections such as cytomegalovirus (CMV), other viral reactivations (BK virus), microbial resistance to therapies, all of which are related to the difficulty in the use of antimicrobial treatments, and hospital stay enlarged that increasingly lead to longer costs.

Faced with these different states of secondary immunodeficiency, immune activation and dysregulation, which can lead to a deficiency in defense mechanisms, a systematic and protocolized diagnosis of the state of immunocompetence is not carried out beyond some very limited basic routine parameters. In relation to the costs derived from health care, its enormous impact is evident given the morbidity and mortality of these events, especially in the hospital setting.

Hence, all the information that can be generated in the field of infection prediction, including immune biomarkers that can be used to detect the risk of these complications and others such as rejection or neoplasia in solid organ transplants and of course the risk of death, is of the greatest interest at this time.

Hypothesis

The diagnosis of the infection in patients with SOT is often delayed due to the torpid initial clinical presentation, which is not always well defined, with a secondary and abrupt appearance of dysfunction due to different causes and other types of post-transplant organic alterations. Infection is the leading cause of death in these patients during the first year after transplantation, hence the need to search for immune biomarkers associated with the risk of infection that can serve to alert the clinician and predict the onset of this complication as soon as possible. New developments in high-throughput cellular, immunochemical, molecular, proteomics, and metabolomics techniques have further advanced the potential identification of novel immune biomarkers that could guide clinicians in adjusting immunosuppression and predict complications such as infections, cancer and graft acceptance status. Although very few have reached the routine in recent years.

The role of innate immunity for infection control has been further investigated in recent years in different clinical settings, but there is still very little information on the heart transplantation model on which this thesis focuses. Few studies of genetic, humoral, and cellular innate immunity have

been performed to identify possible immune risk factors for the development of infections and other complications such as rejection, neoplasia, or death in heart recipients.

In this doctoral thesis, we propose that changes in innate immunity occur in heart transplantation, which include, on the one hand, significant changes in the serum concentration of mannose-binding lectin (MBL); in addition, the expression of toll-like receptors (TLRs) in different cell subpopulations, at the level of monocyte activation markers and genetic alterations of innate immunity that can explain, at least partially, the high prevalence of infections and/or other complications that occur after heart transplantation.

Objectives

Innate immunity, the main target of this thesis, two proteins have been selected whose mission is to act as recognition sensors for foreign microbes, such as TLRs and MBL, some transmembrane and the other soluble, respectively. One objective is to characterize the kinetics of these biomarkers at different times before and after transplantation. Another objective is to carry out a genetic study of MBL and another protein potentially involved in inflammatory processes, a cytokine receptor such as the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and see if it is useful to identify risk of infections and other complications. All this is carried out in heart transplantation. Finally, it is also intended to evaluate the impact of heart transplantation on monocytes status activation furthermore the development of infections.

Methodology

To carry out this work, different studies were carried out:

- 1) Prospective observational follow-up study performed from the pre-heart transplant period, when the patient is included in the waiting list, until days 7 and 30 post-transplant by observing the serum MBL concentration. As a retrospective analysis, the relationship between the MBL concentration and the *MBL2* genotype was evaluated between patients who presented post-transplant infection and those who did not.
- 2) Observational cross-sectional study in patients undergoing heart transplantation by determining the *IL1RN* genotype to establish the prevalence of mutations. To retrospectively evaluate, after knowing the prevalence of mutations, whether there is an association between *IL1RN* genotypes with the development of post-transplant complications such as infection and other complications.
- 3) Prospective observational follow-up study performed from the pre-transplant moment to days 7, 30, and 90 after heart transplantation, observing the kinetics of TLR2 and TLR4 expression in different lymphocyte subpopulations. A subsequent retrospective analysis revealed the association between these biomarkers and clinical complications.
- 4) Through another prospective observational follow-up study, the kinetics of expression of activation markers (HLA-DR and CD38) in peripheral blood monocytes was characterized, with

a subsequent retrospective analysis through the association between these subpopulations and the presence of post-mortem infections. transplant.

The most relevant results were

Study 1. In cardiac transplant recipients, a good correlation was observed between the MBL phenotype and genotype. The transplanted levels are significantly lower than in healthy controls and drop after a month in relation to the pre-transplant baseline. Day 30 MBL concentration and genotype of intermediate and low MBL production were associated with the risk of development of cytomegalovirus (CMV) disease.

Study 2. The mutated *B* allele of the IL-1 receptor antagonist is a risk factor for death after heart transplantation. This alteration combined with IgG hypogammaglobulinemia on day 7 post-transplant makes the effect size even greater.

Study 3. TLR2 and TLR4 receptors are mainly expressed in myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients on the waiting list for heart transplantation. After transplantation, there are significant changes in TLR2 decrease in dendritic cells and monocytes and TLR4 increase in myeloid dendritic cells, with a clear trend of risk of death with these alterations.

Study 4. After heart transplantation, there is a decrease in the percentage of monocytes that express CD38 and HLA DR. Lower percentages of these cells are a risk factor for bacterial infection as well as recurrent bacterial infection.

As conclusions of this doctoral thesis

There is a good correlation between the MBL genotype and its concentration in serum, and both components are associated with the risk of developing CMV infection and recurrent infection in the post-heart transplant period.

At the level of the IL-1 receptor antagonist, its mutated *B* allele is associated with a risk of death in heart transplant recipients.

There is a differential expression of TLR-2 and TLR-4 between the classical antigen-presenting cells, in the kinetics it is observed that they undergo significant changes in the early post-transplantation period in the different lymphocyte subpopulations that can give rise to complications.

In the early post-transplant period, there is a decrease in the percentage of activated CD14+CD38+DR+ and CD14+DR+ monocytes, and lower values of these are associated with the risk of bacterial infection and recurrent bacterial infection in patients undergoing heart transplantation.

Future validation of these innate immunity evaluation results could lead to better protocols for selecting cardiac recipients in trials evaluating early or prolonged antimicrobial prophylaxis.

The background features a dark blue gradient. On the right side, a DNA double helix is depicted, with one strand highlighted in orange and red. Scattered across the left and bottom areas are several stylized, semi-transparent blue cells, each with a darker blue nucleus.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. El trasplante cardiaco

En España la insuficiencia cardiaca, una de las indicaciones para el trasplante cardiaco, presenta un número elevado de fallecimientos equiparable al de enfermedades con un alto impacto epidemiológico, como el cáncer, siendo considerada como una de las principales causas de muerte en los países desarrollados¹. Las infecciones son la principal causa de muerte durante el primer año después del trasplante de corazón en España^{2,3}, con un 32% de las muertes durante este período⁴. En los primeros 5 años tras el trasplante, las causas específicas de muerte más prevalentes también incluyen a la infección (24,9%)³. La infección es la complicación más destacada tanto para los pacientes que no rechazan el órgano como para los que rechazan, después de un trasplante cardiaco⁵. La supervivencia post trasplante en el periodo 2012-2021 se sitúa en el 80,6% en el primer año tras el trasplante y en el 72,5% a los 5 años³. De acuerdo con el Informe del año 2019 del registro de la Sociedad Internacional de Trasplante Cardiaco y Pulmonar (ISHLT) a concentración global, las principales causas de muerte variaron con el tiempo, siendo el fallo del injerto la más importante de forma aguda (durante el primer mes), la infección durante el primer año (entre el mes y el año); mientras que las complicaciones a largo plazo incluyen a la malignidad, el fallo crónico del aloinjerto cardíaco, la vasculopatía del injerto y la insuficiencia renal ya que se vuelven cada vez más importantes a medida que aumenta el tiempo después del trasplante⁶. Este conocimiento ayudará a estratificar los grupos de pacientes en riesgo en distintas etapas y, posteriormente, a desarrollar estrategias profilácticas y de tratamiento tempranas o crónicas más apropiadas. Así, por ejemplo, si las infecciones son la primera causa de muerte entre el mes y el año, el poder contar con biomarcadores inmunitarios de riesgo de infección pre-trasplante y durante el primer mes, nos daría una oportunidad para la detección a tiempo del riesgo de infección, a tiempo de introducir medidas correctoras.

Para ubicarnos mejor en cuanto al número de trasplantes cardíacos que se hacen, al ser esta una tesis realizada en este tipo de trasplante de órgano sólido (TOS), en el año 2021 la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) registró un total de 2.950 trasplantes renales, 1.078 hepáticos, 362 de pulmón, 302 cardíacos, 82 de páncreas y 7 de intestino, procedentes de 1.905 donantes fallecidos y de 324 donantes vivos. En la figura 1 se puede observar la actividad trasplantadora de los últimos 20 años en trasplante cardiaco. Pese a la pandemia, destaca la realización de 227 trasplantes en urgencia cero y 159 infantiles, con un descenso importante en la lista de espera pediátrica. Asimismo, se han podido trasplantar 123 pacientes renales hiperinmunizados, gracias al programa PATHI de la ONT⁷.

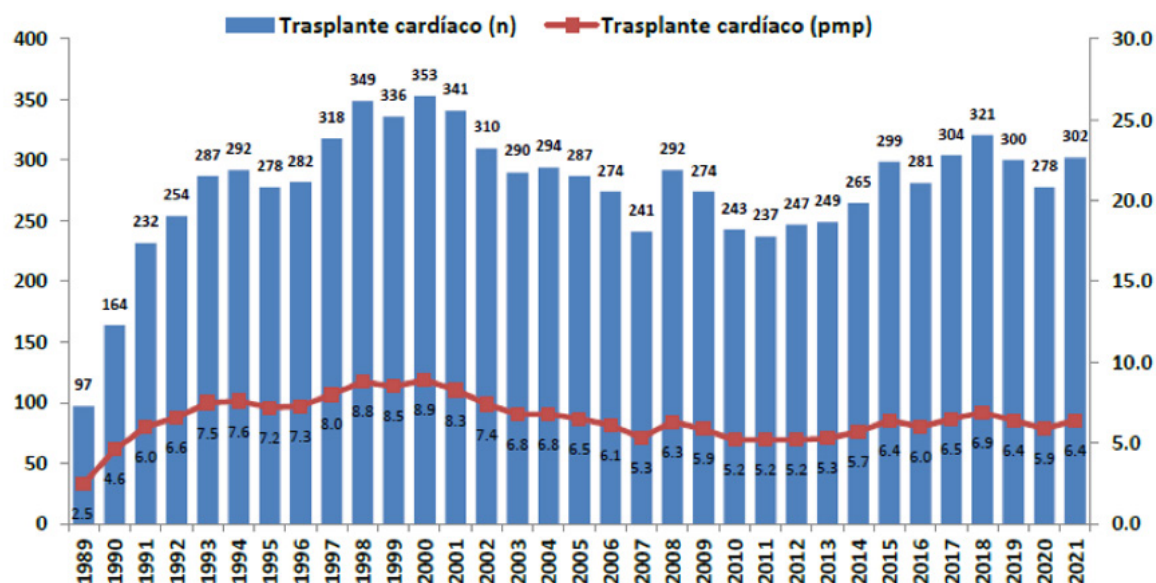


Figura 1. Actividad de trasplante cardíaco en España. 1989-2021. Números absolutos y procedimientos por millón de población (pmp). Fuente: ONT. Datos 2021.

A concentración global el número de trasplantes de corazón reportados a la ISHLT es significativamente mayor que hace una década⁶, impulsado principalmente por mayores números de trasplantes particularmente en América del Norte y países europeos (Figura 2).

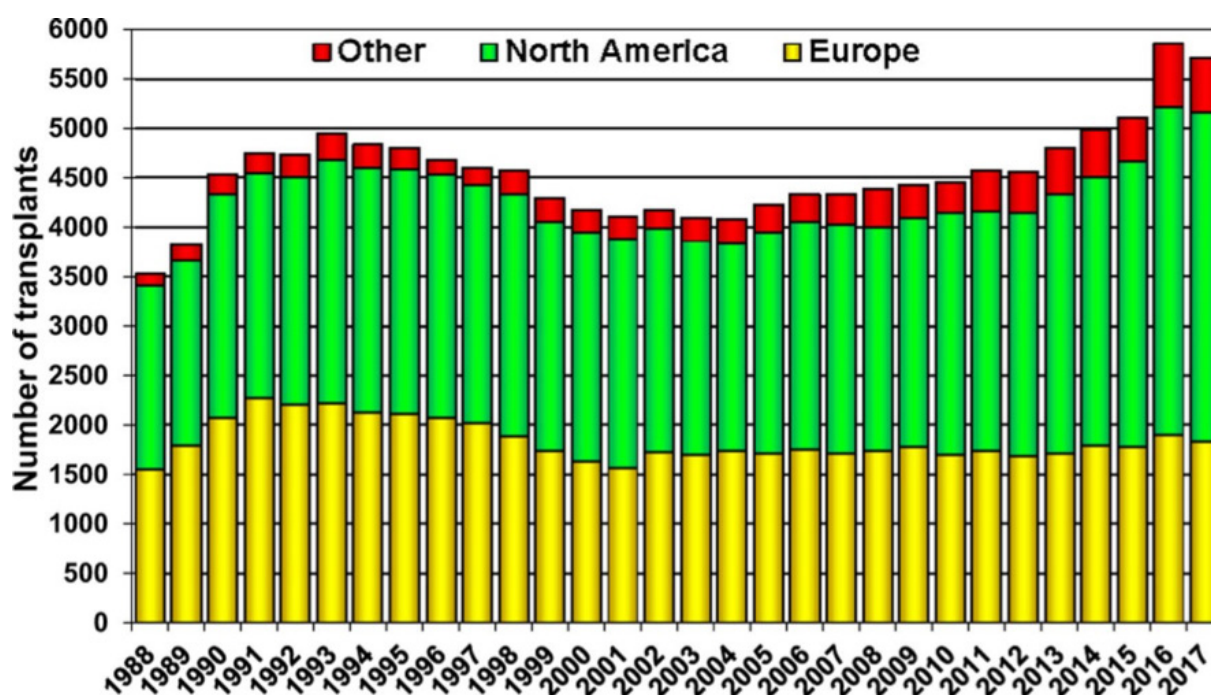


Figura 2. Número de trasplantes de corazón (adultos y pediátricos) por año y región geográfica. 1988-2017. Fuente: Registro de Trasplantes de la ISHLT 2019 ⁶.

En el reporte de 2020 del *Global Observatory on Donation and Transplantation* (<http://www.transplant-observatory.org/>), los receptores que viven con un injerto funcional han ido creciendo. El trasplante cardiaco esta ubicado en tercera posición como puede apreciarse en la figura 3. En la figura 4 se puede ver que, en tasas de trasplante cardiaco por millón de población, España está posicionada en sexto lugar.

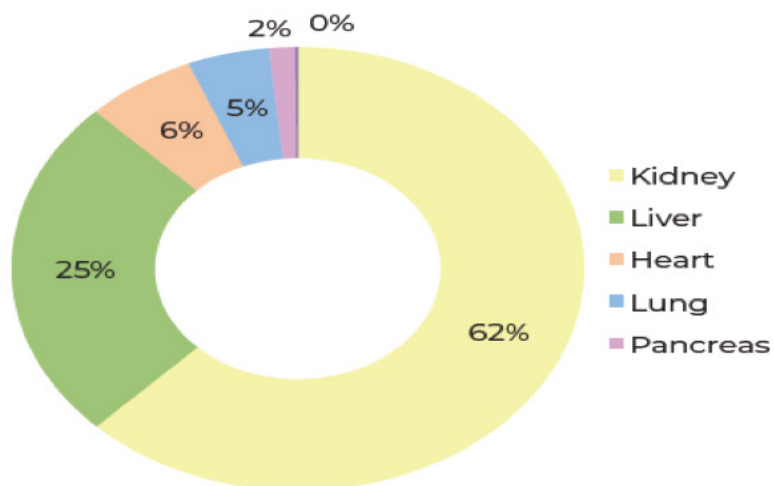


Figura 3. Porcentajes de trasplantes de órganos sólidos. Fuente: GLOBAL REPORT ON ORGAN DONATION AND TRANSPLANTATION 2020. Obtenido a través de la web GODT. 93 países que representaban el 80% de la población mundial.

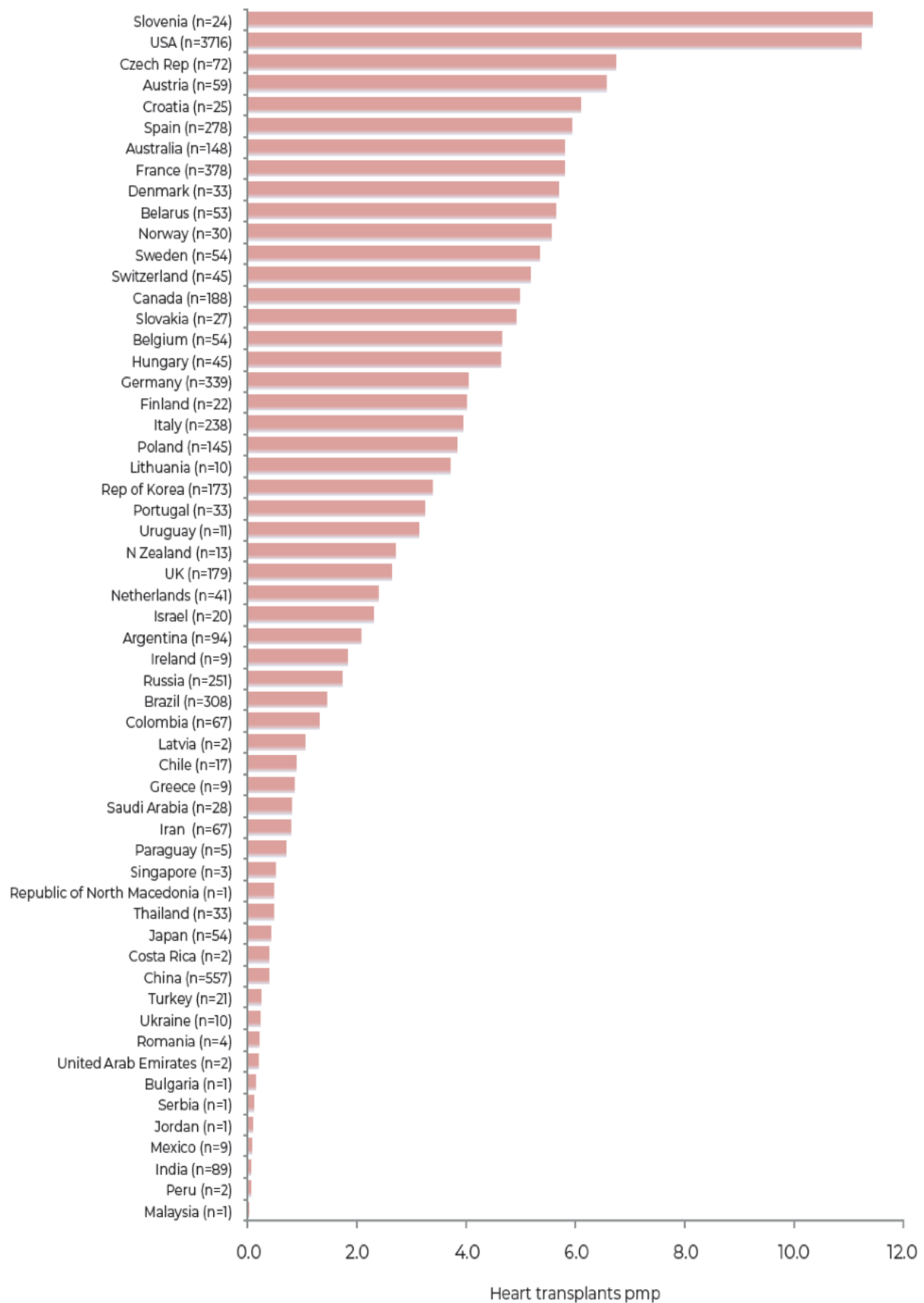


Figura 4. Actividades de trasplante de corazón. Cifras absolutas (entre paréntesis) y tasas por millón de población (pmp). N= 57 países. Fuente: GLOBAL REPORT ON ORGAN DONATION AND TRANSPLANTATION 2020. Obtenido a través de la web GODT.

2. Infecciones en trasplante de órgano sólido

El grupo investigador de esta tesis ha enfocado sus esfuerzos en caracterizar biomarcadores de riesgo de infección tras el trasplante cardíaco. La susceptibilidad de los receptores de TOS a las infecciones depende de múltiples factores, incluidas las características previas al trasplante (condiciones inmunitarias basales incluida la susceptibilidad genética, no inmunitarias previas y enfermedades graves, el tipo de trasplante (urgente o programado)), el tipo de órgano trasplantado, las características intraoperatorias (duración prolongada de la isquemia fría, mayor duración de procedimiento de trasplante, necesidad de transfusiones de sangre, etc) y factores posteriores al trasplante (estado neto de inmunosupresión, uso de profilaxis antimicrobiana, inmunizaciones, prevalencia de infección por bacterias, citomegalovirus y otras oportunistas). Las infecciones graves pueden ocurrir durante tres períodos, la fase posquirúrgica (< 4 semanas), el período de máxima inmunosupresión (1 a 12 meses) y posteriormente⁸.

Durante el primer mes después del trasplante, las infecciones son el resultado de complicaciones quirúrgicas, infecciones derivadas del donante, infecciones preexistentes del receptor e infecciones nosocomiales⁹. Las infecciones que ocurren más tarde (1 a 12 meses después del trasplante) se deben principalmente a la reactivación de infecciones latentes (citomegalovirus, CMV, virus del herpes simple, VHS, virus de la varicela-zoster, VZV) y patógenos oportunistas (como *Aspergillus spp.*, *Pneumocystis jirovecii*, *Cryptococcus neoformans*, *Toxoplasma gondii*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria spp.*, *Nocardia spp.*)¹⁰. Las infecciones que ocurren después de los 12 meses incluyen infecciones adquiridas en la comunidad y asociadas a la atención médica. La infección por *Clostridium difficile* es común después del trasplante y debe considerarse en caso de diarrea¹¹.

En la siguiente tabla se exhiben exposiciones epidemiológicas que deben tenerse en cuenta en los pacientes trasplantados.

Tabla 1. Exposiciones epidemiológicas relevantes para el trasplante. Fuente: J. A. Fishman 2017 ¹⁰

Virus
Herpes group (CMV, EBV, HHV6, 7, 8, HSV, VZV)
Hepatitis viruses (HAV, HBV, HCV, HEV)
Retroviruses (HIV, HTLV-1 and 2)
West Nile (WNV), Chikungunya, Zika, Dengue, lymphocytic choriomeningitis virus, rabies
Bacteria
Gram-positive and gram-negative bacteria (Staphylococcus spp., Pseudomonas spp., Enterobacteriaceae, antimicrobial-resistant organisms), Legionella spp.
Mycobacteria (Tuberculosis and nontuberculous)
Nocardia spp.
Fúngicas
Candida spp.
Aspergillus spp.
Cryptococcus spp.
Geographic fungi (Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides species)
Moho oportunista (Scedosporium, Agents of Mucormycosis, Phaeohyphomycoses)
Parásitos
Toxoplasma gondii
Trypanosoma cruzi
Strongyloides stercoralis
Leishmania spp.
Balamuthia spp.
Exposición nosocomial
Methicillin-resistant staphylococci
Antimicrobial-resistant enterococci (vancomycin, linezolid, daptomycin, quinupristin-dalfopristin)
Multidrug-resistant gram-negative bacilli
Clostridium difficile
Aspergillus spp.
Candida nonalbicans strains
Exposición de la comunidad
Food- and water-borne (Listeria monocytogenes, Salmonella spp., Cryptosporidium spp., hepatitis A, Campylobacter spp.)
Respiratory viruses (RSV, influenza, parainfluenza, adenovirus, metapneumovirus)
Common viruses, often with exposure to children (Coxsackie, Parvovirus)
Polyomavirus, papillomavirus
Atypical respiratory pathogens (Legionella spp., Mycoplasma spp., Chlamydia)
Geographic fungi and Cryptococcus, Pneumocystis jiroveci
Parásitos (a menudo distante)
Strongyloides stercoralis
Leishmania spp.
Toxoplasma gondii
Trypanosoma cruzi
Naegleria spp.

CMV, cytomegalovirus; EBV, Epstein-Barr virus; HHV, human herpes virus; HSV, herpes simplex virus; VZV, varicella zoster virus; HAV, hepatitis A virus; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HEV, hepatitis E virus; HIV, human immunodeficiency virus; HTLV, human T cell lymphotropic virus; RSV, respiratory syncytial virus.

3. Respuesta de inmunidad innata a la infección en trasplante

La inmunidad innata está involucrada principalmente en la inmunidad natural contra patógenos y frente a lesiones tisulares. Comprende las barreras físicas, los mecanismos celulares y humorales que defienden al ser vivo de la infección por microorganismos de forma no específica. Las células de la respuesta inmunitaria innata reconocen, y responden a patógenos de forma genérica y, a diferencia de la respuesta inmunitaria adaptativa, no confieren inmunidad a largo plazo o protectora al huésped; proporcionan una defensa inmediata contra la infección, y se encuentran tanto en animales como en vegetales¹².

La inmunidad innta se compone de mecanismos celulares como los fagocitos (macrófagos y neutrófilos), células dendríticas, mastocitos, basófilos, eosinófilos, células asesinas naturales (NK) y células linfoides innatas. Incluye también mecanismos humorales, como el sistema de complemento¹³ o el de la MBL.

La inmunidad innata reconoce a patógenos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que permiten detectar y responder rápidamente a una amplia gama de patógenos que comparten estructuras, conocidas como patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMP)¹⁴.

Forma parte de un sistema de autodefensa que además del reconocimiento de componentes patogénicos, también reconoce diariamente oncoproteínas y elimina células neoplásicas. Al mismo tiempo, los antígenos propios son todas aquellas moléculas que es capaz de reconocer el sistema inmune como parte de nuestra estructura molecular a concentración individual. Estas células defensivas innatas deberán ser previamente «educadas» para reconocer nuestras estructuras propias en órganos linfoides primarios: la médula ósea y el timo. Al proceso de aprendizaje se le denomina tolerancia central. Por otro lado, los antígenos extraños serían aquellas moléculas reconocidas por el sistema inmune que no forman parte de nuestro organismo y potencialmente son patogénicas. En principio, el sistema inmune está capacitado también para realizar otras distinciones, que son parcialmente inofensivas, como frente a una molécula de polen, pero también frente a una célula neoplásica que podría pasar inadvertida¹⁵.

4. Descripción de biomarcadores de inmunidad innata estudiados en la tesis doctoral

4.1. Lectina Fijadora de Manosa MBL

La lectina fijadora de manosa (MBL) es una macromolécula que está codificada por el gen *MBL2* en el cromosoma 10, *MBL1* que es un pseudogen¹⁶. Es una de las lectinas más estudiadas, un miembro de la familia de las colectinas, un subgrupo de lectina sérica de tipo C, producida en el hígado en fase aguda que se une a carbohidratos presentes en una amplia variedad de bacterias, hongos, virus y a antígenos de superficie de parásitos¹⁷. Aunque la MBL se sintetiza principalmente en el hígado, se han descrito pequeñas concentraciones de producción extrahepática, como en el intestino delgado y los testículos, que representan alrededor del 1% del total producido. La MBL está presente como una proteína sérica, aunque existe una reserva intracelular de MBL¹⁸.

Es una molécula importante del sistema inmune innato que participa en la defensa contra microorganismos activando la vía del complemento independiente de anticuerpos. Las lectinas son una familia de proteínas definidas como proteínas que no son inmunoglobulinas y que exhiben una gran afección por los carbohidratos asociados a glucoproteína y/o a glucolípidos, pero que no muestran actividad enzimática¹⁹.

Los genes que codifican las lectinas se han identificado reflejando una indicación de su conservación evolutiva estando en todas las formas de vida, incluidas las plantas, los animales y los virus.²⁰

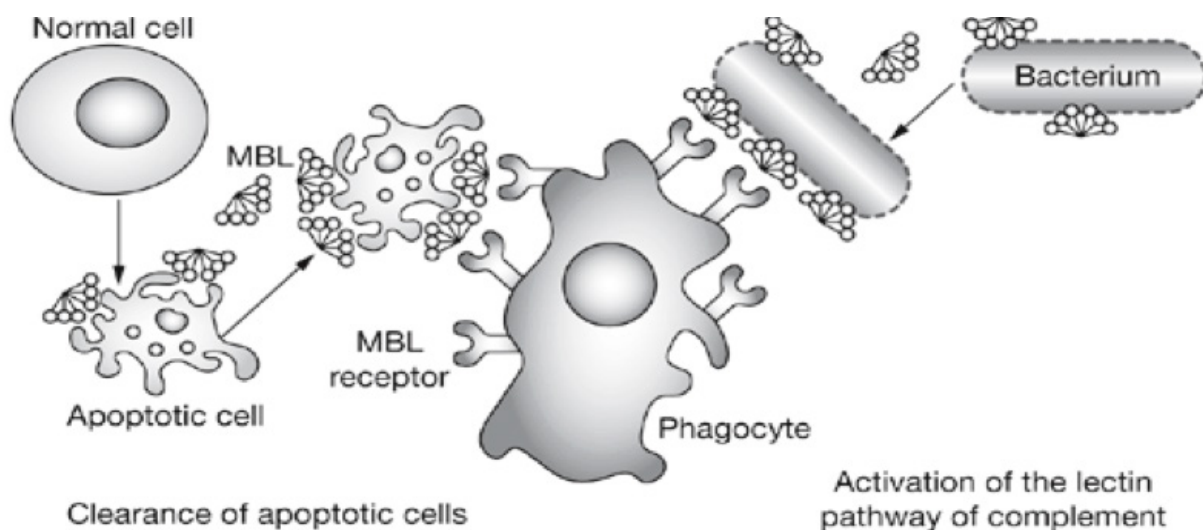


Figura 5. Funciones de MBL. Fuente: Kravitz et al 2006²¹

En la figura 5 se grafican sus funciones. Esta lectina tiene diversas funciones, por un lado, presenta actividad antimicrobiana a través de activación de complemento por la vía de las lectinas; mediante neutralización de virus, por opsonofagocitosis (se une a receptores expresados sobre la superficie de macrófagos y neutrófilos para promover la eliminación de restos celulares)^{22,23} y actúa sobre neutrófilos, monocitos y macrófagos estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias²¹.

Se ha demostrado en varios contextos que la deficiencia de MBL aumenta la susceptibilidad general a las enfermedades infecciosas y predispone a una mayor gravedad de la enfermedad microbiana. En pacientes pediátricos se ha descrito una asociación clínica entre las variantes alélicas de la MBL con desarrollo de enfermedad meningocócica²⁴. Varios grupos han sugerido que las concentraciones bajas de MBL podrían asociarse con aparición de infecciones recurrentes debido a un defecto de opsonización en adultos y niños^{25,26,27}. La deficiencia de MBL también se ha asociado con desarrollo de infecciones graves después del trasplante de órgano sólido^{28,29,30}, aunque son muy pocos los trasplantados cardiacos evaluados en estos estudios. Pero también se han descrito asociaciones con complicaciones cardiovasculares hiperglucémicas³¹, con protección después de un accidente cerebrovascular isquémico o hemorrágico agudo²⁰ o con abortos espontáneos recurrentes^{32,33}. En un estudio realizado en 3 hospitales españoles que evaluaban pacientes con neumonía adquirida en la comunidad se sugirió que los pacientes con genotipos *MBL2* deficientes tenían mayores tasas de ingreso en la UCI, de shock séptico y de muerte a los 90 días que los pacientes con *MBL2* salvaje³⁴.

En la tabla 2 se exhiben ejemplos de microorganismos que se han descrito en pacientes con concentraciones bajas o con genotipos de producción baja de MBL. Muchos de estos microorganismos son frecuentemente recuperados de los cultivos de pacientes con trasplante en quienes se sospechó una complicación infecciosa.

Todos estos antecedentes de asociación entre el genotipo y fenotipo de MBL fue parte de la justificación por la que se pretendió evaluar si este tipo de asociaciones también se podrían demostrar en receptores cardiacos.

Tabla 2. Algunos microorganismos clínicamente relevantes reconocidos por la lectina de unión a manosa^{35,36,37,38,39,40,41, 42}

BACTERIAS	VIRUS	HONGOS	PROTOZOS
<i>Staphylococcus aureus</i>	HIV-1 and -2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Influenza A	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Herpes simplex 2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Enterococcus spp.</i>	Hepatitis C virus (HCV)		
<i>Listeria monocytogenes</i>	Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)		
<i>Haemophilus influenzae</i>	West Nile virus (WNV)		
<i>Neisseria meningitidis</i>	Human T lymphotropic virus-1 (HTLV-1)		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Human cytomegalovirus (HCMV)		
<i>Escherichia coli</i>	Hepatitis B virus (HBV)		
<i>Klebsiella spp.</i>	Dengue virus (DENV)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ebola virus		
<i>Salmonella Montevideo</i>	Marburg virus (MARV)		
<i>Salmonella typhimurium</i>	SARS-CoV-2		
<i>Chlamydia pneumonia</i>			
<i>Chlamydia trachomatis</i>			
<i>Propionibacterium acnés</i>			
<i>Mycobacterium avium</i>			

4.1.1. Estructura de la MBL

La molécula de la MBL contiene cuatro dominios que son estándar para las proteínas de la familia de las colectinas: una región corta N-terminal rica en cisteína, un dominio similar al colágeno [longitud dada en número de aminoácidos (aa)], una región cuello y un dominio C-terminal de reconocimiento de carbohidratos (ver en la figura 6). La MBL y las ficolinas, que se diferencian en el tipo de azúcar al que se unen, se someten a cambios conformacionales tras la interacción con glucoproteínas virales a través de glucano asociado a restos de manosa y N-acetilglucosamina²⁶. Las serinas proteasas asociadas a MBL interactúan con la región similar al colágeno, activando así la vía de la lectina del complemento. En la siguiente figura 6 se aprecia la estructura de MBL y de las ficolinas.

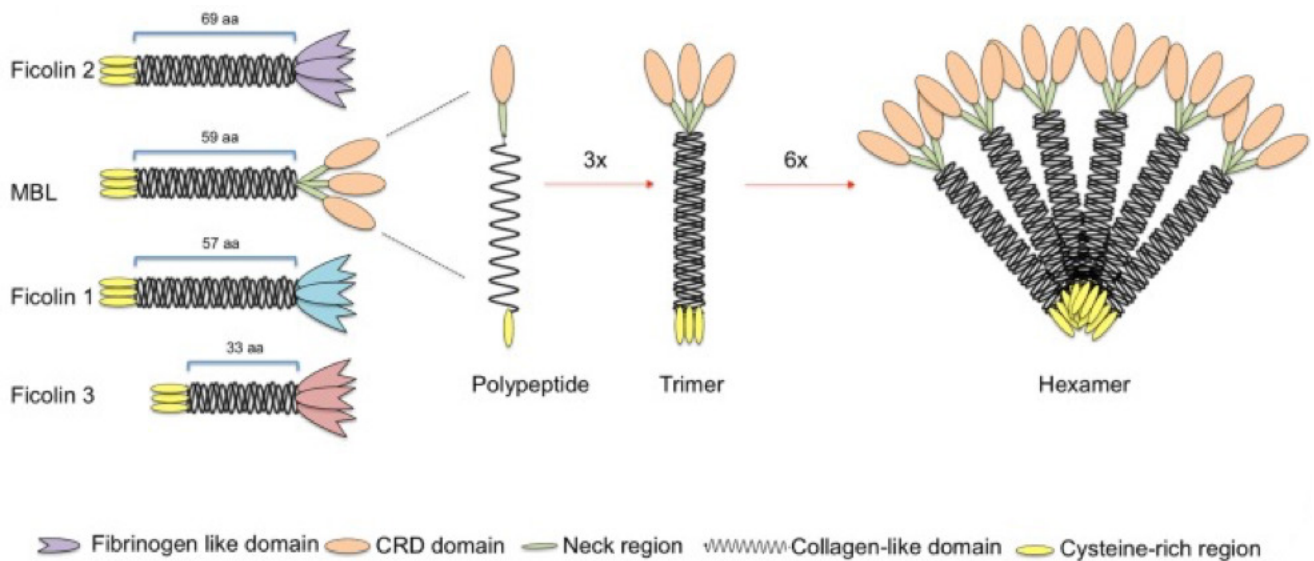


Figura 6. Se muestra estructura de MBL y de las ficolinas. Fuente: Beltrame et al, 2015

La MBL plasmática forma complejos con las serinoproteasas MASP-1 y MASP-2, que inician una cascada de escisión de factores del complemento, con roles en opsonización, inflamación y lisis celular. Al igual que la MBL, las ficolinas son proteínas de defensa que forman oligómeros a partir de tallos homólogos al colágeno y dominios semejantes a fibrinógeno. Son capaces de sentir señales de daño tales como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o a células apoptóticas. En el hombre, las ficolinas L y H se han caracterizado en el suero, mientras que la ficolina M es secretada por células monocíticas (también denominadas ficolin-1, ficolin-2 y ficolin-3); al igual que la lectina de unión a manosa, pueden asociarse a las serina-proteasas asociadas a MBL e iniciar la vía de activación de complemento⁴³. Las lectinas se clasifican en muchas familias según sus diferentes ubicaciones celulares, así como sus especificidades para una variedad de estructuras de carbohidratos debido a las características de sus módulos de dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) tal como se representa en la figura 7⁴⁴.

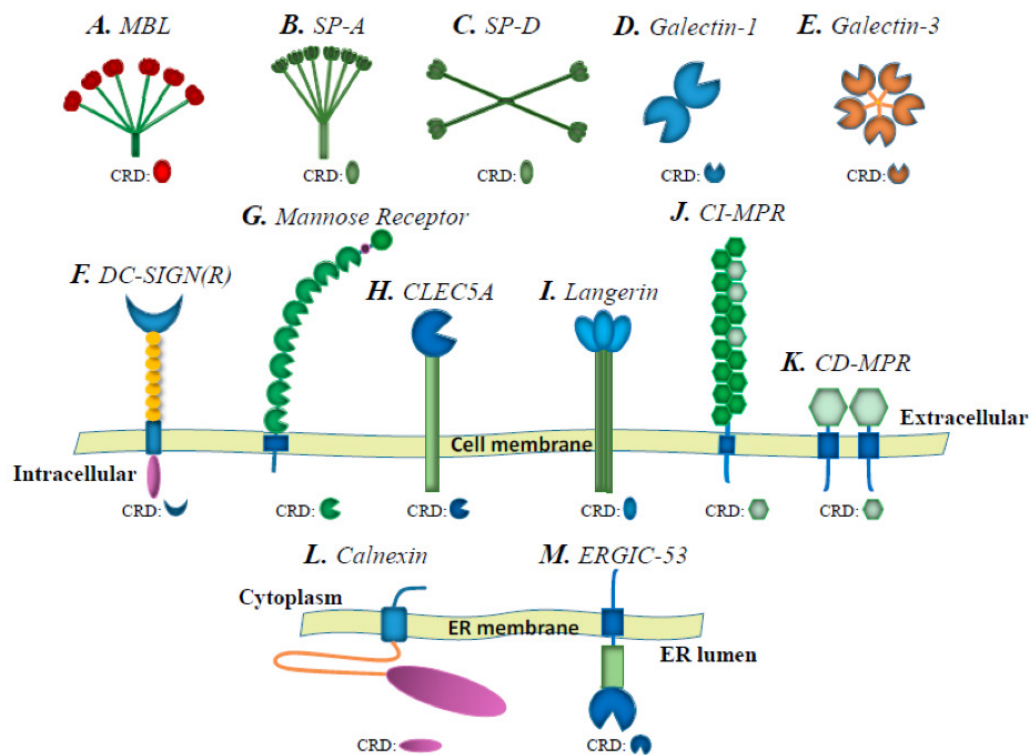


Figura 7. Se muestra la variedad de las lectinas, solubles, transmembrana e intracelulares. Fuente: Yang Liu et al 2015. (A) MBL, lectina de unión a manosa; (B) SP-A proteína tensioactiva-A; (C) SP-D proteína tensioactiva-D; (D) galectina-1; (E) galectina-3; (F) DC-SIGN(R): DC-SIGN molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas-3-N-integrina de agarre y DC-SIGNR; (G) receptor de manosa; (H) CLEC5A Miembro A de la familia 5 del dominio de lectina tipo C; (I) Langerín; (J) CI-MPR receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes; (K) CD-MPR receptor de manosa-6-fosfato dependiente de cationes; (L) calnexina; (M) ERGIC-53 lectina de manosa específica del retículo endoplásmico.

La subunidad estructural de MBL está constituida por tres polipéptidos idénticos de 32 kDa de 228 aminoácidos⁴⁵, un homotrímero de péptidos que se asocia para formar una estructura de triple hélice similar al colágeno; reconoce partes repetitivas de oligosacáridos presentes en una amplia gama de patógenos. La oligomerización de la subunidad estructural da como resultado moléculas de MBL de diferente tamaño, la forma funcional nativa es un hexámero así como las ficolinas⁴⁶ (ver figura 6). Sin embargo, aunque la MBL puede formar varias formas oligoméricas, los dímeros y trímeros no tienen actividad biológica, y se necesita al menos una forma tetramérica para activar la cascada del complemento¹³. La tetramérica, la forma que se muestra en la Figura 8 es probablemente la más común, con diferentes regiones del polipéptido que están codificadas por diferentes exones del gen *MBL2*⁴⁷.

La deficiencia de MBL es uno de los trastornos inmunitarios más comunes que afectan alrededor del 10-30% de las personas^{48,49}. Debido a esta frecuencia tan elevada no está considerada como una inmunodeficiencia primaria relevante. No obstante, en situaciones de alto riesgo, como ocurre con el paciente trasplantado, esta deficiencia puede adquirir una concentración de riesgo relevante, al desactivarse otras vías de protección con la terapia inmunosupresora. Fue esta otra de las motivaciones para estudiar esta proteína como modelo de predisposición a infección dentro de las proteínas del sistema inmunitario innato.

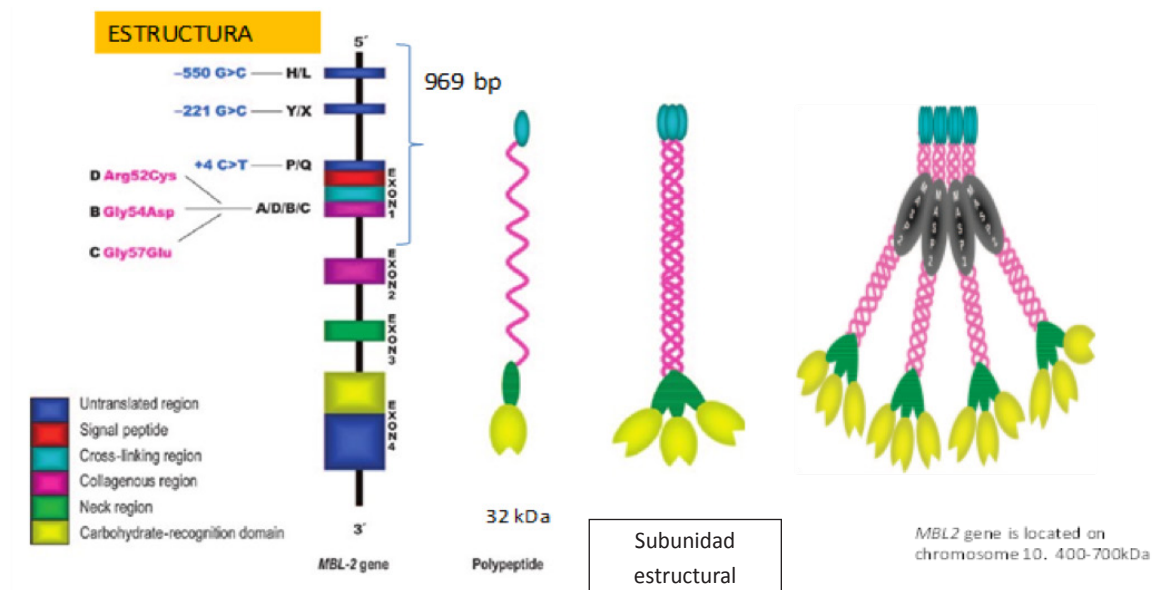


Figura 8. Muestra el gen humano MBL-2 y el producto proteico codificado. Se indican también las posiciones de polimorfismos del exón 1 y los promotores. Fuente: Dommett RM et al 2006

Este polipéptido consta de cuatro dominios 1) Dominio rico en cisteína N-terminal de 20-aminoácidos involucrado en la formación de enlaces disulfuro entre subunidades, 2) un dominio similar al colágeno que consta de 18 a 20 repeticiones en tándem de Gly-Xaa-Yaa, 3) una región del cuello helicoidal enrollada, y 4) Dominio reconocimiento de carbohidratos capaz de unirse a una amplia variedad de carbohidratos matrices en la superficie de los microorganismos⁵⁰

4.1.2. Polimorfismos en el gen *MBL2*

Para esta proteína hay polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), los cuales constituyen la mayoría de todas las variaciones genéticas^{51, 52}, habiéndose estimado que hay una variante en cada 1.000 pares de bases, que dan origen a la existencia de haplotipos comunes en la población, dado el elevado desequilibrio de ligamiento que tiene lugar en esta region⁵³. El análisis de los haplotipos presentes en regiones de genes candidatos parece ser más adecuado que la descripción de SNPs individuales. El genoma humano contiene muchos genes que son polimórficos, estos genes son polimórficos y por tanto susceptibles de sufrir cualquier tipo de variación genética. El polimorfismo genético es un tipo de mutación monogénica, en el que se produce la sustitución de un par de bases nitrogenadas por otro par distinto⁵⁴, pueden ocurrir en regiones codificantes y no codificantes de genes, debido a la forma accidental de las mutaciones.

Una variante se considera un polimorfismo cuando su frecuencia en una población excede el 1% de los alelos en esa población, y no depende del tipo de mutación que la causó, o del tamaño del segmento del genoma que está involucrado, o si tiene un efecto demostrable en el individuo⁵⁵.

El gen *MBL2* contiene 661 SNPs descritos en dbSNP, habiendo polimorfismos validados y no validados, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, pero algunos SNPs pueden no tener efecto funcional o son de muy baja frecuencia. Kalia et al. 2016, demostró que 12 SNPs en el gen son funcionalmente importantes en su estructura y expresión, utilizando varias herramientas bioinformáticas⁵⁶. De estos 12 SNPs solo 6 SNPs rs11003125, rs7095891, rs7096206, rs1800450, rs5030737 y rs1800451 están ampliamente estudiados en la etiología de enfermedades complejas^{57,58,59,60,61,26,62}.

Por tanto existen 3 variantes alélicas estructurales y otras 3 en la región promotora del gen que vamos a estudiar, lo cual da lugar a varios polimorfismos, donde se altera la oligomerización, además de facilitar la degradación enzimática que reducen significativamente sus concentraciones en plasma⁶³. Estas variantes incluyen SNPs, el alelo *B* (mutación en el codón 54, cambiando GGC a GAC y causando un cambio de aminoácido de glicina a ácido aspártico - p.Gly54Asp) se muestra en figura 9, otras dos deficiencias comunes, alelo *D* en el codón 52 (CGT a TGT), cambio de arginina a cisteína (p.Arg52Cys) y alelo *C*, en el codón 57 (GGA a GAA), sustituyendo la glicina por ácido glutámico (p.Gly57Glu)⁶⁴; otros tres SNPs ubicados en la región promotora del gen *MBL2* también tienen influencia en los concentraciones de MBL, llamados alelos MBL*H y L (debidos a un polimorfismo ubicado en -550 pb), los alelos X e Y (un SNP en -221 pb) y los alelos P y Q (un SNP no codificante en +4 pb), todas las posiciones contadas desde el sitio de inicio de la transcripción^{65,66}.

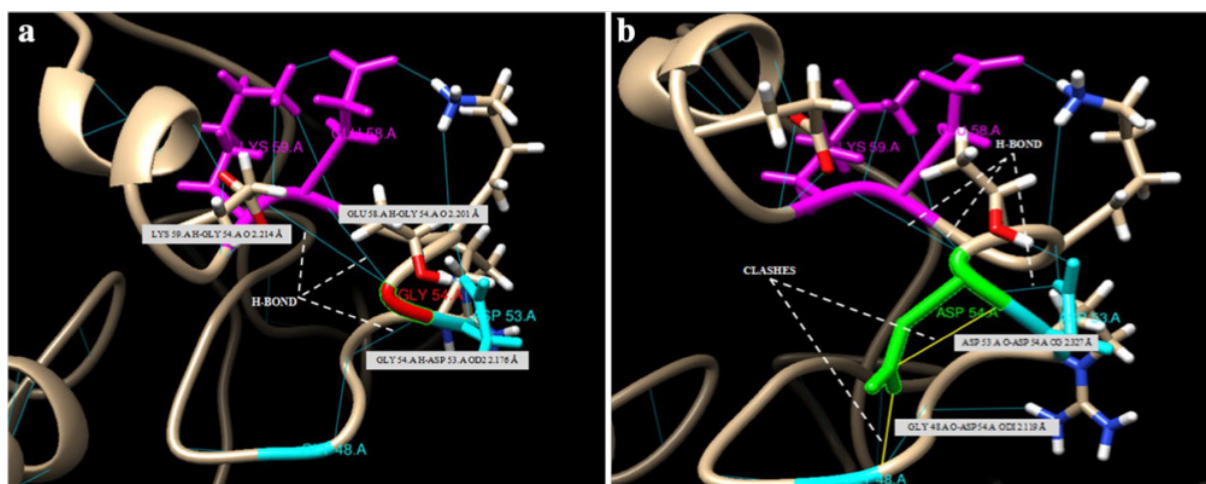


Figura 9. Análisis 3D del monómero de proteína MBL para residuo salvaje y variante en la posición 54 (variante predominante a concentración global); A) Gly 54 (color rojo), forma tres enlaces de hidrogeno (líneas azules, indicadas con líneas de puntos blancos) con residuos cercanos Asp 53 (color azul cielo), Glu 58 y Lys 59 (color morado). B) una red de choques (líneas amarillas, indicadas con líneas de puntos blancas) entre el residuo variante Asp 54 (color verde) con Gly 48 y Asp 53 (color azul cielo). Fuente: Kalia, N. et al 2016⁵⁶.

Los haplotipos promotores están en fuerte desequilibrio de ligamiento con las mutaciones del exón 1, lo que resulta en siete haplotipos extendidos comunes, HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, HYPD, LYPB y LYQC, que son los utilizados para caracterizar los fenotipos de producción sérica de MBL⁴⁷ y son lo que hemos utilizado en la tesis.

Para determinar el rs, o número de identificación NCBI del polimorfismo mostrado en la tabla 3, se visitó la página web: <http://www.ensembl.org/index.html>, una base de datos de genes y proteínas de humanos y otros animales creada por un proyecto entre EMBL - EBI (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute) y Wellcome Trust Sanger Institute (Reino Unido) que posee un buscador que permite encontrar gran cantidad de información acerca del gen de interés.

Tabla 3. Ubicaciones y alelos de las 6 variantes de *MBL2*. Fuente: Aino Rantala et al 2008⁶⁷

dbSNP no.	SNP location	Alleles	Alleles names
rs5030737	Exon 1 codon 52	C/T	A/D
rs1800450	Exon 1 codon 54	G/A	A/B
rs1800451	Exon 1 codon 57	G/A	A/C
rs11003125	Promoter - 550	G/C	H/L
rs7096206	Promoter - 221	C/G	X/Y
rs7095891	5'-UTS +4	X/T	P/Q

Los SNPs mencionados del exón 1 dan como resultado regiones tipo colágeno alteradas y, como consecuencia, interferencia con la formación de alto orden de oligómeros. Este deterioro de la polimerización causa bajas concentraciones séricas de MBL de alto peso molecular y deterioro de la función MBL⁶⁸. Según la etnia, la frecuencia alélica de los variantes B, C y D, comúnmente conocidos como alelos O, pueden estar por encima del 40%⁶⁹ (tipo salvaje A/A); y en consecuencia hay interferencia con la formación de oligómeros de alto orden (ver la figura 10). Además de los tres SNPs en exón 1, los sitios polimórficos ubicados en la región promotora de la MBL, incluidos los SNPs ubicados en posiciones -550 (variante H/L) y -221 (variante X/Y), ambas sustituciones de nucleótidos G a C. Además, el sitio polimórfico en la posición no traducida +4 (variante P/Q)^{64, 70}, estos últimos afectan a la expresión génica.

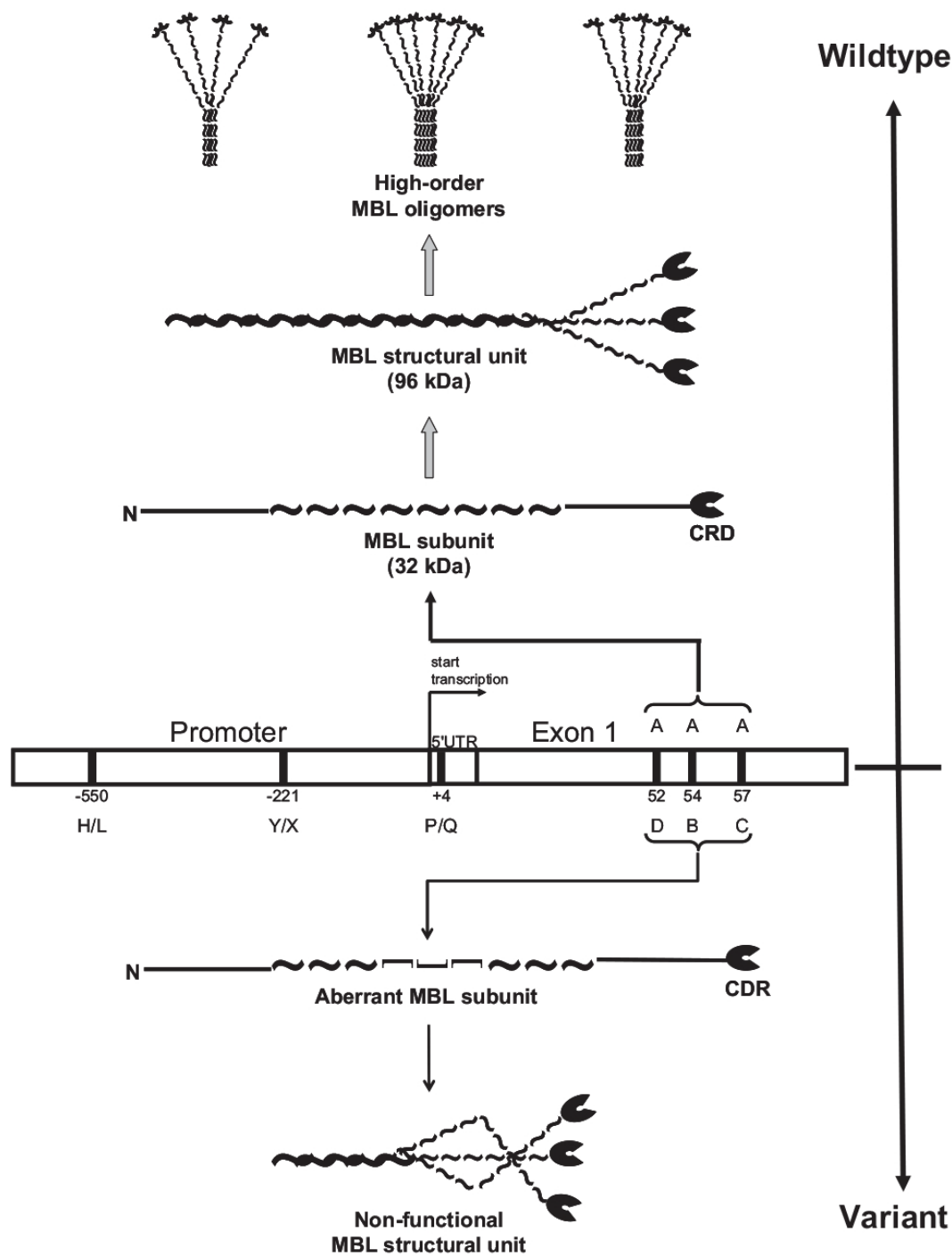


Figura 10. Estructura genética y funcional de MBL. Fuente: Lee H Bouwman· Bart O Roep, Anja Roos 2006 ⁷¹

A continuación se presentan dos figuras (11 y 12) con la localización poblacional de los siete haplotipos de las 6 variantes del gen *MBL2*.

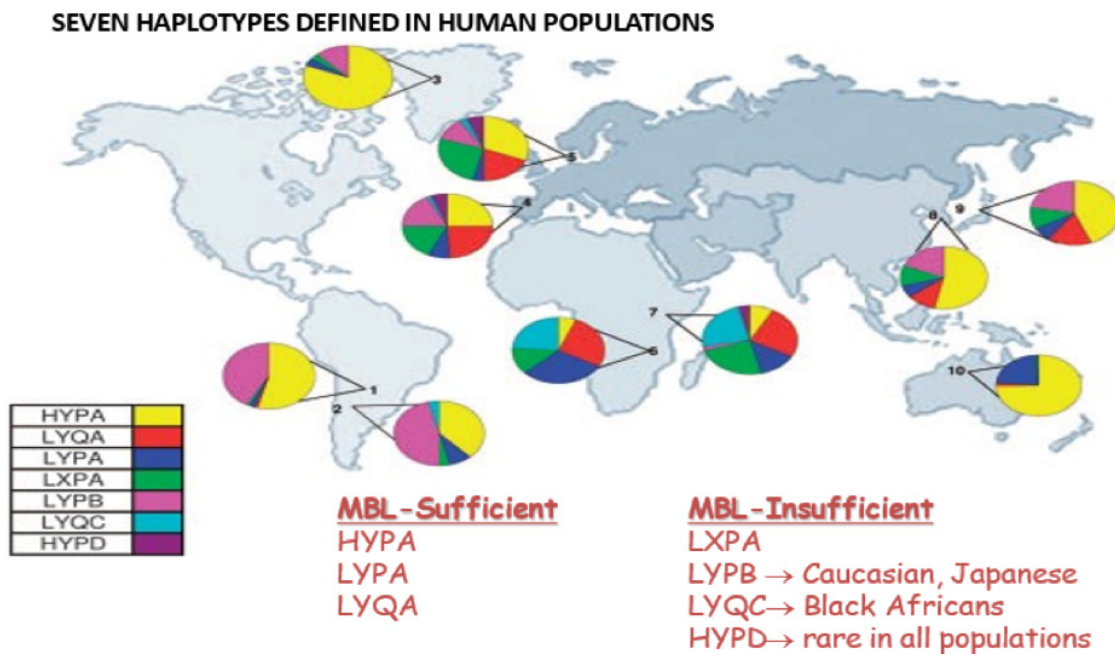


Figura 11. Ilustra la frecuencia de los distintos haplotipos en poblaciones seleccionadas y destaca el grado de variación étnica. Fuente: R. M. Dommett et al.2006⁴⁷ modificado

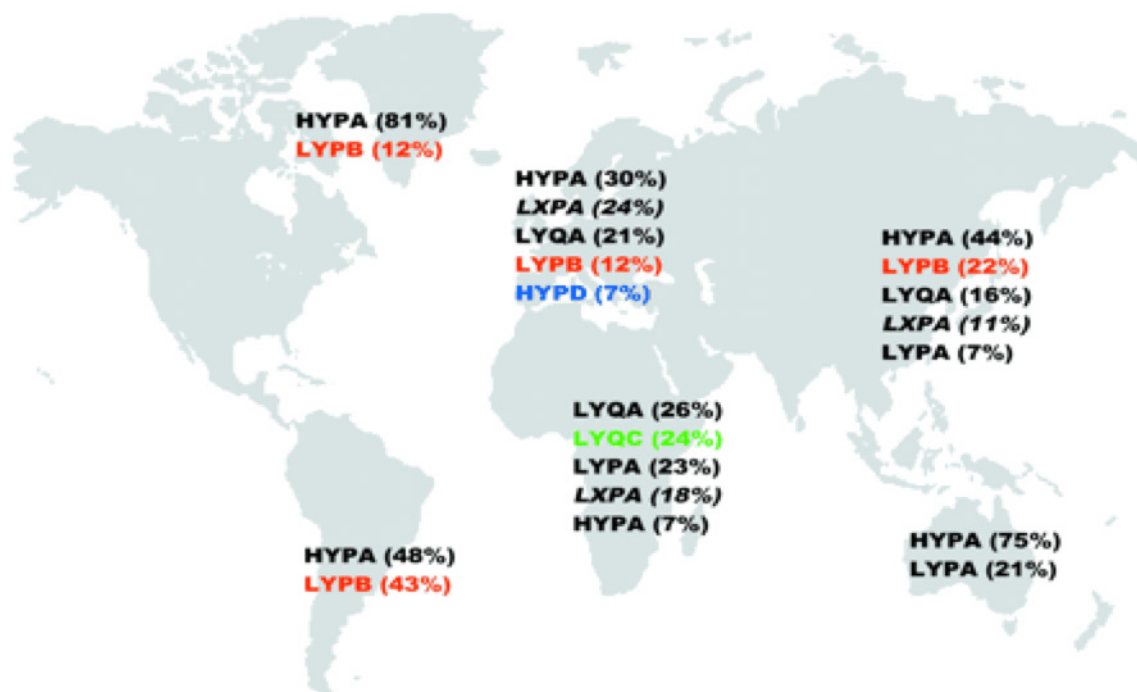


Figura 12. Distribución en porcentajes de los siete haplotipos de MBL en diferentes poblaciones seleccionadas. En general, los haplotipos asociados con mutaciones de sentido erróneo (HYPD, LYQC y LYPB) o regulatorias (LXPA) son muy comunes, con frecuencia superan el 30 % en muchas áreas del mundo. Fuente: Casanova and Abel 2004⁷²

4.2. Activación del complemento

Aunque el complemento generalmente se considera proinflamatorio, también se ha demostrado su importancia en la homeostasis, en la eliminación fagocítica de las células muertas y dañadas a través del reconocimiento de PAMPs por moléculas solubles de reconocimiento de patrones (PRMs); en los seres humanos, estos son la proteína del complemento C1q, la MBL, la colectina-LK (CL-LK) o las tres ficolinas L/M/H⁷³. Y por supuesto esta su papel en el control de las infecciones por diversos mecanismos.

Existen 3 vías de activación del complemento: Clásica, de la lectina y la alternativa, como aparece en la figura 13.

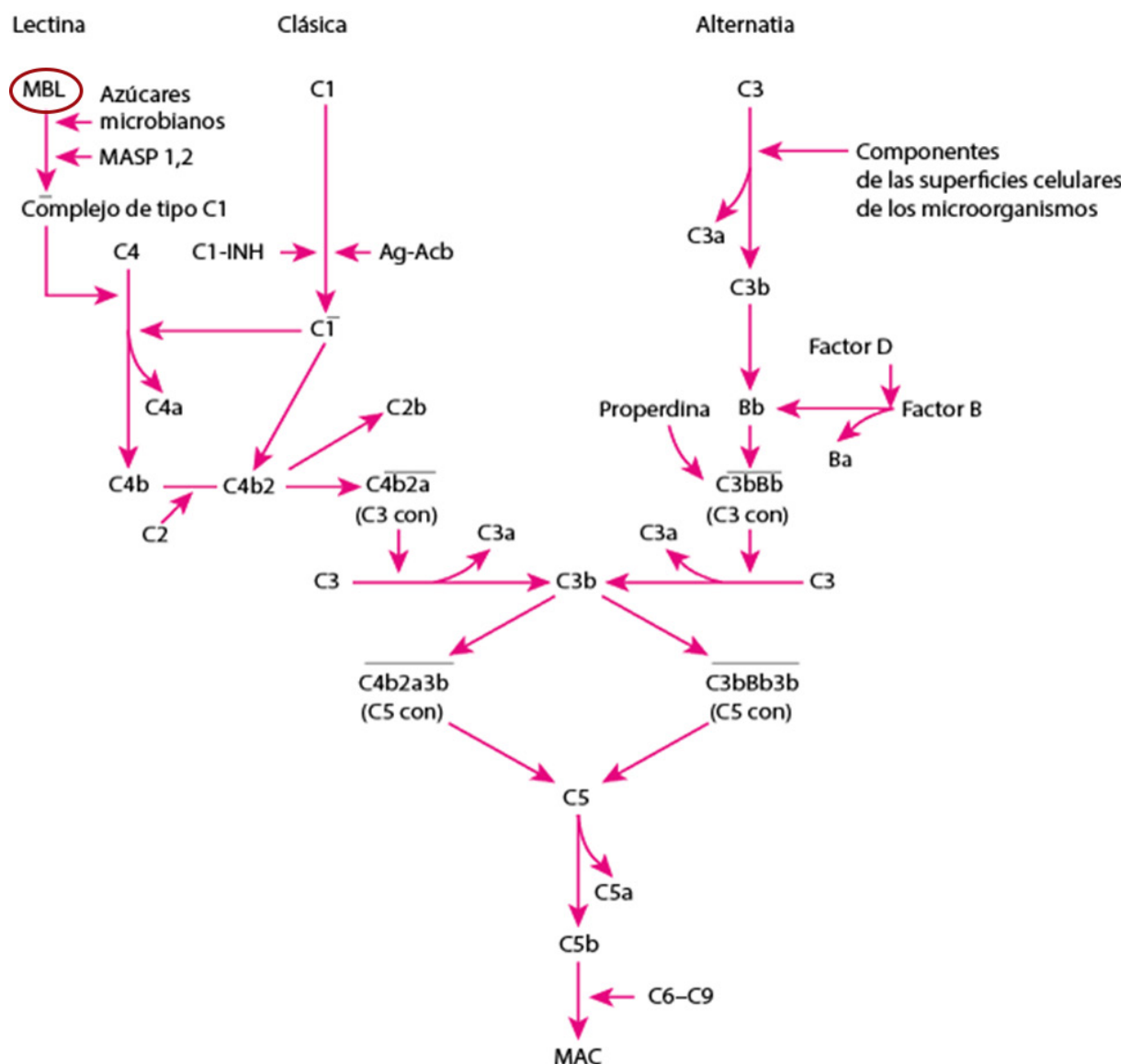


Figura 13. Las vías clásica, de la lectina y alternativa convergen en una vía final común cuando la C3 convertasa (C3) escinde C3 en C3a y C3b. Ac = anticuerpo; Ag = antígeno; C1-INH = inhibidor de C1; MAC = complejo de ataque a la membrana; MASP = serina proteasa asociada a MBL; MBL = lectina de unión a manosa. Fuente: pagina web: <https://www.msdmanuals.com> (Complement System)

4.2.1. La vía clásica de activación del complemento

Esta vía puede ser anticuerpo-dependiente, ocurre cuando C1 interactúa con el complejo Ag-IgM o agregados de los complejos antígeno-IgG. También independiente de los anticuerpos, lo cual ocurre cuando los polianiones (p. ej., heparina, protamina, DNA y RNA de células apoptóticas), las bacterias gramnegativas o la proteína C reactiva reaccionan directamente con C1. Esta vía está regulada por el inhibidor de C1 (C1-INH).

4.2.2. La activación de la vía de la lectina

Activada por MBL y ficolinas, es independiente de los anticuerpos; la MBL, una proteína sérica, se une a grupos de manosa, fructosa o *N*-acetilglucosamina sobre las paredes celulares bacterianas o virus (Figura 14).

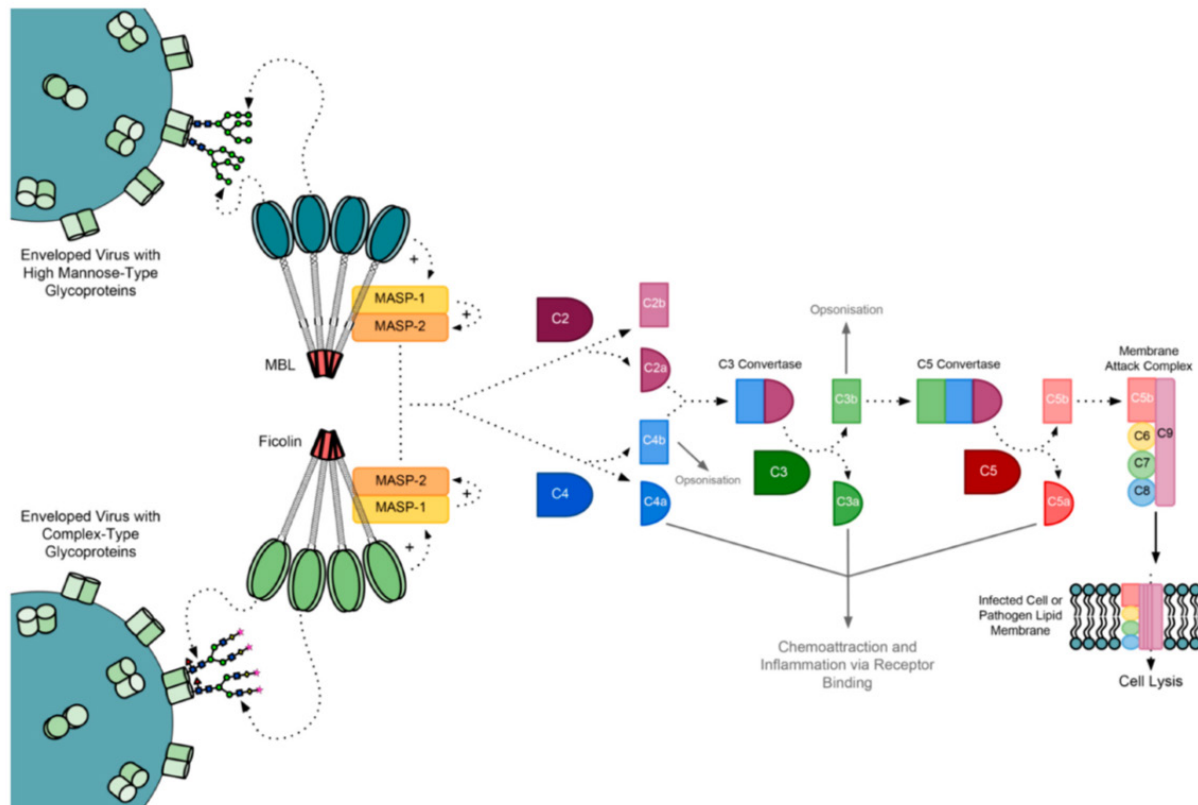


Figura 14. Vía de las lectinas en la activación del complemento. En la MBL y las ficolinas se producen cambios conformacionales tras la interacción con glicoproteínas virales a través de residuos de manosa y *N*-acetilglucosamina asociados con glucano, respectivamente. Esto activa MASP-1 seguido de MASP-2, que inicia una cascada de escisión de factores del complemento, con funciones en la opsonización, la inflamación y la lisis de células infectadas y de patógenos. Fuente: Christopher P. Mason and Alexander W. Tarr. 2015³⁵

En general, esta vía se parece a la clásica desde el punto de vista estructural y funcional. Los complejos MBL-MASP-2 escinden C4 y C2 para formar C3 convertasa (C4bC2a), se inicia una cascada de escisión de factores del complemento. Los complejos MBL-MASP-1 pueden activar C3 directamente, en

concordancia con un mecanismo de activación intercomplejo⁷⁴. Las ficolinas también funcionan en combinación con las MASP⁴⁷. Es posible que exista cierta redundancia fisiológica de esta con la activación de la vía clásica. Pero en un entorno en que la vía clásica se ve afectada por el descenso de C3 y C4 como consecuencia del trasplante, la deficiencia de MBL cuando hay la predisposición genética se hace más patente. He aquí otras de las razones por las que haya sido una de las dianas de esta tesis doctoral tras haber descrito el grupo investigador previamente la hipocomplementemia C3 y C4 como factor de riesgo de infección en trasplante cardíaco, debida a activación temprana, consumo y factores aun no bien establecidos.

4.2.2.1. Interacción molecular MBL/MASP

Como ya se mencionó previamente, los activadores de esta vía son las MASPs (proteasas séricas asociadas a MBL) presentes como proenzimas o zimógenos. Son dímeros dependientes de calcio. Para su activación requiere su dimerización que se produce por la región N-Terminal que es la responsable de la dimerización de MASPs y la asociación con las colectinas y ficolinas (Figura 15).

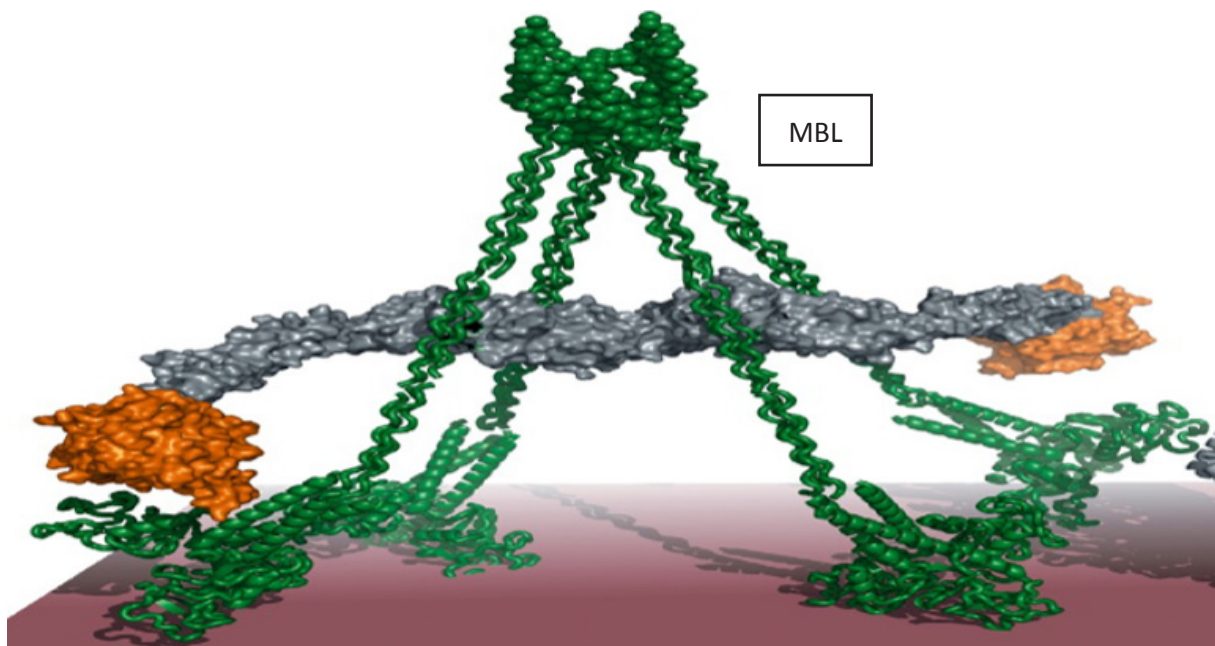


Figura 15. En la figura 15 se muestra la proteína MBL (en verde) asociada con un homodímero MASP-1 con sus dominios de serina proteasa SP (en naranja) que sobresalen de los tallos de colágeno MBL. Fuente: Goran Bajic et al 2015⁷⁴.

Tal como se muestra en la figura 16, la MBL se superpone con los dominios CUB1-EGF-CUB2 que presenta MASP humano, donde la extensión de los tallos de MBL similares al colágeno se cruzan en toda su longitud (59 residuos), lo que no ocurre en la proteína inactiva. La activación del complejo de zimógeno se produce al unirse a un patógeno; para ello el complejo, MBL y/o MASP deben sufrir cambios conformacionales al unirse. La forma más sencilla es a través de la flexión de la unión EGF-

CUB2 de la MASP, creando una estructura “resorte”. La liberación de la tensión hace que los tallos se separen y tira de los dominios SP de la MASP en alineación para permitir la escisión y activación recíprocas. Sólo el ángulo entre los tallos similares al colágeno y la flexión/extensión de la unión EGF-CUB2 es necesaria para la activación.

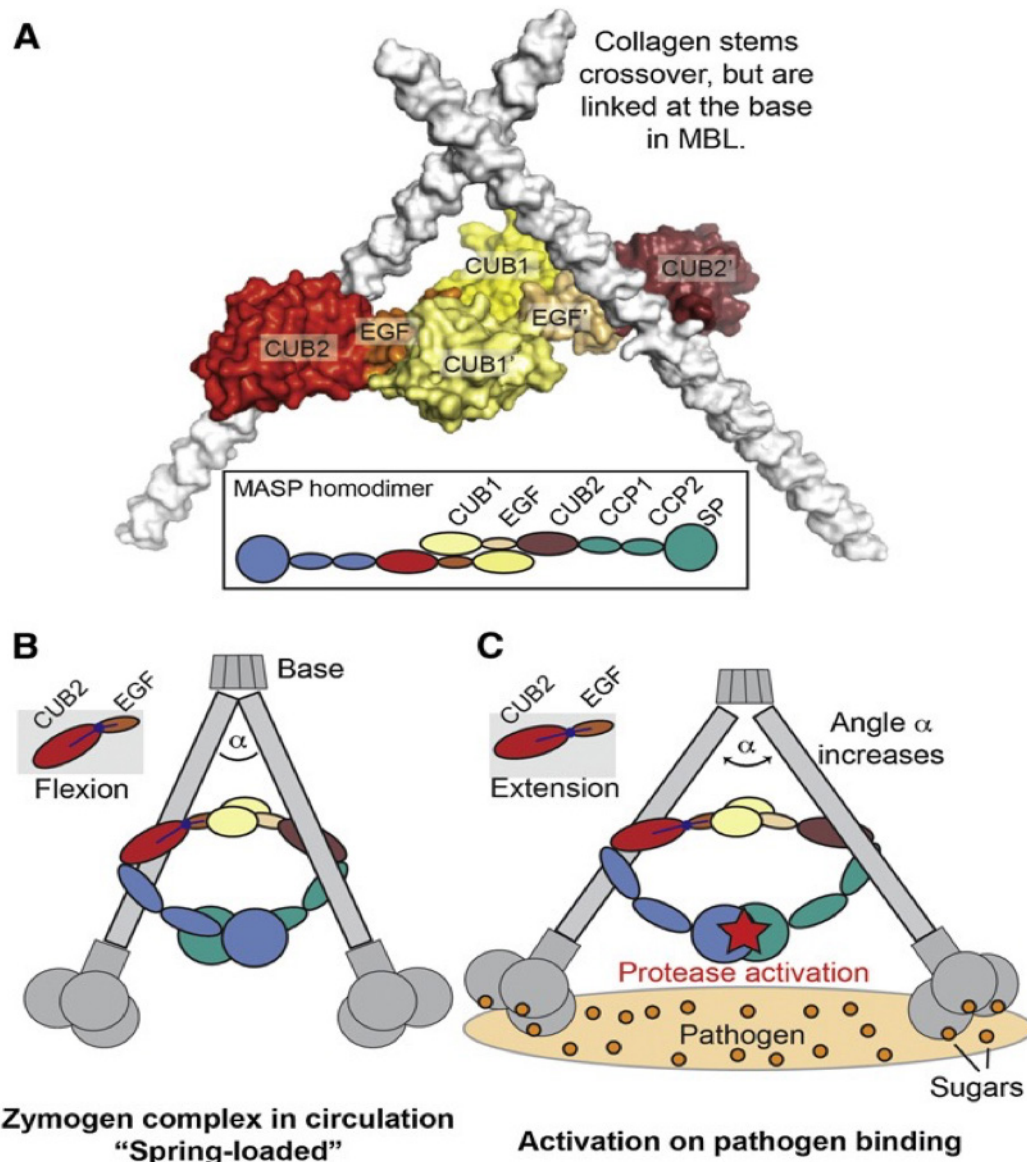


Figura 16. Base estructural de la activación del complemento en la ruta de lectinas, La superposición de las estructuras del complejo MBL/MASP-1. A) homodímero de MASP, B) complejo MBL/MASP inactivo, C) complejo MBL/MASP activado. Fuente: Alexandre R. Gingras et al 2011⁷⁵

A continuación, se muestra en la figura 17, la forma tridimensional del complejo MBL-MASP.

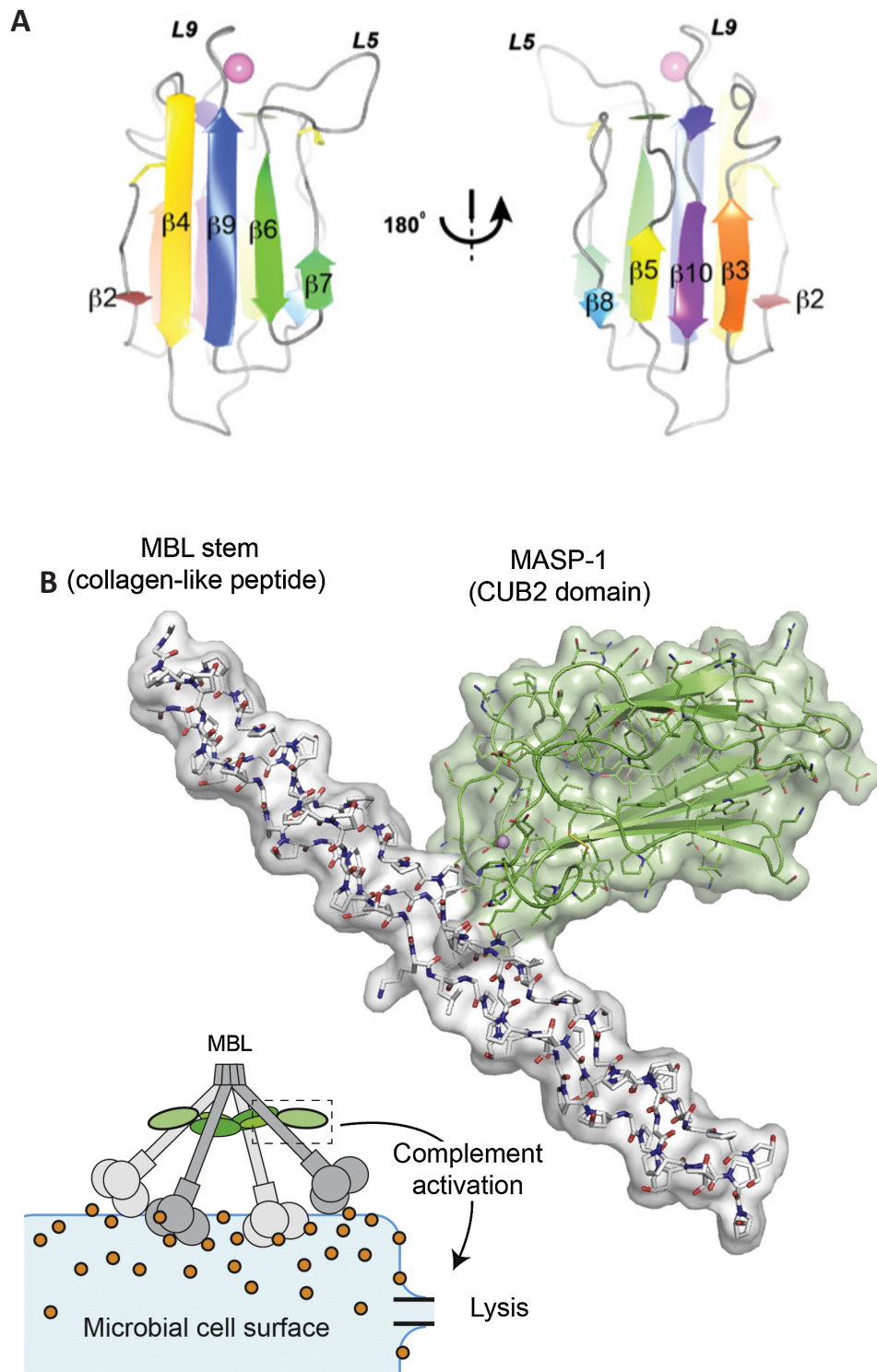


Figura 17. Base estructural de la activación del complemento en la ruta de lectinas, A) estructura dominio CUB2 de MASP. la estructura cristalina del dominio CUB2 (sobresalen del tallo MBL), es un sándwich β que comprende nueve cadenas β , $\beta 2$ – $\beta 10$, unidas por 9 bucles L1–L9, y con enlaces disulfuro entre cadenas que conectan el bucle L1 con la cadena $\beta 4$ y el bucle L5 con el bucle L7. El Ca^{2+} está unido a un extremo, intercalado entre los bucles L5 y L9, coordinado con seis ligandos (dos moléculas de agua); dispuestos en una bipirámide tetragonal, su función primero estabiliza los bucles de unión L5 y L9, de MASP y segundo, coordina la disposición específica de residuos ácidos que contactan con la MBL. B) Estructura cristalina de MASP-1 CUB2 (verde) unida al péptido 1 similar al colágeno MBL (blanco). El dominio CUB2 se encuentra principalmente en el exterior del cono creado por las subunidades MBL (izquierda). Fuente: Alexandre R. Gingras et al 2011⁷⁵

4.2.3. Vía alternativa

La activación de esta vía se produce cuando los componentes de las superficies de los microorganismos (p. ej., paredes celulares, lipopolisacárido de la pared bacteriana [endotoxina]) o las inmunoglobulinas (p. ej., factor nefrítico, IgA agregada) escinden pequeñas cantidades de C3. Esta vía está regulada por la properdina, el factor H y el factor acelerador de la desintegración (CD55).

Las tres vías de activación convergen en una vía final común cuando la C3 convertasa escinde a C3 en C3a y C3b (véase figura abajo). La escisión de C3 puede dar lugar a la formación del complejo de ataque de la membrana (MAC), el componente citotóxico del sistema del complemento. El MAC causa la lisis de células extrañas.

El factor I, con cofactores incluyendo la proteína cofactor de membrana (CD46), inactiva C3b y C4b (Información obtenida de la web: <https://www.msdmanuals.com>; Sistema del complemento por Peter J. Delves, PhD, University College London, UK Medically Reviewed Sep 2021. Consultado 23/11/2022).

4.3. Gen antagonista del receptor de interleucina-1 *IL1RN*

Otra de las barreras para la supervivencia en el trasplante durante sus primeras etapas es la inflamación. No hay ningún biomarcador de inflamación que se use sistemáticamente en protocolos de trasplante a excepción de la proteína C reactiva (PCR). De allí que la otra diana para estudio genético seleccionada para esta tesis doctoral fue la del gen antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1) al ser un protagonista importante de inmunidad innata potencialmente implicado en patología inflamatoria. La IL-1, como otras citocinas, es un componente de la familia de proteínas secretadas de pequeño peso molecular que tienen una amplia gama de funciones prominentes en la respuesta inmune⁷⁶. La IL-1 pertenece a una familia más amplia que contiene 11 miembros conservados (originalmente llamados IL-1 F1-F11): IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36a, IL-36b, IL-36g, IL1RN, IL-36Ra, IL-38 e IL-37. Los miembros de IL-1 están codificados por un grupo de genes IL-1 en la banda cromosómica 2q1422⁷⁷.

Las citocinas de las que forma parte la IL-1 son moléculas que proporcionan una señalización para la respuesta inflamatoria⁷⁸. Numerosas estirpes celulares son capaces de secretar la IL-1, pero su producción viene determinada genéticamente por tres genes diferentes: *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN*, que codifican para IL-1 α , IL-1 β , y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), respectivamente. Las IL-1 α e IL-1 β actúan como citoquinas pro-inflamatorias, mientras que la IL-1Ra se comporta como anti-inflamatoria; localizadas en la posición 2q13, en una región de 430 kb en el cromosoma 2^{79,80}.

IL-1Ra fue la primera citoquina de origen natural o molécula similar a una hormona que se describió para funcionar como un antagonista de receptor específico⁸¹. *IL1RN* se identificó por primera vez en 1990⁸². Codifica la proteína IL-1Ra que se une al receptor de la interleucina 1 (IL-1R1) e inhibe la unión de la IL-1 α e IL-1 β , bloqueando la actividad biológica de estas dos citocinas.⁸³

4.3.1 Estructura de la proteína IL-1Ra

La IL-1Ra está compuesta por 12 hebras β y los enlaces entre ellas que forman un barril β antiparalelo con un tamaño de ~ 17 kDa^{84,85}, de 153 residuos, 19.6 kb⁸⁶ similar a IL-1 β ⁸⁷. IL-1 β es producida por monocitos estimulados, macrófagos y, en menor medida, por otros tipos de células, como neutrófilos, células epiteliales y endoteliales, células musculares lisas y fibroblastos⁸⁸. La actividad de IL-1 β está regulada por IL-1Ra, citoquina naturalmente antiinflamatoria que se une a receptores IL-1 tipo1 y que es producida por células mieloides activadas, hepatocitos, fibroblastos⁸⁹ y células madre mesenquimales (MSC)^{90,91}. En la figura 18 se puede ver la estructura en 3D de la IL-1Ra y su complejo de unión con su receptor.

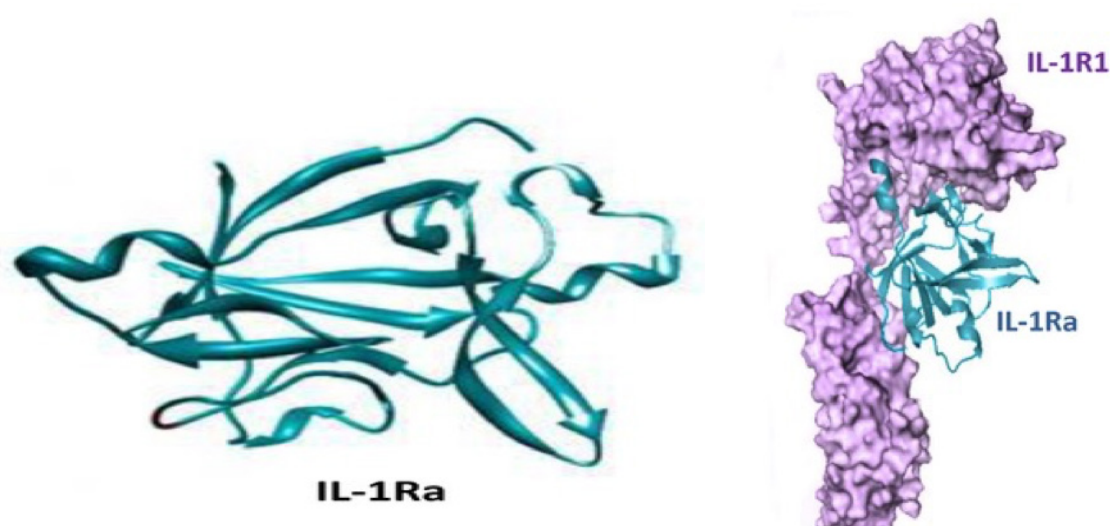


Figura 18. Estructura 3D de IL-1Ra y su complejo de unión con su receptor IL-1R1. Fuente: Barkestani et al 2021⁹²

4.3.2 Variantes de la proteína IL-1Ra y su receptor

En los mamíferos, hay dos variantes estructurales principales de IL-1Ra: secretora (sIL-1Ra) e intracelular (icIL-1Ra) que se localizan en el citoplasma⁹³, distintas regiones promotoras controlan la síntesis de cada isoforma⁹⁴. sIL-1Ra parece ser que inhibe de forma competitiva la unión de IL-1 a los receptores de la superficie celular. sIL-1Ra es producida por los hepatocitos en fase aguda. Se han descrito concentraciones elevadas en pacientes con una amplia variedad de enfermedades inflamatorias, como la deficiencia de IL-1Ra que se presenta en casos de un síndrome autoinflamatorio genético poco frecuente y grave, llamado osteomielitis multifocal estéril con periostitis y pustulosis (obtenido del portal de <https://www.orpha.net>); pero también se ha observado en enfermedades infecciosas y enfermedades neoplásicas, así como después de cirugía⁹⁵.

La variante secretora de IL-1Ra limita la bioactividad de IL-1 α e IL-1 β a través de la inhibición de IL-1-RI como un inhibidor competitivo; mientras que las isoformas intracelulares (icIL-1Ra), aunque claramente antagónicas, tienen una función que no está del todo definida. Es posible que icIL-1Ra pueda competir con IL-1 α en el núcleo para inhibir sus efectos. Además, pueden liberarse isoformas de icIL-1Ra de las células y se unen a la IL-1RI unida a la membrana para limitar la actividad de IL-1⁹⁶.

La restauración del equilibrio entre IL-1Ra e IL-1 a través de una variedad de enfoques es un objetivo terapéutico en enfermedades inflamatorias crónicas específicas⁹³.

El gen *IL1RN* consta de cuatro exones, con dos primeros exones alternativos; uno codifica IL-1Ra secretada (exón 1s), el otro codifica IL-1Ra intracelular (exón 1ic)^{97,98}; según empalme en s1 se notificaron tres isoformas intracelulares *icIL-1RN1*, *icIL-1RN2* e *icIL-1RN3*⁹⁹, que tienen localización en el citoplasma, tal como describen Gibson et al. 2012, en la figura 19 donde se muestra el primer exón (s1) para la transcripción de la forma soluble *sIL-1RN*. Arriba de esto está el primer exón (ic1) para la transcripción de la forma intracelular *icIL-1RN1*; exón (ic2), está presente en la transcripción *icIL-1RN2*, situada entre los exones ic1 y s1. (Información completada en la web:

<https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40953/il1rn>, Gómez-Flores-Ramos L, Torres-Flores J, Gallegos-Arreola MP *IL1RN* (interleukin 1 receptor antagonist), March 2014. Consultado 26/11/2022).

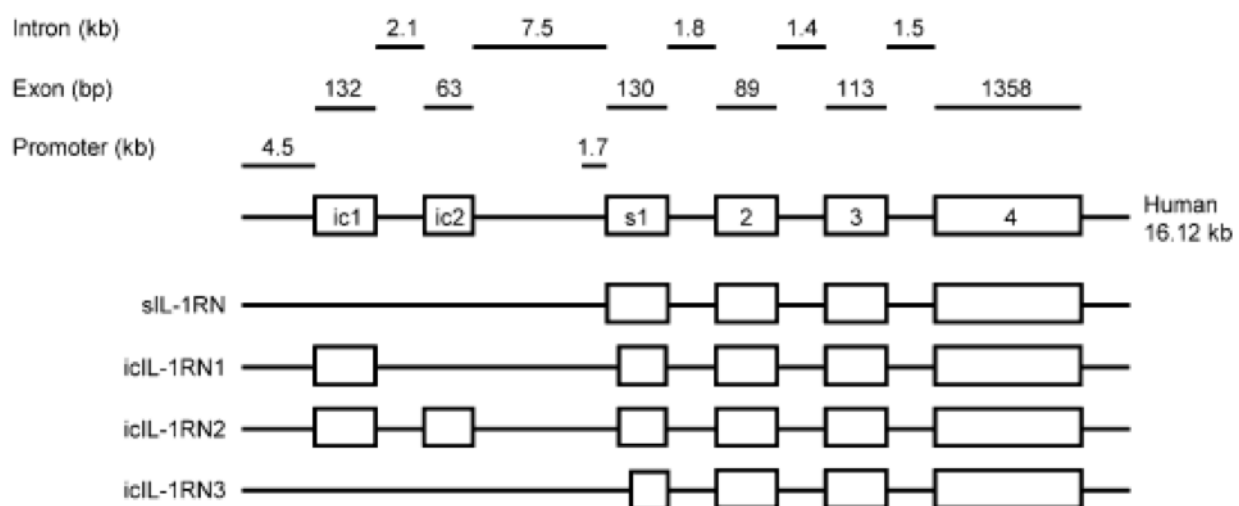


Figura 19. Estructura del exón/intrón de la IL- 1RN humana y las diversas variantes de empalme de los mismos. Fuente: Gibson et al. 2012⁹⁹. sIL-1RN forma soluble antagonista del receptor de IL1; icIL-1RN1, icIL-1RN2, icIL-1RN3 formas intracelulares antagonista del receptor IL1: 1, 2 y 3 respectivamente

Por otro lado, existen dos formas del receptor IL-1R, el receptor de tipo I es el principal responsable de transmitir señal para el efecto inflamatorio de la IL-1, mientras que los receptores de tipo II pueden actuar como un supresor de la actividad de la IL-1, uniendo a la proteína auxiliar transmembrana IL-1RacP⁸⁵; tal como lo hace el IL-1Ra⁶⁷.

En la figura 20 de Khazim et al se describe como IL-1RI que se une a IL-1 α/β y se asocia con IL-1RacP para transmitir señal vía Myd88/IRAKs, cuando IL-1Ra se une a IL-1RI no permite asociación de IL-1RacP e interrumpe la vía anterior; sin embargo, cuando IL-1RII se une a IL-1 α/β pero falta el segmento citoplasmático, también compite con IL-1RI por IL-1RacP, en el caso de IL-1RII soluble con o sin IL-1RacP soluble une IL-1 α/β y evita que se una a IL-1RI. IL-1RII citosólica intracelular interactúa con prec-IL-1 α e impide su señalización durante necrosis¹⁰⁰

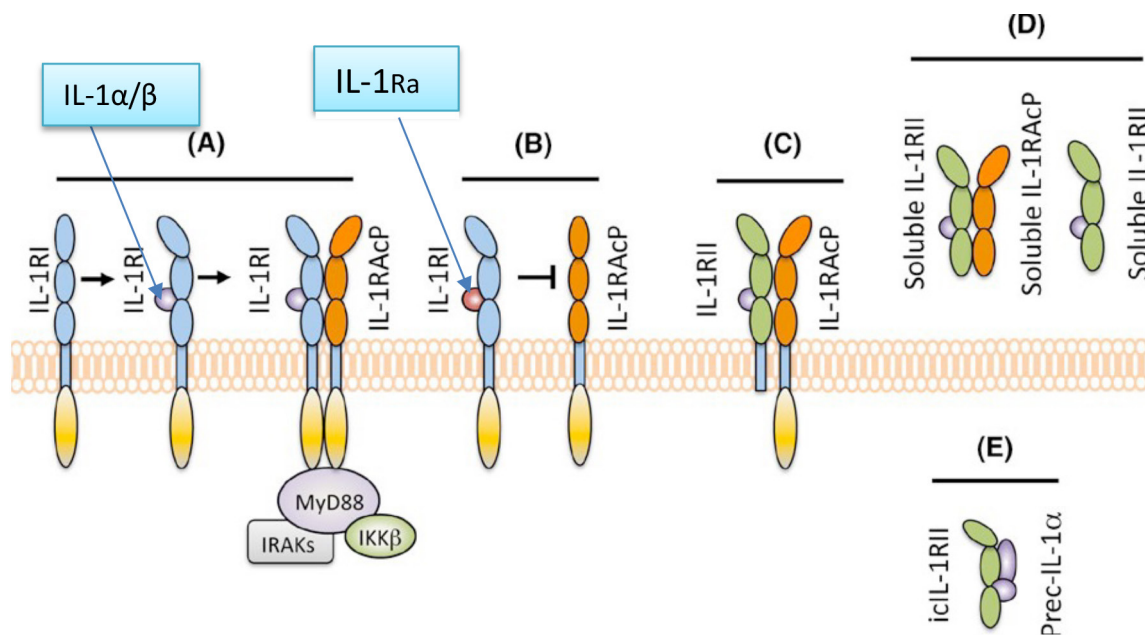


Figura 20. Muestra la estructura, función, señalización e interacciones de la familia de receptor IL1. Fuente: Khazim et al. 2018 modificado

4.3.3. Polimorfismos *IL1RN*

El gen *IL1RN* en la posición +2018 C/T en el exón 2, y el sitio polimórfico Penta alélico (figura 21) en el intrón 2 que contiene un VNTR (número variable de repeticiones en tándem) de una secuencia de 86 bp son los más estudiados.

Los polimorfismos que existen en regiones del gen que no codifican para un determinado producto génico, como las regiones reguladoras y los intrones, aunque no codifiquen para un producto génico concreto, dependiendo de la función que ejercen pueden afectar a la expresión de la proteína, dando origen a una alteración funcional. Los alelos de VNTR de 86bp se denominan según las frecuencias observadas en sujetos sanos. Los alelos 1, 2, 3, 4 y 5 presentan cuatro repeticiones, dos repeticiones, cinco repeticiones, tres repeticiones y seis repeticiones del fragmento de 86 pares de bases (pb)^{102,103}. La variación más común en el gen que da lugar a la existencia de los genotipos que se describen de la siguiente manera, por la existencia de cinco alelos diferentes (AA/410 pb 1/1, BB/240 pb 2/2, CC/500 pb 3/3, DD/325 pb 4/4 y EE/595 pb 5/5)¹⁰⁴, ver en figura 22, el alelo 1 es el más común, el alelo 2 está asociado con inflamación prolongada y los alelos 3,4,5 son raros^{105,106}.

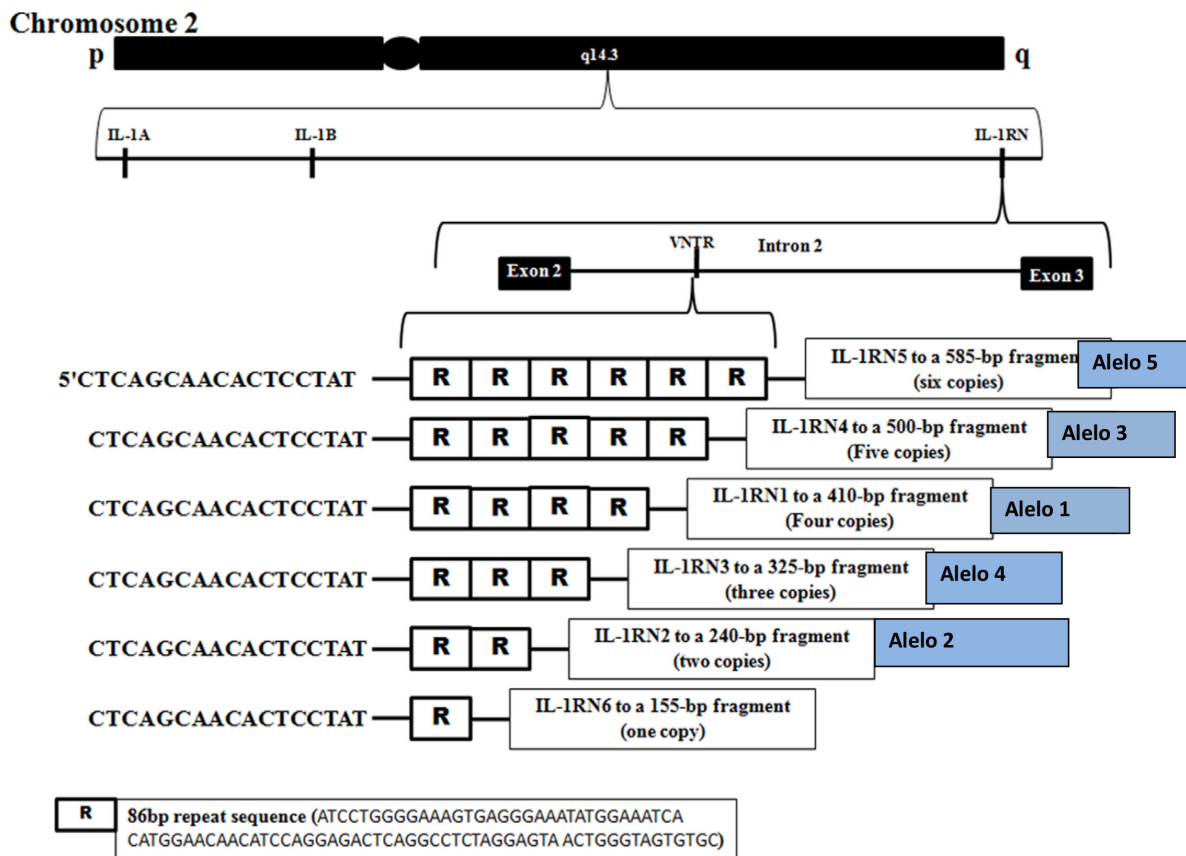


Figura 21. Diagrama esquemático del gen *IL1RN* que muestra la posición del polimorfismo VNTR junto con varios alelos. Fuente: Deepika Jaiswal et al 2013 modificado¹⁰¹.

*IL1RN*2* predispone al desarrollo o a la gravedad de una variedad de enfermedades en gran parte de origen celular epitelial. Tanto la producción alterada de IL-1Ra como la sobreproducción de IL-1β están relacionadas con la presencia de este alelo⁹³ (figura22), además de asociación con efecto proinflamatorio¹⁰⁷. El alelo 2 se asocia con una mayor producción de IL-1Ra tras la estimulación con LPS y es más frecuente en pacientes con sepsis grave, aunque no parece implicar un peor pronóstico¹⁰⁸.

La IL-1β es un elemento crítico para la respuesta proinflamatoria en la defensa antimicrobiana. La estimulación para producción de IL-1β desencadena secuencialmente la activación de genes para otros mediadores proinflamatorios, lo que conduce a la activación de células fagocíticas e iniciación de un mecanismo inmunitario mediado por células en respuesta a la infección¹⁰⁹. Intercambios de base en las posiciones -31 y -511 del promotor de IL-1β se ha asociado con un aumento de la unión de factores nucleares y mayor secreción de IL-1β, asociado con el alelo 2 en *IL-1RN*¹¹⁰.

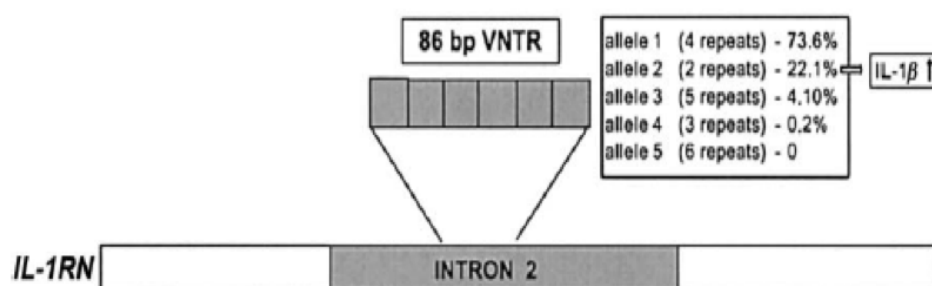


Figura 22. Se observa la frecuencia alélica de la población. Estudio realizado en Munich, Alemania; el 88,6% de los pacientes eran de nacionalidad alemana, el 7,6% eran de nacionalidad turca y el resto de bosnia, grecia, croata o serbia. Fuente: Rad et al.2003¹⁰²

Anakinra: Proteína recombinante antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA)

La deficiencia de la Interleucina-1Ra es un estado autoinflamatorio autosómico recesivo causado por mutaciones que afectan a *IL1RN*. La ausencia del antagonista del receptor de la interleucina-1 permite la acción sin oposición de la interleucina-1, lo que da como resultado una inflamación sistémica potencialmente mortal con afectación de la piel y los huesos. También en la deficiencia del antagonista del receptor de interleucina-1 DIRA, las mutaciones en *IL1RN* dan como resultado que no se exprese la proteína o que se exprese una proteína truncada no funcional. El tratamiento de estos pacientes con Anakinra indujo una respuesta clínica rápida¹¹¹.

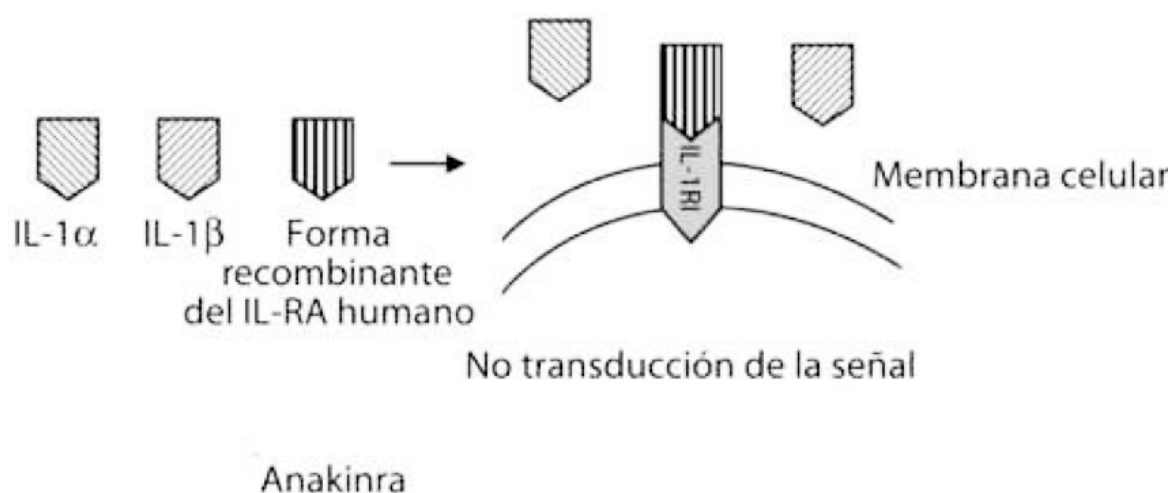


Figura 23. Tratamiento bloqueador de interleucina-1 (IL-1). Anakinra, una forma recombinante del antagonista del receptor de IL-1 humana IL-1 (IL-1Ra). Fuente: Ignacio Rego-Pérez et al 2009¹¹²

La ausencia o deficiencia de IL-1Ra puede deberse a mutaciones del gen *IL1RN* y provoca un trastorno autoinflamatorio, cuyos síntomas son mitigados por Anakinra (figura 23), un IL-1Ra recombinante¹¹¹.

El tratamiento con el antagonista del receptor de IL-1 recombinante, Anakinra, han generado inquietudes sobre las reacciones farmacológicas. En la tabla 4, que muestran João P Luís et al 2022, describe Anakinra, la forma recombinante no glicosilada de la IL-1Ra humana natural, con un amplio espectro de enfermedades que han sido explotadas por la industria farmacéutica y los académicos en las últimas décadas.

Tabla 4. IL-1Ra como agente terapéutico disponible para la modulación de la actividad de IL-1. Fuente: Int. J. Mol. Sci. 2022¹¹³. www.clinicaltrials.gov (accessed on 23 December 2021). 1. Aprobación de la FDA para indicación terapéutica; 2. Ensayo clínico. (CAPS) Síndrome periódico asociado a criopirina.

Therapeutic Agent	Type	Target	Company	Therapeutic Indication
Anakinra	Recombinant form of human IL-1Ra	IL-1R1	Amgen (now Swedish Orphan Biovitrum)	Rheumatoid arthritis ¹ [217]
				Gout [218]
				CAPS 1 [219]
				Type 2 Diabetes [220]
				Cardiovascular disease [221,222]
				Giant Cell Arthritis (NCT02902731) ²
				Subarachnoid Hemorrhage (NCT03249207) ²
				Intracerebral Hemorrhage (NCT03737344, NCT04834388) ²
				Multiple Sclerosis (NCT04025554) ²

El inicio de la terapia temprano con Anakinra en el curso de la enfermedad puede mejorar el resultado; puede usarse como terapia de primera línea o como ahorrador de corticosteroides¹¹⁴. A pesar de que estudios previos identificaron numerosos polimorfismos de nucleótido único (SNP) en distintos loci asociados con la artritis idiopática juvenil (AIJ) sistémica, solo la alta expresión del alelo 2 *IL1RN* se correlacionó fuertemente con la falta de respuesta a la terapia con anakinra.^{115,116}

La eficacia del bloqueo de anakinra en ratones parece estar influenciada por antecedentes genéticos¹¹⁷, como el estudio en pacientes con AIJ sugiere que las variantes genéticas de *IL1RN*, como la presencia del alelo 2 VNTR, predicen la falta de respuesta a la terapia con anakinra¹¹⁶.

Estudios preliminares de modelo experimental de trasplante cardíaco sugieren que el daño por isquemia reperusión tiende a disminuir cuando se añade anakinra al modelo. De allí que se justifica evaluar la presencia de polimorfismos del gen de IL-1Ra y si estos se asocian a eventos inflamatorios post trasplante¹¹⁸.

4.4. Receptores tipo toll (TLR)

Quisimos hacer una aproximación preliminar a la evaluación de parte del sistema de presentación antigénica en la tesis, seleccionando para ello el estudio de los receptores tipo toll (del inglés *toll like receptors*, TLR). La familia de TLR es un sistema sofisticado y altamente especializado que puede identificar una variedad de ligandos microbianos y endógenos. Son receptores inmunitarios innatos codificados en línea germinal que el huésped emplea para detectar la presencia de patógenos invasores y de peligro^{121,122}. Los TLR se expresan en una gran variedad de tipos de células, incluidas células presentadoras de antígenos (APC), células epiteliales y endoteliales, así como en leucocitos como neutrófilos, mastocitos, basófilos y eosinófilos¹²³. La identificación de los primeros TLRs en mamíferos fue a finales de la década de 1990^{119, 120}. Se han descubierto al menos trece TLRs en mamíferos que pueden detectar múltiples PAMPs¹¹², hasta la fecha se han descubierto 10 en humanos^{124,125} y 13 en ratones¹²⁶. En humanos, los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 están asociados a membrana externa y responden a PAMPs asociados a la superficie bacteriana. Los TLRs 3, 7, 8 y 9 se encuentran en la superficie de los endosomas y responden a PAMPs basados en ácidos nucleicos tanto de virus como de bacterias¹²⁷ (tabla 5). Incluyen lipoproteínas bacterianas (a través de TLR2) y lipopolisacáridos (a través de TLR4). Curiosamente, los TLR2 y TLR4 se expresan en la superficie celular y parecen importantes para el reconocimiento bacteriano¹²³. Como las infecciones bacterianas son las más frecuentes tras el trasplante de corazón, seleccionamos estos 2 TLRs simplemente para caracterizar su cinética. El TLR2 provoca una respuesta más eficaz frente a ligandos como peptidoglicanos, proteínas de choque térmico, lipoproteína, anfoterina del grupo 1 de alta movilidad (HMGB1), ácido lipoteicoico y zymosan¹²⁸. Mientras que el TLR4 lo hace frente a ligandos como proteínas de choque térmico, LPS, proteína de fusión RSV fibrinógeno, fibronectina, heparán sulfato, ácido hialurónico, envoltura del virus del tumor mamario de ratón, HMGB1¹²⁹. Por lo tanto, los TLR son parte integral de la estrategia de reconocimiento de patrones del huésped en respuesta a la infección.

Tabla 5. Receptores TLRs y sus ligandos microbianos asociados. Fuente: Jane A Mitchell et al 2007¹³⁴.

Receptor	PAMP asociado	Patógeno
TLR 1, 2, 6	Pam3CSK4, PGN, zimosano	Bacterias Gram positivas
TLR 4	LPS, lípido A	Bacterias Gram negativas
TLR 5	Flagelina	Bacterias (flagelo)
TLR 3	dsRNA	Virus
TLR 7, 8	ssRNA	Virus
TLR 9	CpG DNA	Bacterias (DNA)
TLR 10	Desconocida	¿

Como se ha indicado antes, en esta parte de la tesis se ha querido hacer una evaluación preliminar de la cinética de estos receptores ante la práctica ausencia de su caracterización en el entorno del trasplante de corazón.

La estimulación de las células innatas (p. ej., células dendríticas, macrófagos, monocitos, neutrófilos y mastocitos) a través de los TLR da como resultado la maduración, la regulación positiva de la expresión

del MHC, así como la de las moléculas coestimuladoras (CD80/CD86 y CD40), y la producción de citocinas proinflamatorias como IL-12, TNF- α e IL-6^{130,131,132,133}. Cada vez hay más pruebas de que la polarización de las respuestas inmunitarias reside en la progenie, el desarrollo y el fenotipo de las APC¹³⁵.

4.4.1 Células dendríticas

Las células dendríticas (CD) apenas representan entre el 0,2-0,5% de los leucocitos sanguíneos circulantes; sin embargo, se ubican en su mayoría en los tejidos, debajo de la piel y de nuestras mucosas, en el parénquima de los órganos y en los tejidos linfáticos¹³⁶. Las CD son APC profesionales que desempeñan un papel central en el establecimiento y el control de las respuestas inmunitarias mediante la preparación de linfocitos T auxiliares y citotóxicos⁵. En humanos, se han identificado dos subpoblaciones de células dendríticas, CD mieloides (CDm) y CD plasmacitoides (CDp). Las CDm, derivadas de precursores mieloides, expresan los marcadores celulares CD11c, CD13 y CD33^{124,15,137}, y requieren factor estimulante de colonias de granulocitos (GMFC) y macrófagos en su microambiente para sobrevivir. Las CDm, también llamadas CD Tipo 1 (CD1), producen altas concentraciones de IL-12 tras estimulación con TNF- α o CD40 ligando, e inducen respuesta tipo Th1. Por otro lado, las CDp se originan a partir de precursores linfoides, muestran una morfología similar a células plasmáticas y expresan receptor de la interleucina-3 alfa IL-3R α (CD123) en superficie, necesario para facilitar su diferenciación y supervivencia; producen IFN- γ e IFN- β en respuesta a virus^{219,220,221}. Las CDp, también llamados CD de tipo 2 (CD2), inducen respuesta tipo Th2 independientemente de IL-4 de células T vírgenes¹²³, en diversos estudios se ha demostrado su capacidad de presentar antígeno tanto a linfocitos T CD4 y CD8^{222,223}.

Los monocitos circulantes se han visto como células precursoras que proporcionan macrófagos tisulares y poblaciones de CD^{138,139}

A continuación (figura 24), puede verse las líneas de diferenciación de las células inmunitarias.

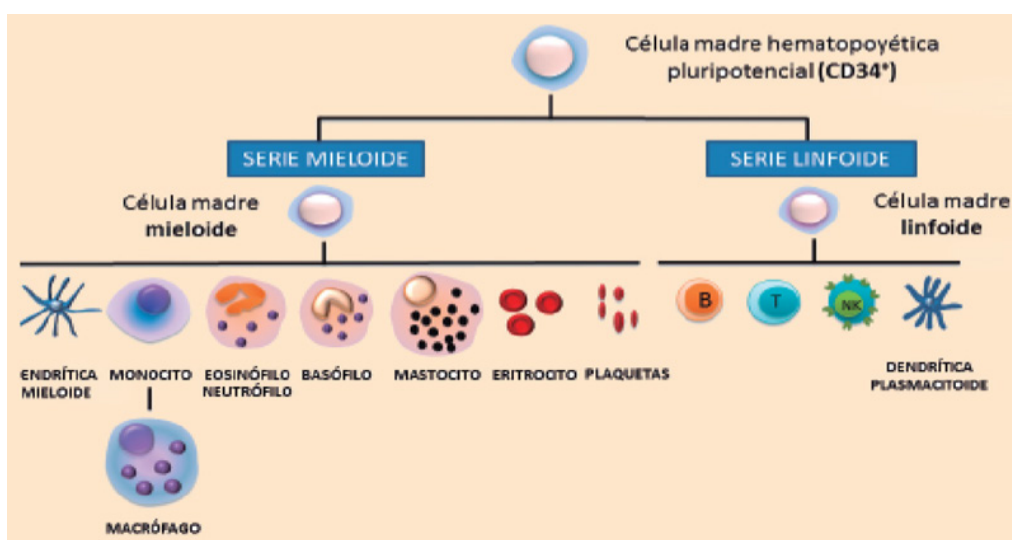


Figura 24. Esquema representativo de las líneas de diferenciación de los distintos componentes celulares del sistema inmune. NK: *natural killer*. J. Monserrat Sanz et al 2017¹⁵

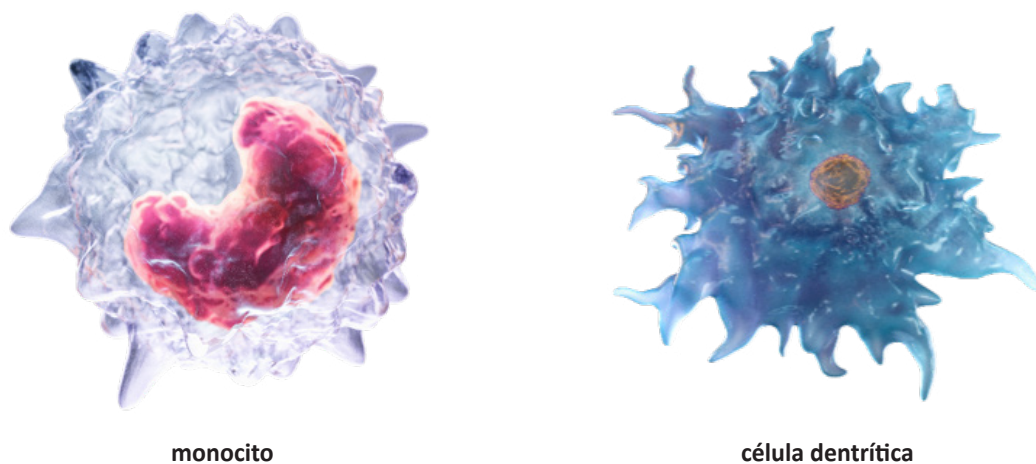


Figura 26. Imágenes 3D de las células de inmunidad innata para el estudio de expresión de TLR. Fuente: <https://gskpro.com/es-es/landing-bancoimagenes/>

La expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II en los monocitos es un requisito previo para la presentación eficaz de antígenos a las células T CD4, un componente importante de la respuesta inmunitaria a la infección¹²². Se ha encontrado que la expresión del antígeno leucocitario humano DR (HLA-DR) en los monocitos de sangre periférica se correlaciona altamente con la infección en muchos escenarios clínicos¹⁴³. Varios investigadores han demostrado que en los pacientes con infección y sepsis se observan valores más bajos de expresión de HLA-DR y están relacionados con las tasas de mortalidad^{144,145,146}. Por el contrario, se ha demostrado que varios componentes bacterianos aumentan la expresión de HLA-DR entre ellos los de la pared celular bacteriana que incluyen lipopolisacáridos¹⁴⁷, peptidoglicano y ácido lipoteicoico¹⁴⁸. Además, se ha demostrado que las citocinas inflamatorias, incluido el interferón γ (IFN- γ), entre otros^{149,150,151} regulan al alza HLA-DR. El aumento de la liberación de IFN- γ es estimulado por varios patógenos entéricos, incluidos *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* y *Clostridium difficile*^{152,153}. Por esta razón esta tesis incluye un subestudio de caracterización de la cinética de la expresión de HLA-DR en monocitos en distintos tiempos antes y después del trasplante cardíaco.

Los subconjuntos de monocitos se han denominado “clásicos” (Ly6Chi en ratones o CD14hi en humanos) y “no clásicos” (Ly6Clo en ratones o CD16hi en humanos)¹⁵⁴.

Los monocitos clásicos pueden estar en circulación sanguínea y durante la homeostasis en algunos órganos como el bazo, los nódulos linfáticos, la piel y los pulmones, mientras que los monocitos no clásicos estarían principalmente en los vasos sanguíneos y su principal función sería mantener la integridad del endotelio vascular¹⁵⁵.

5. Superfamilia de receptores tipo toll y su relacion de señalizacion con IL-1r y con la MBL

5.1. TLRs y IL1R

Los TLR y los IL-1R, cuyo ligando antagonista es el mencionado *IL1RN*, pertenecen a una superfamilia de receptores transmembrana conservados evolutivamente involucrados en procesos innatos e inflamatorios, por lo tanto respuestas fundamentales, como la inducción de ciclooxigenasa tipo 2, el aumento de la expresión de moléculas de adhesión o la síntesis de óxido nítrico, son respuestas indistinguibles de los ligandos IL-1 y TLR⁹⁶. Los miembros de la familia IL-1R se diferencian de los TLR en su región extracelular, que contiene tres dominios similares a inmunoglobulinas (Ig)¹⁵⁶; mientras que cada TLR reconoce y se une a sus PAMPs afines a través de un dominio LRR extracelular. Las LRRs se encuentran en tándem y consisten entre 20-40 aminoácidos de largo, los que contienen una secuencia consenso de 10 aminoácidos, XLXXLXXN, característica de las LRR en todos los TLR¹⁵⁷, la unión del ligando agonista desencadena la señalización al promover la dimerización de los TLR¹⁵⁸. Sin embargo comparten un dominio citoplasmático común, dominio de homología (TIR), que es esencial para iniciar la señalización intracelular¹⁵⁹, este dominio TIR citoplasmático es pequeño y globular, y consta de una hoja β paralela rodeada de hélices α ^{160,96,159} (ver en la figura 27).

Los miembros de la familia IL-1R interactúan con proteínas accesorias para formar complejos de señalización de receptores heterodiméricos¹⁵⁶, que contengan tanto IL-1RI como IL-1Racp^{161, 162}.

La similitud en la señalización de receptores se muestra en la figura 28 donde ST2L (IL-33r) e IL-1R a través de la vía MyD88, IRAK4 y TRAF6 como lo hacen TLR4, TLR5, TLR1 y TLR6 que se expresan en la superficie celular y reconocen su ligando formando un heterodímero con TLR2, activan NF- κ B, que conduce a la liberación de citocinas inflamatorias. Mientras TLR3, TLR7/TLR8 y TLR9 envían señales a través de TRIF que se expresan en el endosoma¹⁶³

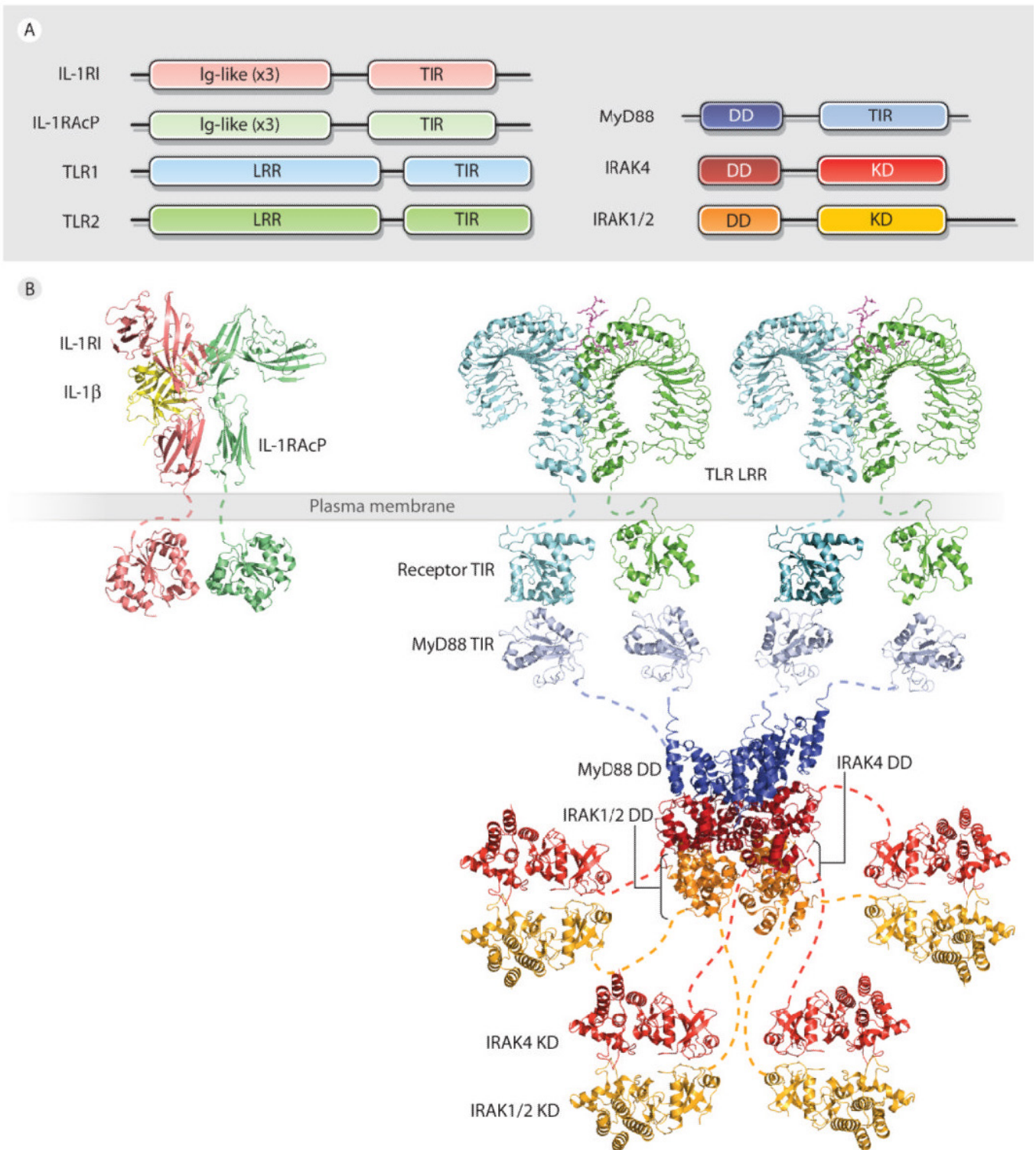


Figura 27. Modelo de formación del señalosoma TLR/IL-1R: MyD88: IRAK. A) Organización de dominios de los miembros de la familia TLR/IL-1R (arriba), MyD88 (centro) e IRAK (abajo). B) Modelo de señalización TLR/IL-1R. Arriba a la izquierda: IL-1RI (rosa) unido a IL-1β (amarillo) y co-receptor IL-1RAcP (verde claro). Arriba a la derecha: dímero TLR1 (cian)/TLR2 (verde) unido a lipopéptido (magenta). Los dominios TIR del receptor citosólico interactúan con los TIR MyD88 (azul claro) para promover la formación del complejo DD de Myddosome. Los DD MyD88 (azul) se oligomerizan con IRAK4 (rojo) e IRAK1/2 (naranja) para promover la fosforilación y activación de los dominios quinasa IRAK (abajo a la derecha). Fuente: Ferrao et al. 2012¹⁵⁹.

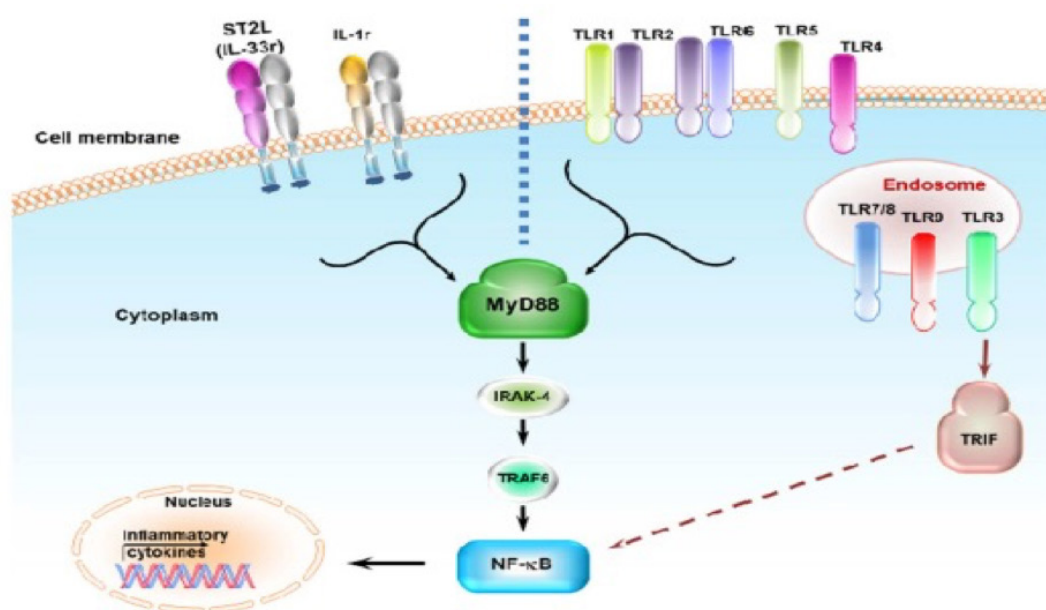


Figura 28. Señalización TLR/IL1R, que comparten vía MyD88. Fuente: Ramadan and Paczesny 2015¹⁶³

5.2. TLRs y MBL

El sistema del complemento y los TLR son dos componentes importantes de la inmunidad innata. Los TLRs celulares son fundamentales ya que pueden reconocer patrones moleculares asociados a patógenos en diferentes compartimentos celulares y desencadenar las respuestas inmunitarias innatas tal como se ha ido desarrollando en secciones anteriores de esta introducción. Después de la unión, los TLR pueden iniciar la activación por el complejo NF-κB, MAPK e IRF a través de diferentes vías de señalización que conducen a la producción de citoquinas proinflamatorias e interferón tipo I. Los PRM solubles se producen y se secretan rápidamente en el líquido extracelular en respuesta a diversas señales de peligro y compromiso de TLR¹⁶⁴. Los PRM solubles generalmente pertenecen a diferentes clases moleculares, incluidas las pentraxinas (CRP, SAP, PTX3), las colectinas (C1q, SP-A, SP-D, **MBL**) y las ficolinas. Estos PRM humorales actúan principalmente a través de la activación, aglutinación y neutralización del complemento. También tienen receptores celulares como CR1 (CD35), CD91/CRT, C1qRp (CD93) y FcγR, ilustrado en la figura 29. Después de unirse a estos receptores, los PRM solubles pueden facilitar el reconocimiento y la fagocitosis de un microorganismo por parte de las células inmunitarias (opsonización) y pueden regular las funciones de los TLR celulares a través de mecanismos que aún no están bien claros¹⁶⁵. Sin embargo, se vio que los heterodímeros TLR2 emplean varias moléculas accesorias, como lectina de unión a manosa (**MBL**), para facilitar el reconocimiento de ligandos mediante el uso de patógenos bacterianos y virales como herramientas, por ejemplo, MBL, la molécula accesoria de TLR2 opsoniza *staphylococcus aureus* y posteriormente promueve la fagocitosis bacteriana. En particular, MBL media la inducción de la señalización y presenta estos ligandos al heterodímero TLR2/6, que posteriormente activa MyD88-respuesta proinflamatoria dependiente.^{166,167,168,169}

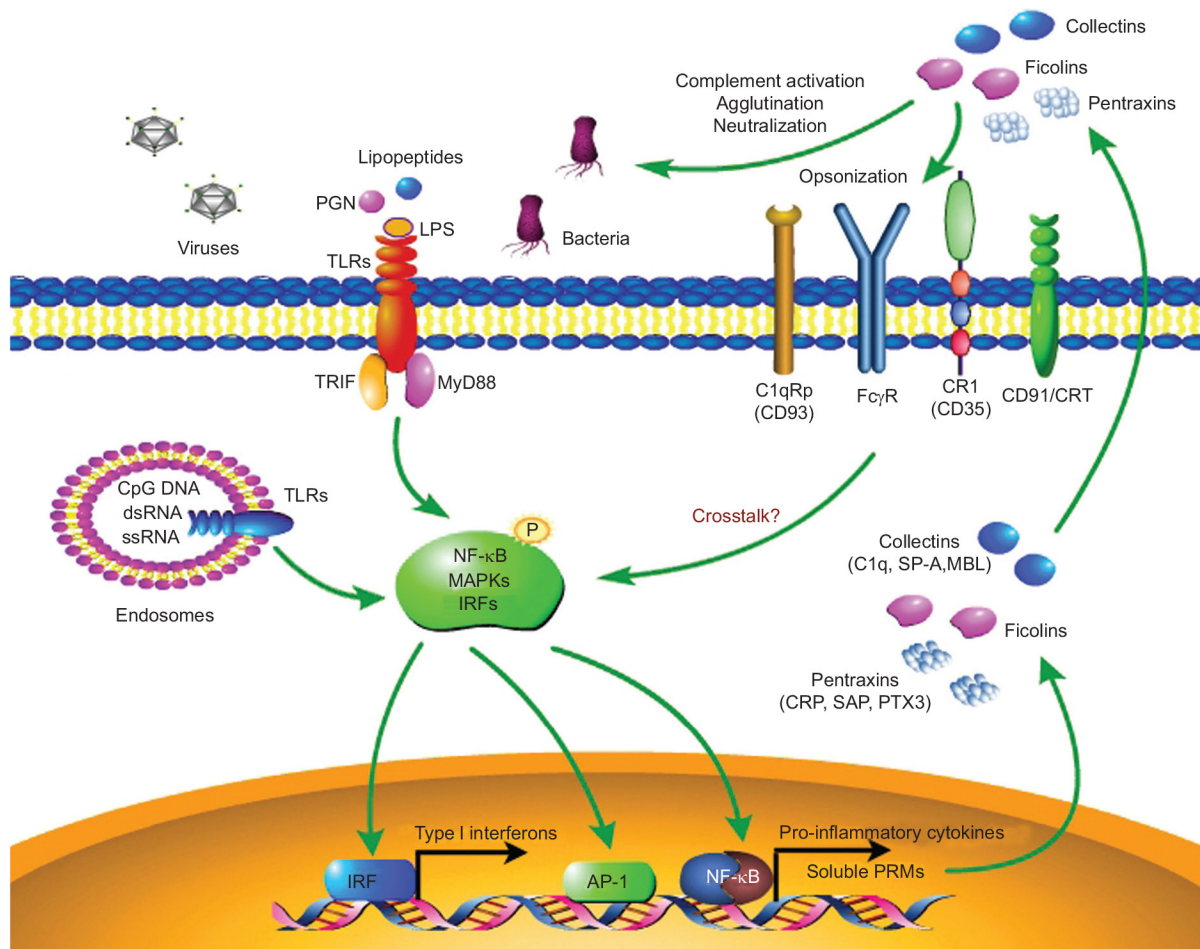


Figura 29. Respuestas inmunitarias innatas iniciadas por TLRs celulares y los patrones de reconocimiento molecular soluble PRMs extracelulares, como MBL. Fuente: Peng Zhang 2015¹⁷⁰

6. Tratamiento inmunosupresor

Los regímenes inmunosupresores comprenden tres etapas en relación al momento en que se administran a los pacientes: tratamiento de inducción, terapia de mantenimiento, y tratamiento anti-rechazo.

La inmunosupresión inicial sigue sin introducir cambios significativos en los últimos años, se trata de una etapa llamada de inducción que disminuye la incidencia de rechazo miocárdico agudo inicial. En el hospital Gregorio Marañón, en alrededor del 80% de los casos se usa una inducción pretrasplante basada en anticuerpos anti-CD25 (fundamentalmente basiliximab).³ En España, se realizó un ensayo multicéntrico que comprobó que es más seguro y mejor tolerado frente a muromonab (OKT3) al no producir el efecto liberador agudo de citoquinas¹⁷¹.

La inmunosupresión de mantenimiento empieza unos días después de la inducción y permite su uso prolongado. Se basa en la triple terapia donde se trata a casi todos los pacientes con tacrolimus, micofenolato o ácido micofenólico y corticoides³. La inmunosupresión de mantenimiento ideal será

aquella que evite el desarrollo de fibrosis del injerto y rechazo crónico sin comprometer la vida del paciente con las principales complicaciones asociadas a la misma como son las infecciones y las neoplasias.

Para introducir tratamiento del rechazo se tiene en cuenta la afección miocárdica, la alteración de la función ventricular y la situación clínica del paciente. Hay dos tipos de rechazo que difieren en la aproximación terapéutica. En el rechazo celular, el tratamiento se basa en esteroides a altas dosis y anticuerpos antilinfocitarios (como la timoglobulina o los anticuerpos anti-timocitos, ATG); mientras que en el rechazo humoral (mediado por anticuerpos), se utilizan esteroides, plasmaféresis, rituximab e inmunoglobulinas IV a altas dosis.¹

Todavía quedan varias cuestiones pendientes para el uso de nuevos fármacos al respecto, debido a la toxicidad asociada (infecciones, cáncer, nefrotoxicidad y alteraciones metabólicas) y por la posible interacción con otros fármacos, lo cual complica el manejo y puede comprometer el pronóstico de estos enfermos. Aunque se utilizan varios medicamentos debido a los protocolos de tratamiento, todavía no existe un régimen inmunosupresor perfecto. En la actualidad, la individualización de regímenes inmunosupresores es posible incorporando nuevos agentes en los protocolos, mediante el uso de fármacos biológicos que permitan minimizar el uso de corticoides o inhibidores de la calcineurina, pero también mediante el uso de biomarcadores que identifiquen el riesgo de las distintas complicaciones como la infección y el rechazo. Estas aproximaciones han ido variando a lo largo del tiempo conforme se ha ido generando la evidencia con el uso de distintos fármacos¹⁷², como puede verse en la figura 30.

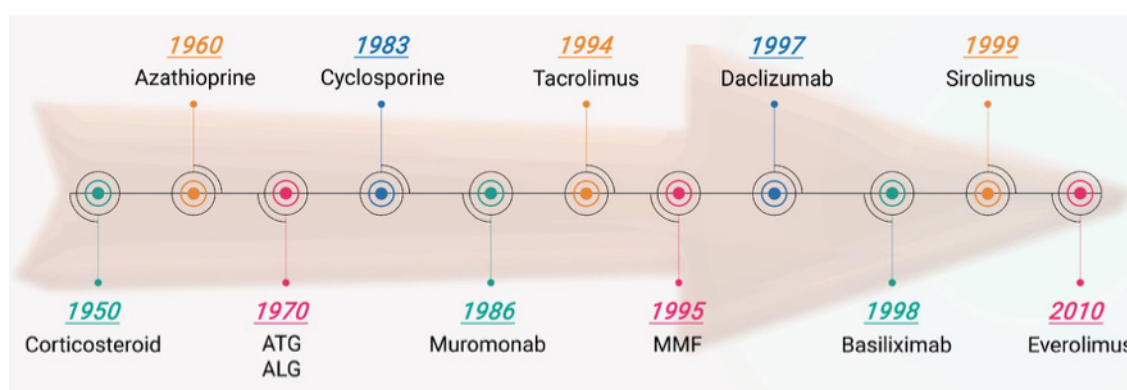


Figura 30. Cronograma de los fármacos inmunosupresores en trasplante. Fuente: H. PARLAKPINAR AND M. GUNATA 2021¹⁷²

7. Profilaxis antimicrobiana

La susceptibilidad de los receptores de trasplante de órgano sólido TOS a las infecciones depende de múltiples factores, en el postrasplante destaca el tipo de cirugía, complicaciones quirúrgicas, la

necesidad de usos de ventilador y asistencias ventriculares, el grado de inmunosupresión, la profilaxis antimicrobiana, la inmunización realizada efectivamente, la susceptibilidad individual genética del paciente a la infección, el desarrollo de rechazo, la presencia de infecciones, si se tiene o no infección por citomegalovirus (CMV), entre otros factores a destacar^{173,174}.

Distintos trabajos han caracterizado algunas alteraciones inmunológicas que predisponen a los pacientes a desarrollar infecciones. La hipogammaglobulinemia IgG después del TOS se asocia con riesgo de desarrollo de CMV, infecciones fúngicas y respiratorias, y con una disminución en la supervivencia de 1 año¹⁷⁵. Esto se describió en un metanálisis que incluyó muchos estudios de centro único con bastante coherencia entre ellos sobre el rol de la hipogammaglobulinemia IgG en trasplante de órgano sólido.

El CMV es el virus oportunista más común en TOS y tiene un impacto negativo sustancial tanto en el injerto como en el paciente (los llamados efectos directos e indirectos)^{176,177}.

El escenario clínico de mayor riesgo en el trasplante es la transmisión a través de donantes positivos (D+) a los receptores seronegativos (R-) para CMV, debido a la falta de inmunidad específica preexistente en estos últimos. La infección por CMV se desarrolla de 36 a 100% en receptores TOS, con tasas de enfermedad sintomática entre 11-72% sin profilaxis^{178,179}, en el caso de CMV (D+/R-), más del 50% desarrollaría infección por CMV si no se administra profilaxis antiviral efectiva¹⁷⁹.

Los antivirales óptimos y la duración para la profilaxis pueden variar según el tipo de órgano trasplantado. La mayoría de protocolos incluyen de entrada ganciclovir IV (GCV, 5 mg/kg al día o dosis ajustada por función renal) seguido de valganciclovir oral (900 mg al día o dosis ajustada por función renal)¹⁸⁰ siendo actualmente los fármacos más utilizados para la profilaxis^{181,180}, o para el inicio de terapia de una infección de leve a moderada¹⁸².

Hay estrategias de profilaxis universal y también de terapia anticipada. La profilaxis universal implica la administración de medicamentos antivirales a todos los pacientes o a un subconjunto de pacientes “en riesgo”, comenzando dentro de los 10 días posteriores al trasplante y continuando durante un período definido (generalmente entre 3-6 meses).¹⁸⁰ La terapia anticipada consiste en iniciar el uso de antivirales solo cuando se detecta carga viral de CMV en la sangre. El uso de inhibidores mTOR como terapia inmunosupresora de mantenimiento por el efecto protector anti CMV o el uso de inmunosupresión menos intensa son estrategias potenciales para la prevención de complicaciones por CMV en pacientes con mayor riesgo¹⁸³.

Enfoques de uso de inmunoterapia también se utilizan en algunos centros de trasplante cardíaco y pulmonar. A manera de ejemplo se ha demostrado en receptores de trasplante de células hematológicas D+/R- que los pacientes que recibieron profilaxis con inmunoglobulina IV anti-CMV (CMV-Ig) (n = 28) mostró bajas tasas de infección primaria por CMV en comparación con el grupo control (n = 33)¹⁸⁴. Algunos trabajos también han documentado algo similar en trasplante cardíaco y pulmonar, aunque no es una estrategia de uso frecuente.

La profilaxis durante el primer mes postrasplante está dirigida principalmente contra infecciones nosocomiales en relación con el donante y la cirugía. En La profilaxis antibacteriana siempre hay que tener en cuenta el tipo de trasplante, así como la colonización tanto del donante como del receptor y debe darse por el menor tiempo posible.⁸ Timsit et al (2019) en su revisión hace un repaso a los principales aspectos de las infecciones así como la profilaxis en pacientes de TOS (Ver tabla 6 adjunta modificada seleccionando sólo la sección de trasplante cardiaco).

Tabla 6. Abordaje diagnóstico y terapéutico de las enfermedades infecciosas en receptores de trasplante de órgano sólido. Fuente: Modificado de Timsit et al 2019⁸

	Patógeno	Factores de riesgo	Profilaxis	Duración
Receptores de corazón				
Bacterias	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.	Cirugía prolongada y repetida, problemas técnicos que afecten al trasplante, catéteres vasculares, ventilación mecánica, uso de asistencias ventriculares, sondas torácicas, colecciones no drenadas, hemorragia mediastínica, fugas anastomóticas, reintervenciones, etc.	Cefuroxima o cefazolina	48–72 h (mantener lo más breve posible)
Hongos	<i>Aspergilosis</i>	Colonización, altas dosis de esteroides, uso de gammaglobulina anti-timocito, segundo trasplante, infección por CMV, rechazo agudo.	Anfotericina B en aerosol, voriconazol	4–6 semanas
	<i>Pneumocistis jiroveci</i>	Todos los pacientes	TMP–SMX	12 meses
	<i>Candida albicans</i>	Inmunosupresión T	Varios regimenes	1 mes
Virus	CMV	D+ o R+, D+/R-	Ganciclovir IV, valganciclovir	3–6 meses
	VHS, VZV	D+ o R+	Valaciclovir	3 meses
Parásitos	<i>Toxoplasma</i>	D+ o R+	TMP–SMX	D+, R– o 6 meses (R+)

TMP - SMX trimetoprima-sulfametoxazol, donante D, receptor R, citomegalovirus CMV, virus herpes simple HSV, virus varicela zoster VZV. R+ receptor CMV positivo.

8. Biomarcadores de riesgo en TOS

¿Por qué investigar biomarcadores de riesgo de infección en esta tesis doctoral? Pese a los avances en terapias inmunosupresoras y nuevas estrategias de profilaxis, las infecciones siguen siendo una causa frecuente de muerte de los pacientes tras el trasplante cardíaco. En los últimos años no ha habido incorporaciones de nuevos biomarcadores de riesgo de infección en las guías clínicas con suficiente fuerza o lo suficientemente traslacionales como para que se usen sistemáticamente en todos los centros de trasplante.

El interés por esta área de investigación es vigente. Así, por ejemplo, según la organización médica colegial en España OMC (en <https://www.medicosypacientes.com/>; consultado 10 enero 2023), el futuro de la investigación en trasplantes se centrará en la búsqueda de biomarcadores asociados a la evolución clínica para mejorar la asistencia al paciente. El equipo investigador de esta tesis doctoral lleva desarrollando estudios de centro único, multicéntricos y ensayos clínicos en este campo desde hace más de 20 años con un foco especial en la evaluación de la inmunidad adquirida. Esta tesis doctoral corresponde a la búsqueda de posibles biomarcadores de inmunidad innata genéticos, serológicos y de inmunidad celular en este campo con foco en trasplante cardíaco tratando de identificar aquellos con potencial traslacional. Si se detectan en estos estudios de centro único algunos biomarcadores que se asocian a riesgo de infección, entonces en etapas subsiguientes se ha de validar el potencial rol predictivo de los mismos.

Los retos clínicos que permitan mejorar las terapias actuales de inmunosupresión, de evaluar más finamente lo que ha dado en llamarse el estado neto de inmunosupresión, han de mejorar la supervivencia de los órganos trasplantados, la calidad y esperanza de vida de los pacientes, al ser estos los principales desafíos de la Salud Pública en el campo de los trasplantes. Para ello es esencial la investigación prospectiva hospitalaria [Simposio Internacional centrado en los últimos avances en investigación del trasplante de órganos, 25 de octubre de 2019 Madrid, en <https://www.fundacionareces.es/fundacionareces/es/actividades/avances-y-retos-en-investigacion-en-el-trasplante-de-organos.html>].

8.1. MBL

Como se ha comentado anteriormente la deficiencia de MBL, una proteína circulante de la inmunidad innata que se produce en el hígado está relacionada con la aparición de posibles complicaciones en el receptor del órgano, infecciosas y no infecciosas.

Los SNPs en el exón 1 y en la región promotora del gen *MBL2*, caracterizados previamente; originan defectos en la expresión del gen y en la polimerización de la proteína siendo responsables en gran parte de la variabilidad interpersonal observada en la concentración sérica de MBL. La susceptibilidad a la infección por estas alteraciones se ha explorado en pocos estudios de trasplante de órgano

solidos, específicamente en muy pocos trasplantados cardiacos, de allí que haya resultado una de las dianas de esta tesis que se realiza en trasplantados de corazón^{30,180,185,186}.

8.2. *IL1RN*

El papel de la IL-1 en la respuesta inmune innata por sus propiedades que antes se han discutido, se ha pensado que podría estar implicada en los mecanismos fisiopatológicos inflamatorios de las primeras etapas tras el trasplante cardiaco. Hay un creciente interés en el estudio de los polimorfismos de genes que codifican para cada uno de los miembros de la superfamilia de la IL-1, que parecen afectar ya sea por aumento o por defecto, la expresión proteica de estas citoquinas, y de esta manera afectar el fenotipo de distintas enfermedades¹⁸⁷.

La producción de citocina antiinflamatoria, como la *IL1RN*, participa en el tercer nivel de defensa del huésped, después de la primera que es la barrera física y la segunda presentación por el sistema inmunitario innato¹⁸⁸. Su relación con enfermedades inflamatorias crónicas específicas ha sido estudiado en distintos modelos de patología pero no en trasplantados cardiacos, de allí que haya sido la otra diana para investigación genética de la tesis.^{93, 189,190,191}

El alelo 2 del genotipo del antagonista del receptor de IL-1 (*IL1RN VNTR*), un gen asociado con una producción creciente de IL-1beta, se detectó en receptores que desarrollaron rechazos en trasplante renal¹⁹², pacientes con la presencia del genotipo 1/2 *IL1RN* mostró mayor riesgo a episodio de rechazo (RE) y la función retardada del injerto (DGF) también en trasplante renal¹⁹³, también se asoció con la enfermedad renal en etapa terminal (ESRD)¹⁹⁴. La expresión de *IL1RN* por parte de las células madre mesenquimales MSC se ha evaluado en el modelo de fibrosis pulmonar^{195,196}

Sin embargo, como acabamos de decir no se encuentra nada en la literatura al respecto de su posible comportamiento en trasplante cardiaco.

8.3. TLRs

La respuesta inflamatoria produce la liberación de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, se reclutan macrófagos, neutrófilos y células T que como resultado producen una actividad a gran escala. Como lo observado durante las infecciones microbianas. En particular, receptores que median la respuesta a los microorganismos como los receptores TLRs, pueden ser activados por moléculas endógenas (entre ellas los DAMPs) promoviendo la lesión tisular¹⁶⁵ (figura31); puede por ello directa y/o indirectamente afectar la respuesta aloimmune inducida en un trasplante de órgano.

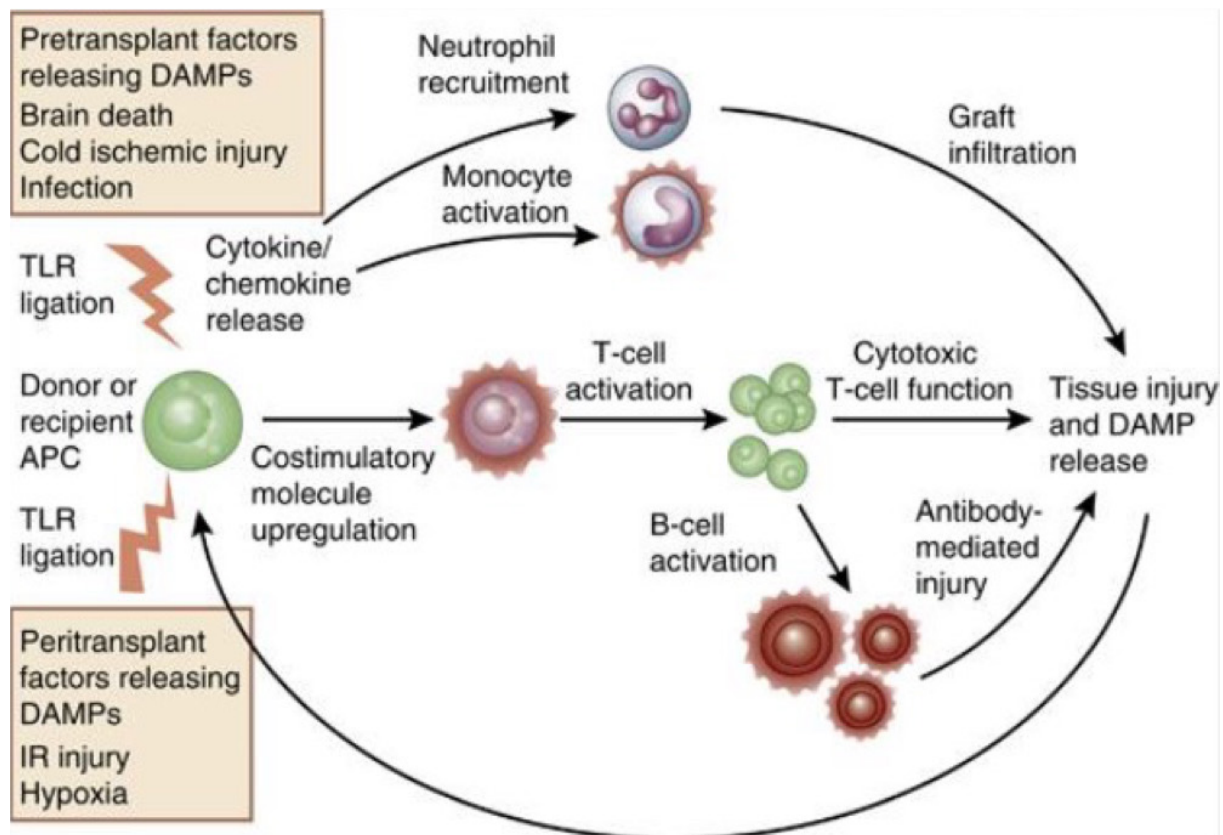


Figura 31. Se describen potenciales vías alioinmunes activadas por TLR. La injuria aguda por stress oxidativo (por muerte cerebral o isquemia) inducen DAMPs que activan TLR expresados sobre células mononucleares, los que producen citoquinas y factores de crecimiento, amplificando la activación de TLR. La generación de DAMP, que pueden interactuar con las células innatas que expresan TLR promueve una lesión crónica. APC, célula presentadora de antígeno; DAMP, patrón molecular asociado al peligro; RI, lesión por isquemia-reperfusión; TLR, receptor tipo Toll. Fuente: Jeremy S. Leventhal and Bernd Schroppel 2012²⁰⁴

Algunos SNPs, ubicados en los genes del TLR, se ha descrito que pueden estar asociados con desarrollo de infecciones por CMV. Bodro et al en 2022 han sugerido que los receptores de riñón e hígado que presentaron el polimorfismo TLR4 rs4986790/rs4986791 se vio mayor frecuencia infección por CMV en comparación con aquellos con tipo salvaje (70% vs 41% y 100% vs 51% respectivamente, $p=0,05$).^{30,197} También se ha documentado un mayor riesgo de infección CMV congénita en fetos y neonatos polacos¹⁹⁷. El genotipo CC en SNP rs3804100 en el gen TLR2 se correlacionó con la infección congénita por CMV en niños¹⁹⁸.

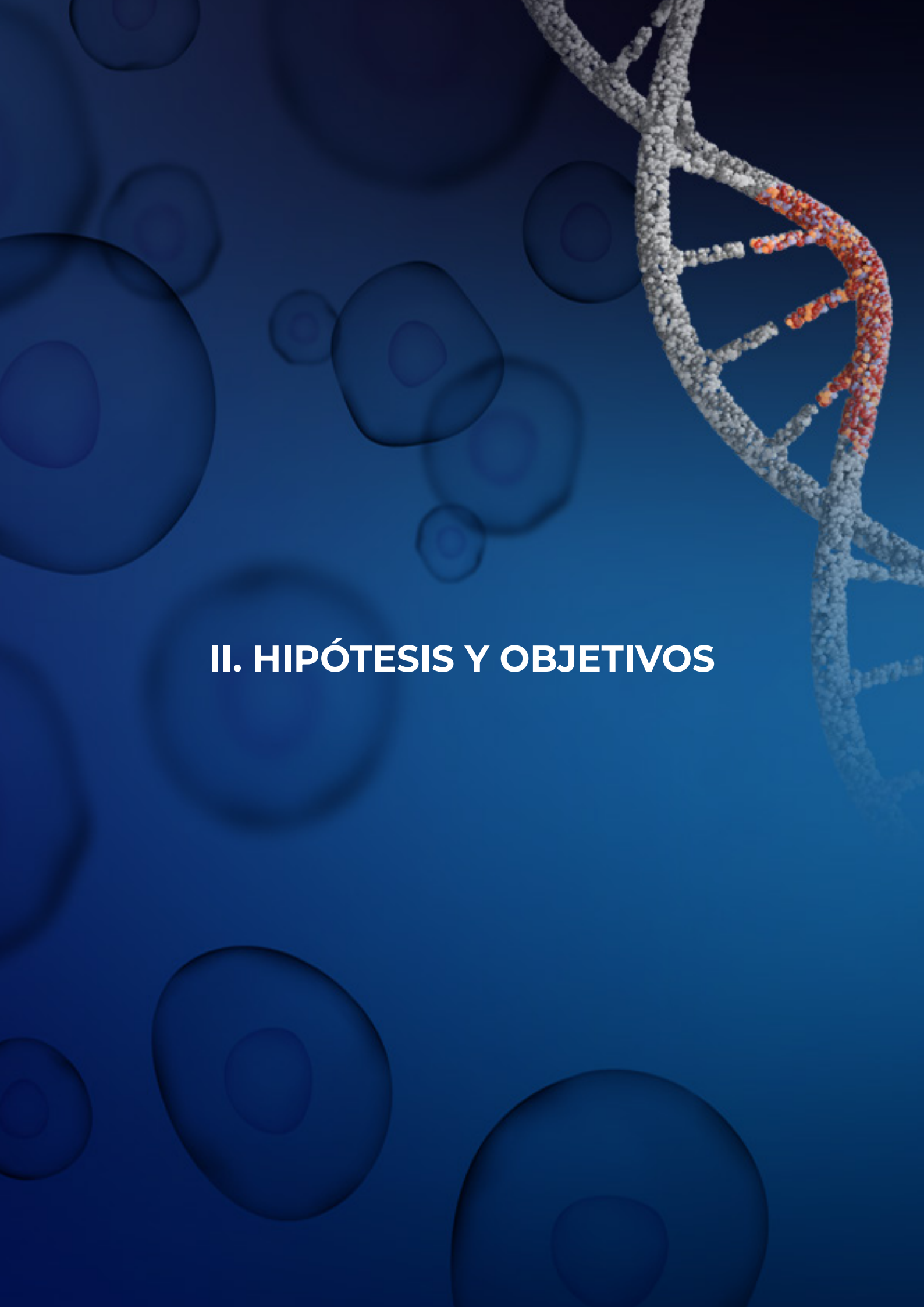
En relación con la posible asociación de alteraciones de TLRs que predispongan a rechazo, por ejemplo rechazo crónico, se han realizado estudios de sus concentraciones en injertos con y sin rechazo en modelo de trasplante murino in vivo¹⁹⁹. Así pues, el polimorfismo Asp299Gly de TLR4 se vio asociado a un menor riesgo de rechazo agudo y una menor tasa de complicaciones ateroscleróticas, así como un mayor riesgo de infecciones bacterianas en trasplante de riñón²⁰⁰ y pulmón²⁰¹. En modelo preclínico

de ratón con deleciones de las proteínas adaptadoras TLR proximales MyD88 o Trif, se ha relacionado con menor rechazo de injerto en trasplante de piel²⁰². Además se ha descrito que determinados polimorfismos en este receptor han sido asociados con la hiporrespuesta a lipopolisacáridos en trasplante de células madres hematopoyéticas.²⁰³

La importancia de los TLR en el trasplante de órgano solido debe ser más estudiada, pues no se conoce la cinética de los mismos, ni sus ligandos durante el proceso complejo de un trasplante. El futuro conocimiento de los mismos permitirá una mejor comprensión de todos los factores asociados a la maduración de las células dendríticas como mediadoras fundamentales del trasplante. Dado su importancia en inmunidad innata, y la poca información generada hasta ahora en trasplantados, conviene hacer una exploración más detallada en el trasplante de órgano sólido.

8.4. Activación de monocitos

La medición de la expresión de HLA-DR podría servir como una herramienta valiosa para discriminar entre pacientes con infecciones bacterianas^{276,122,143,147}, como ya mencionaron trabajos previos la expresión superficial de HLA-DR y CD38 en los monocitos CD14+ refleja el grado en que se han activado estas células^{271,141,142}. De allí el interés por este estudio en el contexto de inmunidad innata, objeto de esta tesis, y su posible implicación en el trasplante cardiaco.

The background of the slide features a dark blue gradient. On the right side, a detailed 3D model of a DNA double helix is shown, with one strand highlighted in orange and red. Scattered across the left and bottom areas are several translucent, light blue cell-like structures, each with a darker blue nucleus, representing biological cells.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

En el trasplante cardiaco se producen alteraciones en la inmunidad innata que incluirían cambios significativos en las concentraciones séricas de MBL, cambios en la cinética post trasplante de expresión de TLRs en diferentes subpoblaciones celulares, y del estado de activación de monocitos, además podrían haber alteraciones genéticas de inmunidad innata (genes de *MBL2* y de *IL1RN*) y fenotípicas que podrían ser factores de riesgo de desarrollo de infecciones y/o de otras complicaciones que acontecen tras el trasplante incluida la muerte.

2. Objetivos

Enfoque general de los objetivos

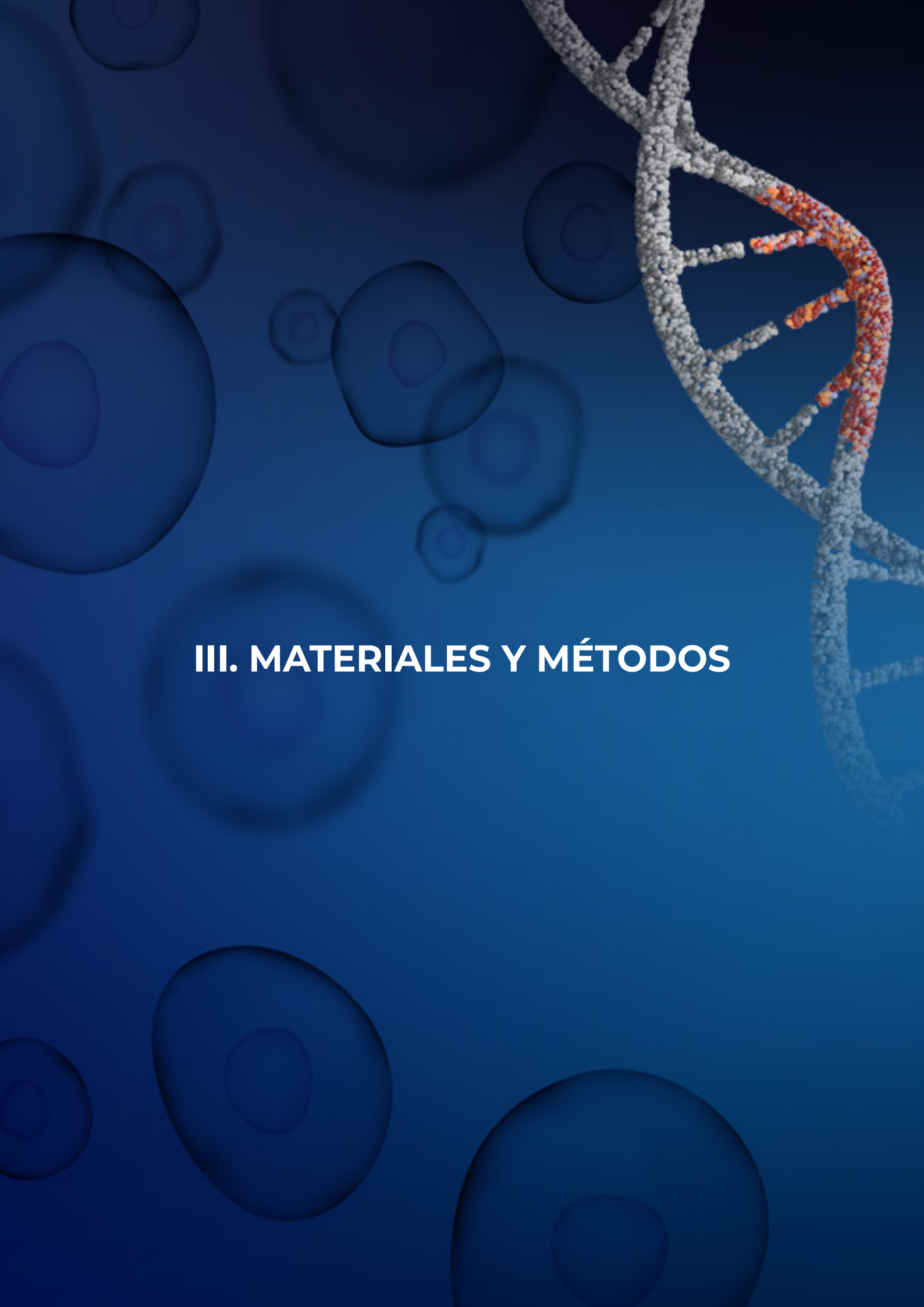
Dentro de la inmunidad innata, diana principal de esta tesis, se han seleccionado dos proteínas cuya misión es actuar de sensores de reconocimiento de microbios ajenos como son la MBL y los TLR2 y TLR4, una soluble y las otras transmembranas respectivamente, y también el estudio del inmunofenotipo activado de monocitos. El objetivo es caracterizar la cinética de estos biomarcadores en distintos tiempos antes y después en el periodo temprano tras el trasplante cardiaco y establecer si sus alteraciones se asocian a riesgo de infecciones. El otro objetivo es realizar un estudio genético de MBL y de otra proteína potencialmente implicada en procesos inflamatorios, un receptor de citocinas como es el IL-1Ra para conocer su distribución y si se asocian con el riesgo de complicaciones. Todo ello se lleva a cabo en trasplante cardiaco dado que no han sido bien investigados desde este punto de vista en estos pacientes.

2.1. Objetivos generales

- Objetivo 1.** Evaluar la cinética en distintos tiempos pre y post trasplante de la MBL sérica y de la expresión de TLRs en distintas subpoblaciones linfocitarias y de la activación de monocitos en trasplante cardiaco y su asociación con el desarrollo de infecciones.
- Objetivo 2.** Evaluar la presencia de distintos genotipos y fenotipos de la MBL y su asociación con el desarrollo de infección en trasplante cardiaco.
- Objetivo 3.** Evaluar la presencia de distintos genotipos del antagonista del receptor de la interleukina 1 y su asociación con riesgo de infección y de otras complicaciones en trasplante cardiaco en su periodo temprano.

2.2. Objetivos específicos

- Objetivo Específico 1.** En un estudio prospectivo realizado antes y después del trasplante cardiaco caracterizaremos la cinética de la concentración sérica de MBL.
- Objetivo específico 2.** En un estudio prospectivo realizado antes y después del trasplante cardiaco caracterizaremos la cinética de expresión de TLR2 y TLR4 humanos en distintas subpoblaciones linfocitarias y de la expresión de marcadores de activación de inmunofenotipo (anti-HLA-DR y anti-CD38) en monocitos periféricos.
- Objetivo específico 3.** En pacientes sometidos a trasplante cardiaco se realizará un estudio transversal del genotipo de MBL y del *IL1RN* para establecer la prevalencia de mutaciones.
- Objetivo específico 4.** Evaluar retrospectivamente si existe asociación entre la concentración sérica de MBL con el desarrollo de complicaciones post trasplante como infección y otras complicaciones.
- Objetivo específico 5.** Evaluar retrospectivamente si existe asociación entre el genotipo de *MBL2* y del *IL1RN* con el desarrollo de complicaciones post trasplante como infección y otras complicaciones.
- Objetivo específico 6.** Evaluar retrospectivamente si existe asociación entre la expresión de alguna subpoblación que exprese TLR2 o TLR4 con desarrollo de muerte.
- Objetivo específico 7.** Evaluar retrospectivamente si existe asociación entre el porcentaje de monocitos que expresan HLA-DR y/o CD38 con el desarrollo de infecciones post trasplante.

The background is a deep blue gradient. On the right side, a DNA double helix is depicted, with one strand in grey and the other in a vibrant orange-red. Scattered across the left and bottom areas are several stylized, semi-transparent blue cells, each with a darker blue nucleus. The overall aesthetic is scientific and modern.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los métodos y técnicas empleadas en esta tesis han sido:

- Genética Molecular
- ELISA
- Citometría

1. Diseño de los estudios

- **Etapas previas.** Identificación de potenciales biomarcadores de inmunidad innata. Ver a lo largo de la introducción. Selección de MBL, *IL1RN* y de fenotipos TLR2 y TLR4 en distintas estirpes celulares y de activación de monocitos. Asignación del tipo de análisis que se haría con cada uno de los componentes según el tamaño muestral previsible y viable (siguiente sección).
- **Viabilidad y financiación.** Los estudios se hicieron con cargo a los proyectos FIS 1101323, FIS 1501472 y con ayudas de los proyectos FIBHGM-FGICCJ-2010, 2021-CTT032, FIBHGM-CTT043-2019 del director de la tesis doctoral hasta terminar el reclutamiento y los periodos de seguimiento.

Los proyectos FIS que dieron sustento a este trabajo tuvieron la aprobación del CEIC del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

- **Programación de los estudios.** Los estudios se han hecho secuencialmente desde que el grupo investigador decidió abordar la evaluación de posibles biomarcadores de inmunidad innata como factores de riesgo en trasplante cardiaco, pero se han solapado a lo largo del tiempo, sobre todo la fase de recogida de datos clínicos que se hace prospectivamente en las historias clínicas y luego se recuperan y actualizan los datos retrospectivamente para sus análisis utilizando la misma como documento fuente. Los estudios inmunológicos de cinética solo pueden ser prospectivos ya que las extracciones de sangre para los mismos se hicieron en tiempos fijos antes y después del trasplante. Por esta razón los tiempos de seguimiento no son iguales en los distintos estudios. Igualmente, el tiempo de seguimiento de los marcadores incluidos en cinética es el que se produce desde la realización de los estudios hasta la última revisión clínica utilizada para la tesis (la última revisión de HCE para datos clínicos se ha hecho en septiembre de 2022). En el caso de los biomarcadores genéticos se han utilizado seguimientos más amplios ya que no son dependientes del tiempo.

Tipos de estudios según objetivos específicos detallados:

Estudio 1

A) Objetivo Específico. Caracterizaremos la cinética de la concentración sérica de MBL.

- Tipo de Estudio: Estudio prospectivo observacional de seguimiento
- Tiempos de estudio. Pre-trasplante, cuando el paciente es incluido en la lista de espera. Post-trasplante en el día 7 y 30 post trasplante.

B) Objetivo específico. Se realizará un estudio del genotipo de *MBL2* para establecer la prevalencia de mutaciones.

- Tipo de estudio: Estudio transversal retrospectivo.
- Tiempos de estudio. Pre-trasplante, cuando el paciente es incluido en la lista de espera. Los pacientes que no se hayan podido genotipar antes del trasplante serán estudiados en los otros puntos de estudio post-trasplante en el día 7, 30 o 90 días post trasplante o en otro tiempo de estudio.

C) Objetivo específico. Evaluar si existe asociación entre la concentración sérica de MBL y del genotipo de *MBL2* con el desarrollo de complicaciones post trasplante como infección y otras complicaciones.

- Tipo de Estudio: Estudio retrospectivo observacional de seguimiento. Revisión de las historias clínicas.
- Tiempos de estudio. Pre-trasplante, cuando el paciente es incluido en la lista de espera. Post-trasplante en el día 7 y 30 post trasplante. Seguimiento clínico hasta redacción final de la tesis doctoral.

Estudio 2

A) Objetivo específico. Se realizará un estudio del genotipo del *IL1RN* para establecer la prevalencia de mutaciones.

- Tipo de estudio: Estudio transversal retrospectivo.
- Tiempos de estudio. Pre-trasplante, cuando el paciente es incluido en la lista de espera. Los pacientes que no se hayan podido genotipar antes del trasplante serán estudiados en los otros puntos de estudio post-trasplante en el día 7, 30 o 90 días post trasplante o en otro tiempo de estudio.

B) Objetivo específico. Evaluar si existe asociación entre el genotipo de *IL1RN* con el desarrollo de complicaciones post trasplante como infección y otras complicaciones.

- Tipo de Estudio: Estudio retrospectivo observacional de seguimiento. Revisión de las historias clínicas.
- Tiempos de estudio. Seguimiento clínico hasta redacción final de la tesis doctoral.

Estudio 3

A) Objetivo específico. Caracterizaremos la cinética de expresión de TLR2 y TLR4 humanos en distintas subpoblaciones linfocitarias.

- Tipo de Estudio: Estudio prospectivo observacional de seguimiento.
- Tiempos de estudio. Pre-trasplante, cuando el paciente es incluido en la lista de espera. Post-trasplante en el día 7, 30 y 90 días post trasplante.

B) Objetivos específicos. Evaluar si existe asociación entre las MFI de TLR2 y TLR4 en distintas subpoblaciones y tiempos estudiados con el desarrollo de complicaciones post trasplante como infección y otras complicaciones.

- Tipo de Estudio: Estudio retrospectivo observacional de seguimiento. Revisión de las historias clínicas.
- Tiempos de estudio. Pre-trasplante, cuando el paciente es incluido en la lista de espera. Post-trasplante en el día 7 y 30 post trasplante. Seguimiento clínico hasta redacción de la tesis doctoral.

Estudio 4

A) Objetivo específico. Caracterizaremos la cinética de subpoblaciones activadas de monocitos caracterizadas de la siguiente manera: CD14+DR+, CD14+CD38+DR+.

- Tipo de Estudio: Estudio prospectivo observacional de seguimiento.
- Tiempos de estudio. Pre-trasplante, cuando el paciente es incluido en la lista de espera. Post-trasplante en el día 7, 30 y 90 días post trasplante.

B) Objetivos específicos. Evaluar si existe asociación entre las subpoblaciones de monocitos activadas con el desarrollo de complicaciones post trasplante como infección y otras complicaciones.

- Tipo de Estudio: Estudio retrospectivo observacional de seguimiento. Revisión de las historias clínicas.
- Tiempos de estudio. Pre-trasplante, cuando el paciente es incluido en la lista de espera. Post-trasplante en el día 7 y 30 post trasplante. Seguimiento clínico hasta redacción de la tesis doctoral.

En general para todos los estudios:

- Seguimiento clínico durante los primeros 12 meses post trasplante para registrar el desarrollo de complicaciones como infección y otras complicaciones. Para variable muerte en los casos indicados se ha utilizado todo el tiempo disponible de seguimiento desde el trasplante hasta el día de evento muerte a menos que se especifique mortalidad en periodos determinados.
- Seguimiento clínico para análisis: Tanto Las variables clínicas como de laboratorio se recogieron en cuestionarios previamente diseñados por el equipo investigador. Las visitas de seguimiento fueron según lo establecido por los protocolos establecidos en los Servicios participantes sin esquema fijo de visitas.

EVENTO INFECCIOSO

Definido como evento infeccioso aquel ocurrido durante los primeros 12 meses post-TC, en los que se administró tratamiento antimicrobiano específico por vía intravenosa. Se excluyeron infecciones asociadas a catéter e infecciones de herida quirúrgica superficial.

Se consideró infección CMV a la evidencia de infección (carga viral CMV) y que requirió tratamiento antiviral. La infección CMV asintomática no fue evento en esta tesis.

2. Pacientes

En esta tesis doctoral se evaluaron pacientes adultos incluidos en lista de espera para trasplante cardiaco y que fueron sometidos posteriormente a esta intervención.

Los criterios de inclusión fueron los mismos para todos los estudios:

- A. Pacientes adultos (>18 años) incluidos en lista de espera para trasplante cardiaco y sometidos a trasplante posteriormente.
- B. Consentimiento informado para participar en los estudios.

Los criterios de exclusión fueron los mismos para todos los estudios:

- A. Pacientes con inmunodeficiencia primaria significativa conocida pre-trasplante (por ejemplo, agammaglobulinemia de Bruton, inmunodeficiencia variable común, etc).
- B. Pacientes con enfermedad autoinmune sistémica en tratamiento inmunosupresor.
- C. Pacientes con infección por VIH.

3. Metodología del estudio de las variantes alélicas de los genes *MBL2* e *IL1RN*

El estudio de las variantes alélicas de los genes *MBL2* e *IL1RN* se hizo mediante extracción del DNA genómico de los pacientes y amplificación de las secuencias de interés mediante PCR (Polymerase Chain Reaction, o Reacción en Cadena de la Polimerasa), que permite amplificar exponencialmente el material genético deseado con los primers específicamente diseñados para ello. Todos los estudios genéticos se llevaron a cabo en el laboratorio de Inmunogenética Molecular del Servicio de Inmunología del HGUGM Grupo de Inmunología del Trasplante (Area 5 del IISGM). Las metodologías se describen a continuación.

3.1. Extracción de DNA genómico

La purificación del DNA genómico de los pacientes se hizo a partir de muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA y conservadas en frío hasta el momento de la purificación. Para ello se utilizó el Kit de Extracción de DNA de sangre total QIAmp de QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). A partir de las muestras de DNA genómico, se amplificaron específicamente las secuencias de *MBL2* y de *IL1RN* para su genotipado según se describe a continuación.

3.2. Genotipado de *MBL2*

El genotipado de *MBL2* se realizó utilizando la técnica de tipado previamente descrita por Lozano et al 2005²⁰⁷. Se amplificó en primer lugar un fragmento de 969 pb que abarca desde el promotor hasta el final del exón 1 del gen *MBL2* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A continuación, el fragmento amplificado debe ser purificado y secuenciado para identificar las variantes polimórficas (SNPs).

3.2.1. Amplificación mediante PCR de *MBL2*

La PCR se realizó en tubos con un volumen final de 50 microlitros conteniendo: 25 µl Fast Start mix (Roche Diagnostics, Mannheim), Primers (5 µM) 4µL, Agua destilada 12µL, DNA 5 µl; La amplificación se realizó en un termociclador AB Applied Biosystems, Veriti 96 well Thermal Cycler, bajo las siguientes condiciones de termociclación: 94°C 5'; 94°C 45'' 68°C 45'' 72°C 45'' en 10 ciclos; 94°C 45'' 58°C 45'' 72°C 45'' en 25 ciclos; 72°C 7' y mantenimiento a 4°C. Utilizando los cebadores sentidos 5'-GGGGAATTCCTGCCAGAAAGT-3' y antisentido 5'-CATATCCCCAGGCAGTTTCCTC-3'. Los SNPs en los codones 52, 54 y 57 (denominados variantes D, B y C, respectivamente) del exón 1 del gen *MBL2* son determinantes principales de las concentraciones séricas de MBL. Estas variantes estructurales se denominan colectivamente 0, mientras que A indica la variante WT. Tres SNPs adicionales en las posiciones -551 (H/L), -221 (X/Y) y +4 (P/Q) en la región flanqueante 5' del gen *MBL2* también influyen

en las concentraciones séricas de MBL en individuos con la variante WT, los genotipos 0/0, 0/XA, A/0 y XA/XA se clasificaron como variantes bajas en MBL, mientras que A/A y XA/A eran variantes con suficiente MBL.

PCR: Esquema de cantidades y orden de adición

REACTIVO	CANTIDAD (50 µl)
Fast Start (ROCHE)	25 µl
Primers (a 5 uM)	4µl (X2)
Agua destilada	12µl
DNA	5 µl

1. 12 µl_agua

2. 5 µl_DNA

3. 4 µl primers

4. 25 µl taq

MUESTRA

1. 12 µl_agua

2. 5 µl_agua

3. 4 µl primers

4. 25 µl_taq

CONTROL

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Agarosa MS-8), utilizando como buffer TAE, y como marcadores de peso molecular el marcador 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™10488058). Los geles de agarosa se prepararon al 1% y se tiñeron con Realsafe Nucleic acid, gel staining solution (20.000X), según instrucciones del fabricante. Los geles se migraron en cubetas BIO-RAD a 70 voltios, y las bandas se visualizaron con una lampara de luz UV GE Healthcare Image Quant 100.

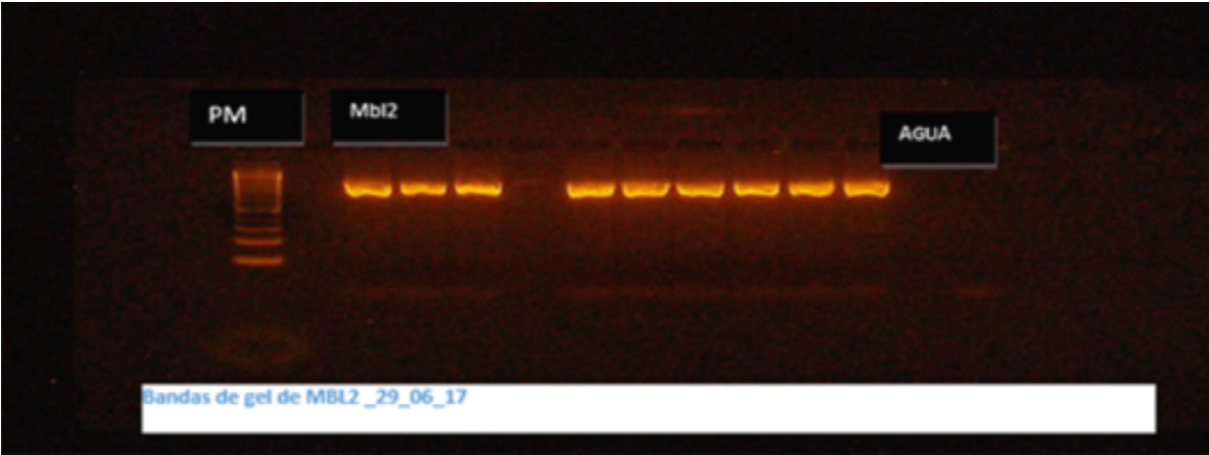


Figura 31: Visualización con luz UV de un gel de electroforesis, obtenido en el laboratorio, del fragmento de 969 pb abarcando desde el promotor hasta el final del exón 1 del *MBL2*. Se muestra el pocillo de peso molecular, las muestras y el control de agua (donde no se añade ADN al tubo).

Los productos de la amplificación se purificaron usando el kit de Roche High Pure PCR Product Purification, antes de su secuenciación, y según el protocolo que se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7. Procedimiento recomendado en la purificación del kit Roche

1. Ajustar el volumen total para cada tubo de PCR a 100µl con el reactivo Buffer Elution (~60µl)
2. A un tubo ¹ con 500 µl de Binding Buffer añadimos el producto PCR ajustado a 100µl. Agitar esta mezcla en el vórtex
3. Insertar el filtro en un tubo recolector proporcionado por el kit
4. Pipetear la muestra sobre el filtro
5. Centrifugar en microcentrífuga a 13.300 r.p.m. (17.000g) de 30-60 segundos (T 15-25°C)
6. Descartar el eluido del tubo y recolocar el filtro sobre el mismo tubo recolector
7. Añadir 500µl de Wash Buffer ² al filtro
8. Centrifugar a 13.300 r.p.m. durante 1 minuto
9. Descartar el eluido del tubo y recolocar el filtro sobre el mismo tubo recolector
10. Añadir 200µl de Wash Buffer
11. Centrifugar a 13.300 r.p.m. durante 1 minuto
12. Descartar el eluido y el tubo recolector
13. Transferir el filtro a un tubo ¹ debidamente identificado y cortar las tapas para que no se desprendan en el posterior proceso
14. Añadir 30µl de Buffer Elution
15. Centrifugar a 13.300 r.p.m. durante 1min
16. Tiramos el filtro y conservamos el eluido para posterior medida de concentración y pureza de ADN mediante medida de absorbancia en el espectrofotómetro.

¹Tubo para microcentrífuga de 1,7 ml no proporcionado con el kit

²Antes de usar añadir 40 ml de etanol absoluto, indicando en el mismo recipiente la fecha en la que se ha diluido

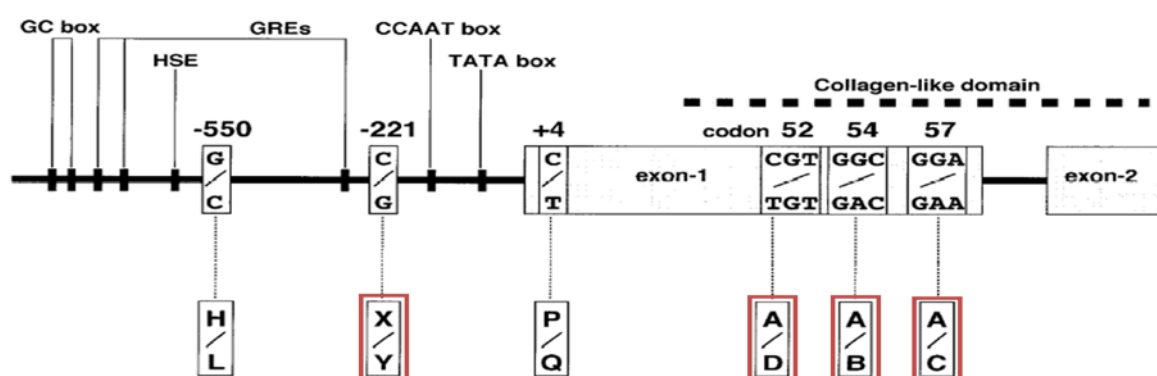
Por último, se procede a medir la concentración final del producto purificado. La cuantificación se realiza mediante espectrofotometría a 260 nm. Puesto que la contaminación del DNA molde con RNA o proteínas pueden afectar negativamente a los resultados de la secuenciación, hay que medir también la absorbancia de la muestra a 280 y comprobar la ratio A260/A280, medida pureza con el espectrofotómetro NanoDrop. El ADN molde debe tener una ratio entre A260/A280 nm de 1.8-2.0.

3.2.2. Secuenciación del fragmento de *MBL2*

La Secuenciación Sanger, se lleva a cabo en el servicio ofrecido por SAI-Unidad de Genómica del Instituto Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. La secuenciación automática del DNA se realiza mediante electroforesis capilar y con el uso de la química BigDye Terminator v3.1 de Applied Biosystems. Se secuenciaron ambas cadenas DNA, utilizando los mismos cebadores utilizados en la amplificación de cada producto PCR.

3.2.3. Interpretación de los resultados de secuenciación y asignación de genotipos

Se realiza la visualización de los ficheros e interpretación de los cromatogramas con el programa Chromas 2.6.6. En el siguiente esquema (figura 32), cuya autoría es Francisco Lozano se indican los SNPs mencionados, para ello se saca la secuencia adyacente correspondiente a través de la secuencia del gen *MBL2* (anexo 1). Se averiguan los haplotipos: HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, HYPD, LYPB, LYQC y consiguiente genotipo de cada paciente. Con la secuenciación se obtienen 2 archivos Forward y Reverse.



GENOTYPES (6):

High

(>1000ng/ml)
A/A
XA/A

Intermediate

(1000-250ng/ml)
A/O
XA/XA

Low

(<250ng/ml)
O/O
O/XA

Figura 32. Detalle SNPs mencionados anteriormente para los polimorfismos de *MBL2*.

Lectura de la región del promotor del gen:

Se procede a la búsqueda de las secuencias de nucleótidos de las tres posiciones que contienen a los SNPs, el polimorfismo H/L (-550), el polimorfismo X/Y (-221) y el polimorfismo P/Q (+4); para lo cual se busca en la dbSNP que es parte de la red de bases de datos de NCBI y se ingresa el rs del SNP correspondiente dbSNP,,<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs7095891>

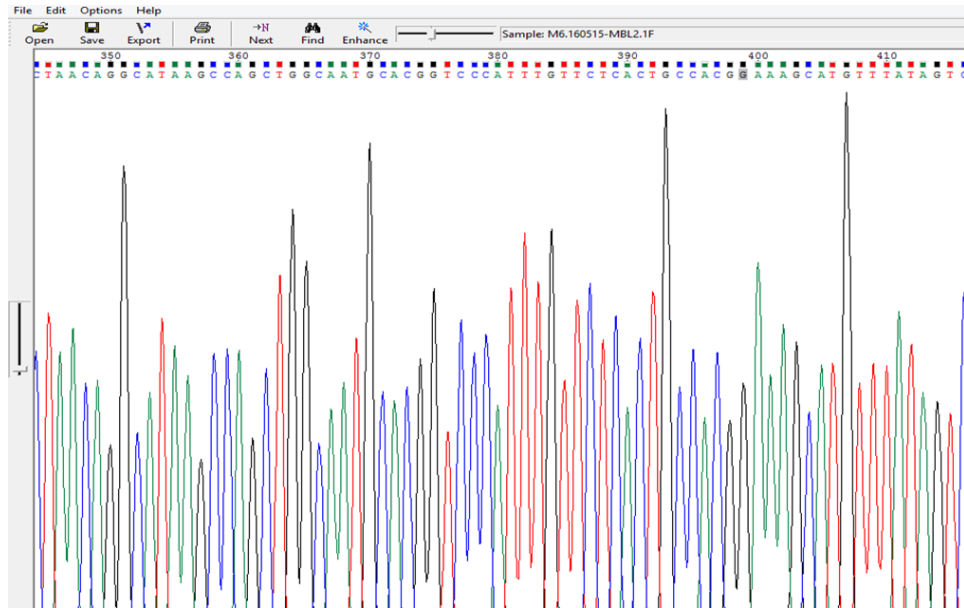


Figura 33. Cromatograma del visor Chromas en el cual cada base nitrogenada corresponde con un color (obtenido de una muestra de laboratorio).

Lectura de los codones del gen:

A través del programa CHROMAS se accede a BLAST, un programa informático de alineamiento de secuencias que es capaz de comparar la secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos, para así obtener la zona codificante. Se buscan los tripletes de los codones 52, 54 y 57 (figura 34).

 U.S. National Library of Medicine

 National Center for Biotechnology Information

BLAST® » **blastn suite**

Format Request

Query 2.160321-MBL2.1F (740 letters)

Database nr

Job title 2.160321-MBL2.1F (740 letters)

Request ID ☐ Show results in a new window

Format

Show	Alignment ▾	as	HTML ▾	☐ Old View	Reset form to defaults	
Alignment View	Pairwise ▾					
Display	☒ Graphical Overview ☒ NCBI-gi ☒ CDS feature					
Masking	Character:	Lower Case ▾	Color:	Grey ▾		
Limit results	Descriptions:	100 ▾	Graphical overview:	100 ▾	Line length:	60 ▾
	Organism Type common name, binomial, taxid, or group name. Only 20 top taxa will be shown.					
	Homo sapiens (taxid:9606)				☐ Exclude +	
	Entrez query:					
	Expect Min:		Expect Max:			
	Percent Identity Min:		Percent Identity Max:			

Figura 34. Foto pantalla para la selección de las características de obtención secuencias de la zona codificante y consiguiente localización de los 3 codones descritos.

Download v GenBank Graphics

Homo sapiens chromosome 10 mannose-binding protein gene, complete cds

Sequence ID: [gi|103603022|AH006353.2](#) Length: 5588 Number of Matches: 1

Range 1: 203 to 912 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1263 bits(1400)	0.0	709/712(99%)	2/712(0%)	Plus/Plus	
Query	3	AGCTCMAGGGCCTGCCAATGAGTAAATGATAGTTAACAGGTCCTGGAGGGGAATCAGCT		62	
Sbjct	203	AGCTC-AGGGCCTGCC-AATGAGTAAATGATAGTTAACAGGTCCTGGAGGGGAATCAGCT		260	
Query	63	GCCCAGATACAAAGATGGGATTTCAGGTGGCAGATGGACCCGAAGAGGACATGGAGAGAAA		122	
Sbjct	261	GCCCAGATACAAAGATGGGATTTCAGGTGGCAGATGGACCCGAAGAGGACATGGAGAGAAA		320	
Query	123	GAGGAAGCTCCTACAGACACCTGGGTTTCCACTCATTCTCATTCCCTAAGCTAACAGGCA		182	
Sbjct	321	GAGGAAGCTCCTACAGACACCTGGGTTTCCACTCATTCTCATTCCCTAAGCTAACAGGCA		380	
Query	183	TAAGCCAGCTGGCAATGCACGGTCCCATTGTTCCTCACTGCCACGGAAGCATGTTTATA		242	
Sbjct	381	TAAGCCAGCTGGCAATGCACGGTCCCATTGTTCCTCACTGCCACGGAAGCATGTTTATA		440	
Query	243	GTCTTCCAGCAGCAACGCCAGGTGTCTAGGCACAGATGAACCCCTCCTTAGGATCCCCAC		302	
Sbjct	441	GTCTTCCAGCAGCAACGCCAGGTGTCTAGGCACAGATGAACCCCTCCTTAGGATCCCCAC		500	
Query	303	TGCTCATCATAGTGCCTACCTTTGTTAAAGTACTAGTCACGCAGTGTACAAAGGAATGTT		362	
Sbjct	501	TGCTCATCATAGTGCCTACCTTTGTTAAAGTACTAGTCACGCAGTGTACAAAGGAATGTT		560	
Query	363	TACTTTTCCAAATCCCAGCTAGAGGCCAGGGATGGGTCATCTATTCTATATAGCCTGC		422	
Sbjct	561	TACTTTTCCAAATCCCAGCTAGAGGCCAGGGATGGGTCATCTATTCTATATAGCCTGC		620	
Query	423	ACCCAGATTGTAGGACAGAGGGCATGCTCGGTAAATATGTGTTTCATTAAGTGAATTAAC		482	
Sbjct	621	ACCCAGATTGTAGGACAGAGGGCATGCTCGGTAAATATGTGTTTCATTAAGTGAATTAAC		680	
CDS: Putative 1	1			M S L F P S L P L	
Query	483	CTTCCCTGA	Empieza la lectura, codón 1	ACCATGTCCCTGTTTCCATCACTCCCTCT	542
Sbjct	681	CTTCCCTGA		ACCATGTCCCTGTTTCCATCACTCCCTCT	740
CDS:mannose-binding	1			M S L F P S L P L	
CDS: Putative 1	10	L L L S M V A A S Y S E T V T C E D A Q			
Query	543	CCTTCTCCTGAGTATGGTGGCAGCGTCTTACTCAGAACTGTGACCTGTGAGGATGCCCA			602
Sbjct	741	CCTTCTCCTGAGTATGGTGGCAGCGTCTTACTCAGAACTGTGACCTGTGAGGATGCCCA			800
CDS:mannose-binding	10	L L L S M V A A S Y S E T V T C E D A Q			
CDS: Putative 1	30	K T C P A V I A C S S P G I N G F P G K			

Figura 35. Foto pantalla de las secuencias de la zona codificante y consiguiente localización de los 3 codones descritos (obtenido de una muestra de laboratorio).

3.3. Genotipado de *IL1RN*

En el caso del gen *IL1RN* se estudió un polimorfismo consistente en un número variable de repeticiones en tándem (VNTR) de 86 pb en el intrón 2 del gen. Los alelos se identifican como alelo 1 (410 pb) con 4 repeticiones de la secuencia de 86 pb, el alelo 2 (240 pb) 2 repeticiones, el alelo 3 (500 pb) 5 repeticiones, el alelo 4 (325 pb) 3 repeticiones y el alelo 5 (595 pb) 6 repeticiones.

El polimorfismo del gen *IL-1RN* en la región del segundo intrón, que contiene VNTR fue amplificado por PCR. Se utilizaron como primers los oligonucleótidos 5' CTCAGCAACACTCCTAT 3' y 5' TCCTGGTCTGCAGGTAA 3', flanqueando esta región^{209, 210, 211}, y FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se llevó a cabo según el protocolo de análisis molecular *MBL2*.

Los productos de PCR de 410 pb (alelo 1), 240 pb (alelo 2), 500 pb (alelo 3), 325 pb (alelo 4) y 595 pb (alelo 5) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Realsafe Nucleic acid, gel staining solution, (20.000X).

Los genotipos se clasificaron¹⁰⁶:

AA/410 pb	alelos 1/1	VARIANTE HOMOCIGOTO NORMAL
BB/240 pb	alelos 2/2	VARIANTE HOMOCIGOTO MUTANTE
AB/410 pb, 240pb	alelos 1/2	VARIANTE HETEROCIGOTO
CC /500 pb	alelos 3/3	VARIANTES HOMOCIGOTOS NORMALES, PREDOMINANCIA RARA
DD/325 pb	alelos 4/4	
EE/595 pb	alelos 5/5	

El alelo 1 es el más común, el alelo 2 está asociado con inflamación prolongada y los alelos 3,4,5 son raros¹⁰⁷, con frecuencias de los alelos 1 y 2 superiores al 96%^{209,102}

La frecuencia de los alelos individuales varía entre diferentes poblaciones étnicas o geográficas, pero el alelo 1 (*IL1RN**1), que contiene 4 repeticiones, siempre es más común que el alelo 2 (*IL1RN**2), que contiene 2 repeticiones. Los alelos restantes, que representan 3, 5 y 6 repeticiones, ocurren en el 1% de la mayoría de las poblaciones. En todas las poblaciones estudiadas hasta la fecha, la mayoría de las personas son homocigotas *IL1RN**1 o heterocigotas *IL1RN**1/*IL1RN**2. La prevalencia de homocigotos *IL1RN**2 es típicamente del 10%. En negros africanos y afroamericanos, la frecuencia de homocigotos *IL1RN**2 es considerablemente menor que en la población blanca^{212, 213}.



Figura 36. Visualización con luz UV de un gel de agarosa (obtenido en el laboratorio), en estas muestras salen bandas del alelo 1 en el intrón 2 del gen *IL1RN** (wild type); el número variable de repeticiones en tándem (VNTR).

Para analizar la concentración serica de MBL como posible biomarcador de riesgo de infección en trasplante cardiaco se hizo una búsqueda de ELISAs comerciales disponibles, se detalla a continuación el seleccionado.

4. Estudio del análisis en suero de MBL

El análisis consiste en un ELISA comercial (MBL Oligomer ELISA Kit, BioPorto®Diagnostics (Kit 029), Hellerup, Dinamarca) para la determinación de concentraciones séricas de MBL. El ELISA cuantitativo tipo Sandwich, seleccionado para este estudio detecta preferentemente oligómeros MBL de orden alto en oposición a oligómeros de orden bajo o subunidades individuales no funcionales (confirmado por la casa comercial de BIOPORTO en Dinamarca) y una exhaustiva búsqueda bibliográfica como ejemplo (anexo 3). Estos datos sugieren que el estado oligomérico de MBL es crucial tanto para las propiedades de unión como para la función efectora de MBL. Aunque MBL puede formar varias formas oligoméricas, hay indicios de que los dímeros y trímeros no son biológicamente activos y al menos se necesita una forma de tetrámero para la activación del complemento siendo tetrámeros a hexámeros las formas efectivas²⁰⁸, como ya se anotó en apartado correspondiente de estructura de la proteína. El ensayo es un ELISA realizado en micropocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal contra el dominio de unión a carbohidratos MBL. La MBL unida se detecta con el mismo anticuerpo que se ha marcado con biotina, seguido del revelado con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) e incubación con un sustrato cromogénico. La comparación de los resultados del ensayo con la cromatografía de tamaño molecular de la inmunorreactividad de MBL en muestras de suero humano individuales sugiere que el anticuerpo monoclonal usado es selectivo para oligómeros de MBL cuando se usa como anticuerpo de captura y detección. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del proveedor (MANUAL DEL KIT).



Figura 37. Foto tomada por mi compañera Sandra Garcia, mientras yo procesaba una de las placas ELISA de MBL.

Protocolo ELISA MBL

A continuación, tabla 8, se detallan las instrucciones modificadas del Kit ELISA de oligómeros MBL de Bioporto Diagnostics (KIT 029), con figuras adjuntas del propio manual.

Tabla 8. Procedimiento recomendado del ELISA de MBL

1.	Hacer diluciones de las muestras en tubo (1:100), tomar 5 µl de suero + 495 µl de diluyente.	
2.	Se añade 100 µl de cada calibrador, control y muestra diluida (1:100), incubar 60 min a t° ambiente en una plataforma de agitación fijada a 200 rpm.	
3.	Lavados de la placa con wash buffer (250-350 µl) –X3	
4.	Se añade a cada pocillo de prueba un anticuerpo de detección monoclonal biotinilado y se incuba. El anticuerpo de detección se une a los oligómeros de MBL fijados a través de los dominios de fijación de hidratos de carbono que no estén ocupados por estar unidos al recubrimiento. El anticuerpo de detección no fijado se elimina mediante lavado. Añada 100 µL, incubar 60 min a t° ambiente en una plataforma de agitación fijada a 200 rpm.	
5.	Lavados de la placa con wash buffer (250-350 µl) –X3	
6.	Se añade a cada pocillo de prueba estreptavidina conjugada con HRP y se deja que forme un complejo con el anticuerpo biotinilado fijado. El conjugado no fijado se elimina mediante lavado. Añada 100 µl, incubar 60 min a t° ambiente en una plataforma de agitación fijada a 200 rpm.	
7.	Lavar placa con wash buffer-X3	
8.	Se añade a cada pocillo de prueba un sustrato cromógeno de la peroxidasa que contiene tetrametilbenzidina (TMB). La estreptavidina-HRP fijada reacciona con el sustrato para dar lugar a un producto coloreado.	
9.	La intensidad de color (densidad óptica) es función de la concentración de las formas oligoméricas de MBL añadida inicialmente a cada pocillo. Agregar 100 µl de sustrato TMB , incubar 15 min a t° ambiente, <u>en oscuridad</u> .	
10.	Parada con 100µl de reactivo.	
11.	Medición de la densidad óptica en un espectrofotómetro a 450nm (referencia longitud de onda 630nm) en un lector de microplacas Labtech LT-4000 Plate Reader, <u>antes de la media hora</u> .	

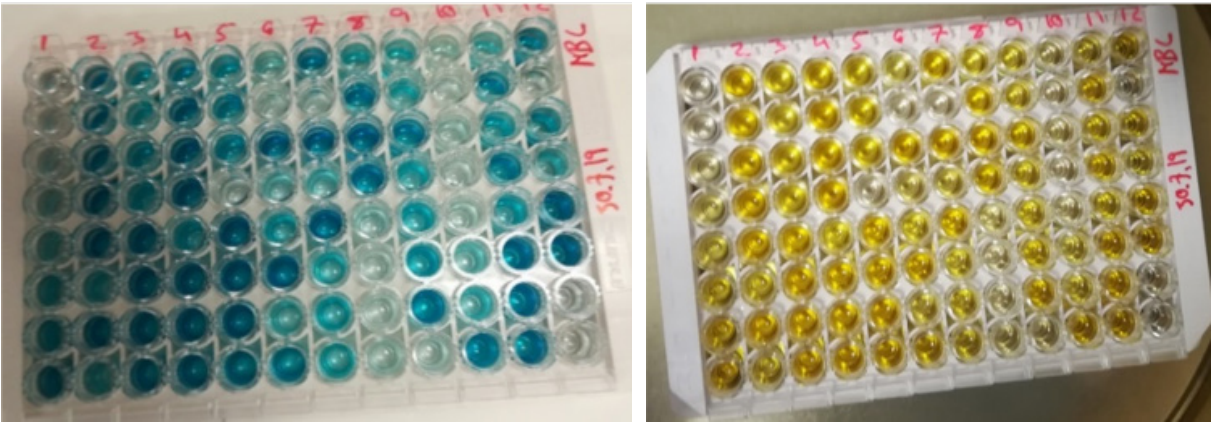


Figura 38. Foto de dos placas MBL que se obtuvo en el laboratorio del día 30/07/2019, color azul con el sustrato cromogénico tetrametilbencidina TMB, color amarillo con la solución stop de ácido sulfúrico.

Assay Protocol Name:	MBL												
Instrument:	Labtech LT-4000 Plate Reader												
Readings:	Endpoint: 450nm [12x8]												
Well Types:	 Unknown	 Blank	 Standard	 Spike	 Pos Control	 Neg Control							
Plate:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A												
	B												
	C												
	D												
	E												
	F												
	G												
H													

Figura 39. Se muestra la foto de un ejemplo de placa MBL procesada en el laboratorio, analizada por el software Manta del lector de placas Labtech, anteriormente mencionado, donde se analizaron por duplicado los 8 calibradores, y parte de las muestras, así como los dos controles, positivo y negativo.

Cálculo de resultados

La curva de calibración se construye con concentración (eje X) frente a densidad óptica (eje Y), mediante el ajuste satisfactorio se calcula la curva por el método logístico de 4 parámetros (figura 40) con el software Manta del citado espectrofotómetro, para obtener concentraciones séricas de proteína. Se determinó el CV entre las diferentes muestras duplicadas, considerándose adecuados CV inferiores al 20% (en las determinaciones llevadas a cabo fue inferior al 10%).

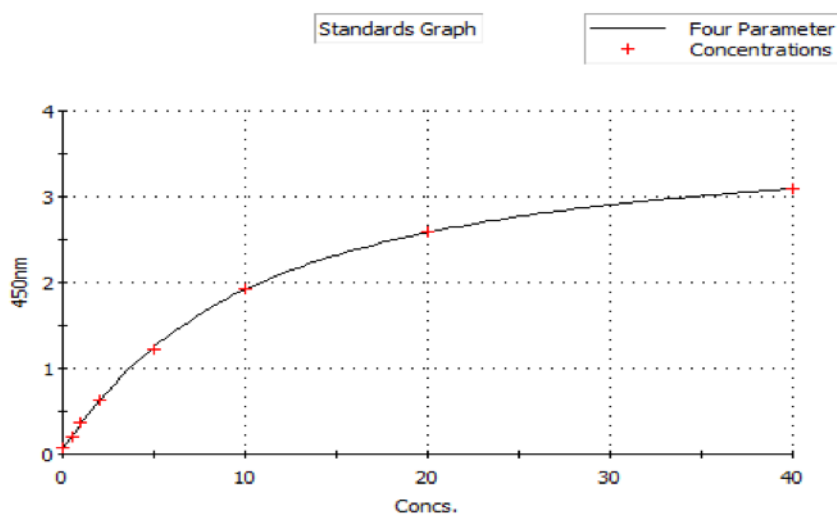


Figura 40. Se muestra la foto del ajuste escogido para las concentraciones de MBL.

5. Material y método del estudio de TLRs /activación monocítica

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación del Edificio Experimental del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Grupo de Inmunología del Trasplante (Area 5 del IISGM).

Las muestras de sangre periférica (SP) son un material muy accesible para la investigación de biomarcadores en receptores de trasplantes, y la búsqueda de biomarcadores no invasivos en SP ha sido durante mucho tiempo el foco principal de varios grupos en el campo de los trasplantes^{205,206}.

En este estudio de la tesis, hemos evaluado la expresión de TLR2 y TLR4 en diferentes subpoblaciones linfocitarias, además de frente a monocitos, a partir de los cuales discriminamos CD. También se evaluó la expresión de HLA-DR/CD38 en monocitos periféricos en el momento de la evaluación previa al trasplante y el día 7, 30 y 90 después del trasplante con análisis de citometría de flujo.

5.1. Material de citometría de flujo

- Solución lisante FACS (BD Biosciences), solución de lavado FACSflow (BD Immunocytometry Systems).

Los anticuerpos monoclonales usados en este estudio se obtuvieron comercialmente de Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EE. UU. (CD11c conjugado con alofococianina (APC) (clon B-ly6), cadena anti-receptor de IL-3 conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (CD123; clon 7G3), ficoeritrina (PE) conjugado anti-HLA-DR clon L243) y peridina clorofila proteína (PerCP) conjugado linaje cóctel (Lin -)) y RD Systems (carboxifluoresceína (CFS)-conjugado anti-TLR2 clon # 203325 y clon anti-TLR4 conjugado con ficoeritrina (PE) #285219). Los anticuerpos monoclonales (mAb) contenía Lin-: CD3 (células T; clon SK7), CD14 (monocitos/macrófagos; clon MoP9), CD16 (células asesinas naturales; clon 3G8), CD19 (células B; clon SJ25C1), y CD56 (células asesinas naturales, clon NCAM16.2) adquiridas por Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EE. UU, como el anti-HLA-DR conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, clon L243) y el anti-HLA-DR conjugado con ficoeritrina (PE) conjugado anti-CD38, clon HIT2).

- Adquisición de las muestras

Se usó un citómetro de flujo activado por fluorescencia, Gallios fluorescence-activated cell sorter (Gallios Beckman Coulter, CA USA) equipado con un programa de software Kaluza 1.5. Citómetro de flujo de 10 colores, 12 parámetros y tres láseres:

- Láser Azul (488 nm, 22 mW): 5 fotomultiplicadores, capaz de medir también los parámetros dispersión de luz lateral (SSC) y frontal (FSC).
- Láser Rojo (638 nm, 25 mW): 3 fotomultiplicadores
- Láser Violeta (405 nm, 40 mW): 2 fotomultiplicadores.

Los archivos obtenidos tras la adquisición (archivos LMD) se analizaron mediante el programa de análisis: Kaluza Flow Cytometry Analysis Software (Beckman Coulter).

5.2. Método del estudio

Protocolo

A partir de la extracción de sangre periférica efectuada antes del trasplante cardíaco y post trasplante a los 7, 30 y 90 días, coincidiendo con las visitas programadas para el procedimiento de biopsia endomiocárdica.

Marcaje celular

El marcaje celular de los TLRs en las distintas subpoblaciones celulares se hizo de la siguiente manera:

- 100 µl de sangre total con EDTA, se añaden 21 µl del cóctel de anticuerpos monoclonales preparado según la tabla 9 (*200 µl con recuento bajo de linfocitos*)
- Se incuba la mezcla en oscuridad 15 minutos
- Se añaden 2 ml de solución de lisis
- Se incuba en oscuridad 10 minutos
- Se centrifuga a 1600 rpm 5 minutos
- Se añade 2 ml de PBS
- Se centrifuga a 1600 rpm 5 minutos
- Se repite el lavado
- Se añade 200µl de PBS para tener el volumen y concentración adecuados para pasar por el citómetro

Tabla 9. Caracterización inmunofenotípica de los pacientes de trasplante cardíaco.

Subpoblación de estudio	FITC	PE	PerCP 5ul	APC	CFS
Monocitos	HLA-DR	TLR4 CD38			TLR2
DENDRÍTICAS	CD123	TLR4 HLA-DR	CD3, CD14 CD16 CD19 CD56	CD11c	TLR2
LINFOCITOS			CD3, CD14 CD16 CD19 CD56		

Tras llevar a cabo la adquisición de muestra (200.000-300.000 eventos en la región de linfocitos, determinada por tamaño y complejidad (FSC vs SSC)), se analizaron los datos obtenidos a partir de una estrategia de análisis que nos permitía identificar y cuantificar las CD (Figura 41).

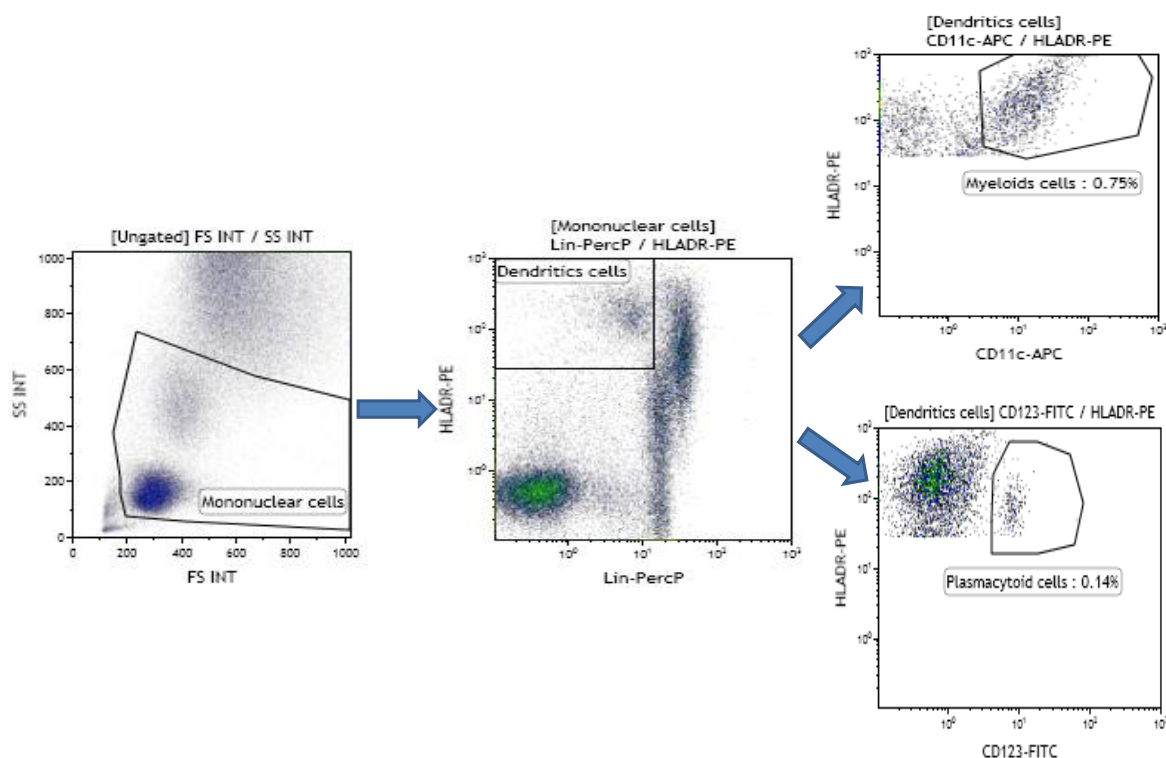


Figura 41. Estrategia de análisis CDm y CDp

La identificación y caracterización de DC es técnicamente exigente debido a su rareza como población menor en sangre periférica y su fragilidad ex vivo²¹⁴. El análisis que nos facilitó el coctel de monoclonales CD Linaje (Lin-) nos permitía diferenciar las DC entre sí en sus 2 subtipos (CDm, CDp). La expresión de CD11c y CD123 se cuantificó dentro de la población celular Lin- HLA-DR+ para definir las subpoblaciones CDm (CD11c high, CD123 low) y CDp (CD11c low, CD123 high) (Fig. 41) ya que las células dendríticas se caracterizan por ser de linaje linfoide negativo (Lin-) y HLA-DR+^{215,216} así las DCm se identifican como Lin- HLA-DR+/CD11c+ y las poblaciones de DCp como Lin- HLA-DR+/CD123+^{217,218}

La expresión de CD11c y CD123 se determinó dentro de las células Lin-HLA-DR+ para definir los subconjuntos CDm (CD11high CD123low) y CDp (CD11low CD123high), como se describió²¹⁴(Figura 41).

Por otra parte, para medir la expresión de TLRs se decidió utilizar la intensidad media de fluorescencia (MFI) ya que se consideró más adecuado dada la baja expresión porcentual esperable. En el caso del análisis del estado de expresión de CD38 y HLA-DR de los monocitos se utilizó el porcentaje. Las grandes fluctuaciones en la cifra de leucocitos y por ende de linfocitos en términos absolutos que se producen en el periodo inmediato post trasplante es una razón por la que no se analizaron cifras absolutas en esta tesis doctoral.

6. Análisis estadístico

Dispersión, normalidad de los datos y técnicas estadísticas

Para el estudio de cinéticas no hubo un cálculo de tamaño muestral específico y se limitó a estudiar el máximo número posible de pacientes programados según el cálculo para los estudios de asociación con variables de resultado.

Para los análisis de asociación con variables de resultado (infección, rechazo, muerte) se hizo un cálculo de tamaño muestral. Trabajando con una seguridad del 95% y un poder del 80%, considerando un coeficiente de correlación de Pearson máximo de 0.7 (entre el factor a estudio y todas las variables incluidas en los modelos de regresión logística) se necesitaría recoger información de un mínimo de 41 pacientes de TOS, con un 30% de eventos infecciosos u otras variables de resultado, para detectar un efecto de riesgo relativo de 2. Se ha estimado una tasa de pérdida de seguimiento de 0.15.

Estimación de medidas de tendencia central. Las variables categóricas se expresaron como porcentajes (%) y las variables cuantitativas se indicaron como media o mediana, mínimo y máximo y/o rango intercuartílico [IQR] según procedía.

Análisis de asociación con variables clínicas

- Distribución de las variables. Bondad de ajuste a la normalidad de variables: Test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables de distribución no normal se normalizaron mediante una transformación logarítmica si hacía falta.
- Comparación de medias entre 2 grupos. Se compararon las variables numéricas entre dos grupos usando el test de Student o test de Mann-Whitney según era adecuado.
- Comparación de porcentajes o prevalencia entre dos grupos. Se compararon porcentajes o prevalencias o tasas con el test de Chi-cuadrado.
- Análisis de asociación con variables de resultado. Asociación entre parámetros inmunológicos y desarrollo de eventos infecciosos, rechazo o muerte: Primero se identificaron diferencias entre variables cuantitativas y cualitativas con las pruebas antes indicadas. Las variables que mostraron asociación significativa con evento ($p < 0.05$) o mostraron tendencia de asociación ($p \leq 0.1$) se sometieron al modelo univariable de regresión logística.
- Regresión logística: Primero se hicieron modelos univariados con las variables en las cuales se hayan detectado diferencias en las comparaciones de medias y proporciones a una concentración $p < 0.05$ o con tendencia de $p \leq 0.1$. Posteriormente se realizó el ajuste multivariante por posibles variables de confusión incluyendo sólo variables significativas de los modelos univariados o que muestren tendencia de $p \leq 0.1$. Se realizó corrección por realización de comparaciones múltiples.

- Análisis de Correlación entre muestras. El análisis de correlación se realizó con el test de Pearson o Spearmann según correspondía.
- Selección de puntos de corte de biomarcadores específicos. Dependiendo de los biomarcadores se utilizó como punto de corte: valor de la media, valor de la mediana, valor normal del laboratorio.
- Significación estadística. Los resultados estadísticamente significativos fueron establecidos para $p < 0,05$.
- Tendencia estadística: Definida como valor de $p \leq 0.1$.
- Todos los datos recogidos se volcaron en sus correspondientes bases de datos y analizados por el programa estadístico SPSS® versión 25 y Excell.

Definición de variable primaria:

Depende de los estudios.

- INFECCION: Infección según definición de CDC (clínica compatible o con confirmación microbiológica) que requiera ingreso hospitalario y tratamiento antimicrobiano IV. Cuando se analiza la variable infección se consideran todas las infecciones independientemente del tipo o etiología de la misma (bacteriana, viral, fúngica, parasitaria). En algunos casos, si el número de eventos así lo permite se hace análisis por tipo de organismo, como, por ejemplo, infección por citomegalovirus, infección bacteriana, infección recurrente definida como infección que aparece más de una vez, pudiendo ser del mismo tipo y etiología o distinta.
- RECHAZO: Se utilizaron criterios estándar según definición actualizada de la ISHLT.
- ENFERMEDAD VASCULAR DEL INJERTO: Se utilizaron criterios estándar según definición actualizada de la ISHLT.
- MUERTE: Registro de muerte verificado en la HCE.
- VARIABLES DE AJUSTE: Presencia de infecciones recurrentes. Estratificación por tipo de infección: infección viral, bacteriana. Variables pre-trasplante: Edad, sexo, inmunizaciones, infecciones antes del trasplante, antecedentes médicos, insuficiencia renal, diabetes, hipertensión arterial (HTA). Trasplante: Indicación del trasplante, fecha del trasplante, serología IgG a CMV paciente/donante, protocolo de tratamiento inmunosupresor, protocolo de profilaxis antiinfecciosa. Proteína C reactiva. Post-trasplante: complicaciones infecciosas, fenómenos de rechazo, fallecimiento, causa de fallecimiento.

Variables combinadas:

En los casos en que se identifique la posibilidad de hacer variables combinadas de riesgo, además del biomarcador seleccionado se utilizará como variable de referencia validada por el grupo a la hipogammaglobulinemia IgG definida como $\text{IgG} < 600 \text{ mg/dL}$.

Minimización de sesgos

La información utilizada en esta tesis se ha generado prospectivamente durante las visitas de seguimiento de rutina y sin pérdida de seguimiento. Por esta razón se ha considerado suficiente para el ejercicio de esta tesis una aproximación de regresión logística y no se ha procedido a hacer otras aproximaciones del tipo *propensity score*.

7. Procedimiento de reclutamiento, recepción de muestras, seguimiento y recogida de datos

Tras solicitar el consentimiento informado, se programaron los distintos estudios en las visitas programadas por el servicio de Cardiología en Planta 5200 del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), en Consultas Externas de Cardiología o Inmunología o en Hospitales de Día de Cardiología o Inmunología.

Programación de las extracciones de sangre.

La solicitud de pruebas corrió a cargo de personal de los Servicios Participantes (Inmunología, Cardiología, Unidad de Cuidados Post Operatorios).

Los datos clínicos se obtuvieron de las bases de datos de las Unidades de Trasplante participantes y se completaron mediante revisión utilizando la HCE como documento fuente.

Recepción de muestras en el Servicio de Inmunología del HGUGM, alicuotado de muestras y/o procesamiento inmediato según el tipo de biomarcador. Las muestras para MBL se guardaron a -80°C hasta el momento de montar los ELISAS. Las muestras de ADN para los estudios genéticos se procesaron en fresco. Las muestras para citometría de flujo se procesaron en fresco el mismo día de la obtención.

Recuperación de muestras. Para minimizar las pérdidas de seguimiento de biomarcadores en caso de que una muestra no llegó al laboratorio se volvió a cursar orden de extracción para el día siguiente (ingresados) o el día más próximo posible a la visita correspondiente en los ambulatorios.

8. Periodo de realización

Inclusión de pacientes (visita de inclusión) ha sido variable en los distintos estudios.

9. Control de calidad de datos clínicos

Se realizaron reuniones periódicas (al menos una semestral durante el estudio) para verificar que la información clínica y de laboratorio era recogida adecuadamente para la tesis doctoral.

10. Confidencialidad, ética y consentimiento informado

Recopilación de datos y confidencialidad. Los datos fueron recogidos en una BD y se protegieron frente al acceso de personal no autorizado (normas de la ley de protección de datos).

Consideraciones éticas. A todos los pacientes se les solicitó un consentimiento informado. Uno de los modelos se muestra en el anexo 2, para participar en el estudio, así como en su consentimiento de que los datos obtenidos en los estudios fuesen utilizados para estudios de investigación. Se ha obtenido aprobación de la Comisión de Investigación y del Comité de Ética. El consentimiento informado contempla el almacenamiento de muestras para su estudio posterior, así como para la realización del estudio genético.

11. Limitaciones

Se asumen las limitaciones derivadas de los estudios retrospectivos y el correspondiente sesgo de selección que se puede haber producido.

The background of the slide features a dark blue gradient. On the right side, a DNA double helix is depicted, with one strand highlighted in orange and red. Scattered across the left and bottom areas are several stylized, semi-transparent blue cells, each with a darker blue nucleus.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

Estudio 1. Caracterización cinética de la concentración sérica de MBL pre-post TC, y genotipos: implicación clínica

Se realizó un estudio prospectivo de la cinética de MBL. Se reclutó un total de 185 pacientes sometidos a trasplante cardiaco entre 2013 y 2021.

1.1. Características clínicas de los pacientes

Las variables clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 10, las cuales tuvieron un seguimiento medio de 93 meses. El 69 % eran hombres lo cual es una distribución convencional para el trasplante cardiaco. La causa principal para el trasplante fueron las miocardiopatías isquémicas e idiopáticas. Se registraron datos de procedimientos que pueden actuar como factores de riesgo, uno de los cuales es el uso de soporte de asistencia circulatoria, necesarios como terapia puente hacia el trasplante cuando se produce una patología cardíaca muy grave terminal. Luego se verá si fue variable de riesgo. Un 10% fueron discordantes para serología IgG CMV (D+R-) que son los considerados pacientes de alto riesgo para tener infección por CMV. Cerca del 30% tuvieron enfermedad bacteriana durante el primer año y un 20% infección por CMV. La cohorte es válida para evaluar la cinética.

Tabla 10. Características Clínicas de la población de trasplantados cardíacos estudiada

Variables	Frecuencias
Número de pacientes	185
Tiempo de seguimiento en meses, media (rango intercuartil)	93 (6.6-154)
Edad, media (mínimo y máximo), rango intercuartil	53 (18-73), 48-61
Hombres, número (%)	129 (69)
Etiología de miocardiopatía dilatada idiopática, número (%)	41 (22.2)
Etiología de miocardiopatía dilatada isquémica, número (%)	57 (30.8)
Etiología de enfermedad de arteria coronaria, número (%)	24 (13)
Etiología de enfermedad valvular, número (%)	20 (10.8)
Etiología de enfermedad congénita, número (%)	10 (5.4)
Insuficiencia renal, número (%)	31 (16.8)
Infecciones pre-trasplante, número (%)	18 (9.7)
Diabetes pre-trasplante tratada con insulina, número (%)	8 (4.3)
Diabetes pre-trasplante tratada con antidiabéticos orales, número (%)	18 (9.7)
Requerimiento de ventilación mecánica, número (%)	30 (16.2)
Receptor IgG seronegativo para CMV	27 (14.6)
Asistencia circulatoria por balón, número (%)	31 (16.8)
Asistencia circulatoria por ECMO, número (%)	6 (3.2)
Asistencia circulatoria por DAV continuo, número (%)	7 (3.8)
Asistencia circulatoria por DAV pulsátil, número (%)	16 (8.6)
Donante seronegativo, número (%)	40 (21.6)
Discordancia de serología CMV IgG donante (+), receptor (-)	19 (10.3)
Retrasplante como indicación, número (%)	10 (5.4)
Inducción con gammaglobulina anti-timocito, número (%)	32 (17.3)
Inducción con daclizumab, número (%)	85 (45.9)
Inducción con basiliximab, número (%)	61 (33)
Horas de intubación, media (rango intercuartil)	114 (19-96)
Tiempo de isquemia, minutos, media (rango intercuartil)	219 (179-251)
Tiempo de circulación extracorpórea, minutos, media (rango intercuartil)	152 (116-169)
Fallo primario del injerto, número (%)	51 (27.6)
Rechazo celular, número (%)	47 (25.4)
Rechazo celular recurrente, número (%)	15 (8.1)
Enfermedad vascular del injerto, número (%)	38 (20.5)
Infección por CMV primeros 12 meses, número (%)	37 (20)
Infección bacteriana primeros 12 meses, número (%)	53 (28.6)
Infección recurrente primeros 12 meses, número (%)*	39 (21.1)
Diabetes post trasplante tratada con dieta, número (%)	14 (7.6)
Diabetes post trasplante tratadas con antidiabéticos orales, número (%)	17 (9.2)
Diabetes post trasplante tratadas con insulina, número (%)	45 (24.3)
Diálisis post trasplante, número (%)	4 (2.2)
Muerte post trasplante, número (%)	73 (39.5)
Muerte de primer año, número (%)	12 (6.5)

*Incluye infección bacteriana, vírica, fúngica o protozoo

DAV dispositivo de asistencia ventricular

1.1.1. Concentraciones séricas y etiología del trasplante

En la tabla 11 se especifican las causas del trasplante y la concentración de MBL pre-trasplante asociada; se observa que el más bajo (704 ± 698 ng/ml) se observa en los retrasplantados, seguido por la concentración de los que se trasplantaron por miocardiopatía dilatada (1170 ± 883 ng/ml).

Tabla 11. Asociación entre concentraciones pre-trasplante de MBL y la etiología del trasplante

Etiología de trasplante	N	Concentración sérica de MBL (ng/ml)
Coronaria	24	1206 ± 975
Dilatada	112	1170 ± 883
Retrasplante	8	704 ± 698
Hipertrófica	5	2018 ± 2802
Valvular	20	1381 ± 720
Otras	16	1207 ± 913

1.1.2. Concentraciones séricas de MBL y clínica

En la tabla 12 se indica una relación de variables clínicas y la concentración pre-trasplante de MBL, donde los valores no muestran diferencias significativas. Tan solo se aprecia una tendencia hacia menores concentraciones de MBL en pacientes > 50 años.

Tabla 12. Asociación entre concentraciones pre-trasplante de MBL y variables clínicas

Variables	Concentración sérica de MBL	Variables	Concentración sérica de MBL	Valor de p
Edad > 50	1140 ± 883	Edad < 50	1447 ± 999	0.197
Hombres	1206 ± 942	Mujeres	1212 ± 819	0.981
Infección Pre	1283 ± 864	No Infección Pre	1198 ± 923	0.792
VM Pre	1177 ± 739	No VM Pre	1211 ± 935	0.917
HTA Pre	1323 ± 969	No HTA Pre	1139 ± 880	0.369
Hipercol Pre	1070 ± 870	No Hipercol Pre	1300 ± 937	0.253
Enf Vascular Pre	1078 ± 1070	No Enf Vascular Pre	1214 ± 912	0.774

Enf Vascular Enfermedad vascular periférica; HTA hipertensión arterial; Hipercol Hipercolesterolemia; VM Ventilación mecánica

1.2. Correlación de concentraciones de la población estudiada con población control procedentes de donantes de sangre como referencia

A continuación, se presentan los datos de los pacientes trasplantados cardíacos estudiados en la tesis doctoral comparándose con controles aportados por un grupo colaborador de Barcelona (Dr Lozano, Hospital Clinic) para ver comparativamente como es la prevalencia de genotipos. Destaca que cerca del 40 % representan genotipos *MBL2* de producción baja/intermedia de proteína en ambos grupos. La variante alélica LYPB, es el haplotipo predominante en cuanto a la región estructural mayoritaria en nuestro estudio, ya que como se vio en una anterior sección difiere en los distintos grupos étnicos. La frecuencia de los haplotipos y genotipos *MBL2* encontrados entre los controles sanos y pacientes trasplantados no parecen presentar diferencias en las frecuencias de los distintos haplotipos en general (tablas 13, 14), o sea es representativa la distribución de genotipos de la población de referencia de la que pudimos tener esta información. En esta parte no se hizo ninguna aproximación estadística ya que no tuvimos acceso a bases de datos de la población de Barcelona.

Sin embargo, en la tabla 15, se muestra que las concentraciones séricas de MBL en los trasplantados cardíacos en los tres tiempos evaluados (pre-trasplante, día 7 post TC y 30 post TC), presentan valores significativamente más bajos que los controles sanos evaluados en el Hospital Gregorio Marañón con selección de personas sanas de sexo y edad similar a los trasplantados. De aquí se deriva un comentario de que, aunque la distribución genotípica es la esperable en la población, el estado de cardiopatía terminal si que podría impactar de alguna manera en la concentración sérica.

Por otro lado, la cinética de MBL en los momentos estudiados muestra una tendencia a disminución de la concentración al día 30, pero que no es significativa (comparado con la concentración basal pre-TC).

Tabla 13. Frecuencia de haplotipos *MBL2* en la población estudiada y en una población de donantes de sangre como referencia del área de Barcelona (n=101)

Haplotipo	Frecuencia % Trasplantados	Frecuencia % Control Area Barcelona*
HYP A	26.7	25.0
LYP A	7.5	7.7
LYQ A	23.6	24
LXP A	20.4	18.3
LYP B	15.6	17.3
LYQ C	0.88	1.9
HYP D	5.3	5.8

Tabla 14. Frecuencia de genotipos MBL2 en la población estudiada y en una población de donantes de sangre como referencia del área de Madrid (n=61) y Barcelona (n=101)

Haplotipo	Frecuencia % Trasplantados	Frecuencia % Control Area Madrid*	Frecuencia % Control Area Barcelona*
Alta	58.05	59	54.7
A/A	39.3		31.7
A/XA	18.75		23
Intermedia	28.1	26	29.9
A/O	23.9		27.0
XA/XA	4.2		2.9
Baja	13.6	14.7	15.4
O/O	8.5		7.7
XA/O	5.1		7.7

* Datos cedidos por Dr F Lozano Barcelona Hospital Clinic.

Tabla 15. Comparación de concentraciones de MBL con controles sanos

Grupo	Media $\pm$ DS	Valor de p*	Valor de p**
Controles sanos (n=62)	2147 $\pm$ 1324		
Trasplantados pre-TC	1207 $\pm$ 913	<0.0001	
Trasplantados día 7 post TC	1220 $\pm$ 875	<0.0001	0.624
Trasplantados día 30 post TC	1104 $\pm$ 888	<0.0001	0.064

*Prueba T de Student en comparación con controles sanos

**En comparación con el estudio pre-TC.

DS: Desviación standard. TC: Trasplante cardiaco

1.3. Correlación fenotipo versus genotipo

A continuación, en la tabla 16, se presenta la asociación del tipo de genotipo frente a concentración de proteína. Se deduce una buena correlación genotipo/fenotipo. La deficiencia de MBL baja muestra valor <de 30 ng/ml y corresponde a genotipo de baja producción vs una concentración de alrededor de 700 ng/ml que corresponde a genotipo de intermedia producción vs al de una concentración alta > 1200 ng/ml que corresponde a genotipo de alta producción, presentando una diferencia significativa entre los grupos definidos por el genotipo de producción de MBL. Esta parte era importante ya que al haber buena correlación uno puede decidir utilizar cualquiera de las aproximaciones (inmunoquímica o genética) sabiendo que son equivalentes.

Tabla 16. Correlación genotipo fenotipo de MBL. Concentración sérica pre-trasplante (ng/ml) y genotipo asociado a producción de MBL.

Grupo	Media ± DS MBL	Valor de p	Valor de p
Genotipo de baja producción	27.8 ± 4.18	0.001*	<0.0001**
Genotipo de intermedia producción	743 ± 554	0.001***	<0.0001**
Genotipo de alta producción	1214 ± 820	<0.0001***	<0.0001*

*Comparación con genotipo intermedio; **con genotipo de alta producción; *** con genotipo de baja producción.

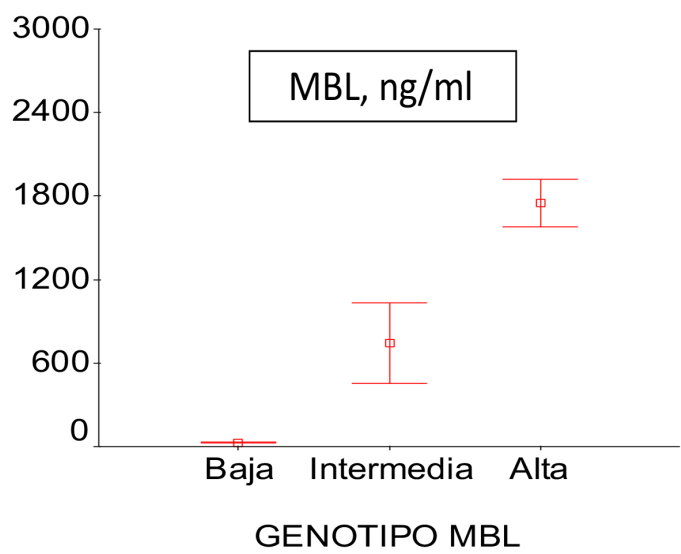


Figura 42. Correlación Genotipo Fenotipo de MBL. Pre-TC: pre-trasplante cardiaco. EE: error standard de media. Genotipo asociado a baja, intermedia y alta producción de concentraciones séricas de MBL (ng/ml).

1.4. Correlación fenotipo versus indicadores inmunocompetencia

La evaluación del estado de inmunocompetencia debe tener en cuenta la potencial redundancia en los mecanismos que son necesarios para el control de las infecciones. De allí que nos interesó saber si las concentraciones de MBL a priori tenían alguna correlación alta y significativa que pudiese ser interesante de conocer. A continuación, en la tabla 17 se presenta la correlación estadística entre la concentración de MBL pre-trasplante y la correspondencia con proteínas (algunas de las cuales son inmunoglobulinas, complemento), linfocitos de los cuales se analizan distintas subpoblaciones linfocitarias, utilizando para ello el coeficiente de correlación de Pearson para las variables cuantitativas. Aunque hay correlaciones significativas con IgA, CD3abs, CD4abs, CD19abs y CD8abs en ningún caso se trata de correlaciones altamente significativas (>0.7). La posible interpretación del significado de estas correlaciones bajas precisa de otro tipo de estudios que escapen al alcance de la tesis. No obstante, resulta interesante saber de la posible relación entre un sensor de reconocimiento de patrones y proteínas y células de inmunidad adquirida.

Tabla 17. Correlación entre concentraciones pre-trasplante de MBL y parámetros de inmunocompetencia.

	Proteínas	Leucocitos	Linfocitos	IgG	IgA	IgM
Pearson	0.101	-0.242	-0.238	-0.30	0.431	0.188
Valor de p	0.647	0.255	0.263	0.856	0.006	0.252

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	C3	C4
Pearson	0.172	0.080	0.077	0.205	0.176	0.250
Valor de p	0.316	0.642	0.655	0.231	0.336	0.167

	Factor B	PCR	Ac Tetanos	Ac PPS	Ac HBs	Ac CMV
Pearson	0.013	0.078	0.176	0.099	-0.214	-0.063
Valor de p	0.951	0.655	0.655	0.585	0.275	0.734

Ac PPS: anticuerpos anti-polisacárido de neumococo. Ac HBs: anticuerpos anti-antígeno de superficie de hepatitis B. Ac CMV anticuerpos anti-citomegalovirus.

	Ac HIB	Ac VVZ	CD3%	CD3abs	CD4%	CD4abs
Pearson	0.208	-0.151	0.137	0.555	-0.023	0.484
Valor de p	0.279	0.462	0.438	0.001	0.898	0.004

Ac HIB: anticuerpos anti hemófilus influenza tipo B. Ac VVZ: anticuerpos anti-varicela zoster.

	CD8%	CD8abs	NK%	NKabs	CD19%	CD19abs
Pearson	0.157	0.505	-0.283	0.175	0.153	0.443
Valor de p	0.375	0.003	0.105	0.331	0.388	0.010

1.5. Asociación entre concentraciones de MBL e infección

El objetivo más relevante de esta parte de la tesis era ver si podíamos demostrar alguna asociación entre el genotipo de MBL o su concentración sérica con el desarrollo de complicaciones infecciosas que se presentaron en el periodo post trasplante. Durante el periodo de seguimiento de un año tras el trasplante cardiaco, un total de 53 (28.6 %) pacientes desarrollaron alguna infección bacteriana que requirió tratamiento antibiótico intravenoso; mientras que 39 (21.1%) pacientes presentaron infecciones recurrentes (incluyendo infección bacteriana, vírica, fúngica o protozoo).

En la tabla 18 se muestran las concentraciones séricas de MBL enfretadas a la variable infección por CMV.

Los pacientes que desarrollaron infección por CMV presentaron concentraciones de proteína ligeramente más bajas que los pacientes sin infección en los tres tiempos (pre-TC, 7d y 30d post-TC); siendo significativamente más bajas el día 30 post-TC.

La misma comparativa (tabla 19) se realizó para pacientes con infección bacteriana vs pacientes sin infección bacteriana en donde no se vieron diferencias significativas en los tres tiempos de medición de la concentración sérica de MBL.

Tabla 18. Asociación entre concentraciones séricas de MBL e infección por CMV

Variables	Infección por CMV		Valor de p
	Sí	No	
MBL pre-TC (ng/ml)	922 ± 755	1272 ± 937	0.167
MBL día 7 (ng/ml)	995 ± 653	1265 ± 911	0.334
MBL día 30 (ng/ml)	617 ± 450	1199 ± 922	0.046

MBL: lectina ligadora de manosa

Tabla 19. Asociación entre concentraciones séricas de MBL e infección bacteriana

Variables	Infección Bacteriana		Valor de p
	Sí	No	
MBL pre-TC (ng/ml)	1243 ± 829	1246 ± 924	0.990
MBL día 7 (ng/ml)	1232 ± 717	1421 ± 934	0.483
MBL día 30 (ng/ml)	1240 ± 761	1179 ± 891	0.826

MBL: lectina ligadora de manosa

Resultó interesante ver la asociación con infección por CMV, pero no con infección bacteriana. Sin embargo, en la siguiente tabla (número 20), se demuestra que si hay una asociación significativa con el desarrollo de infección recurrente.

Los pacientes con infección recurrente presentaron concentraciones significativamente más bajas en el pre-TC respecto a los pacientes sin infección recurrente. En el tiempo post TC no mostró diferencias significativas, aunque si se vieron claras tendencias hacia un menor nivel, lo que podría indicar un posible rol de esta proteína en el control de la recurrencia infecciosa. Es de interés el hallazgo de una menor concentración pre-trasplante ya que junto con el genotipo (ver más adelante) puede ser una señal de predisposición individual y marcar el pronóstico de desarrollo de infecciones del paciente (susceptibilidad individual).

Tabla 20. Asociación entre concentraciones séricas de MBL e infecciones recurrentes

Variables	Infección Recurrente*		Valor de p
	Si	No	
MBL pre-TC (ng/ml)	824 ± 755	1425 ± 879	0.014
MBL día 7 (ng/ml)	1018 ± 729	1519 ± 874	0.052
MBL día 30 (ng/ml)	925 ± 681	1379 ± 879	0.079

MBL: lectina ligadora de manosa. *Incluye infección bacteriana, vírica, fúngica o protozoo

1.6. Asociación entre concentraciones de MBL e infección: factores de riesgo asociados

En la tabla 21 se analizó la posible influencia del genotipo insuficiente o bajo con distintas variables clínicas de interés en trasplantados de corazón. De esta manera se vio que el riesgo de infección por CMV tratada durante el primer año es 2.57 veces si se tiene el genotipo de insuficiente o de baja producción; mientras que el riesgo de infección recurrente tratada durante el primer año es 2.35 veces si se tiene dicho genotipo. No se detectó asociación con las demás variables.

Tabla 21. Regresión logística de asociación entre genotipo de producción insuficiente o baja de MBL* con varias variables de resultado clínico

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Infección por CMV tratada durante el primer año	2.57	1.14 – 5.79	0.023
Infección bacteriana tratada durante el primer año	0.89	0.43 – 1.80	0.741
Infección recurrente tratada durante el primer año**	2.35	1.09 – 5.04	0.027
Ventilación mecánica durante el periodo pre-TC	2.14	0.82 – 5.53	0.118
Retrasplante como indicación	0.72	0.14 – 3.69	0.690
Fallo primario del injerto	0.72	0.32 – 1.64	0.442
Rechazo celular	0.59	0.27 – 1.29	0.189
Rechazo celular recurrente	0.58	0.17 – 1.99	0.388
Enfermedad vascular del injerto	0.58	0.25 – 1.35	0.206
Muerte	1.29	0.64 – 2.59	0.474

*Genotipo de baja, intermedia vs alta producción de MBL. **Incluye infección bacteriana, vírica, fúngica o protozoo. Pre-TC: pre-trasplante cardíaco.

1.6.1. Infección por CMV post trasplante cardiaco durante el primer año

Para analizar si el genotipo o la concentración de MBL son factores de riesgo de desarrollo de infección por CMV, se utilizó primero un modelo de regresión logística univariable para estimar el efecto de diversas variables en el desarrollo de infección por CMV post-TC (tabla 22). Vemos que la edad, el genotipo insuficiente, la discordancia receptor IgG CMV (-) D (+), la infección bacteriana durante el primer año y concentraciones de MBL < 1104 ng/ml al día 30 post trasplante cardiaco, fueron factores de riesgo para desarrollar esta complicación infecciosa, siendo el ultimo de estos factores el que tuvo el OR más alto (>10) aunque con un intervalo de confianza (IC95%) demasiado amplio.

Tabla 22. Regresión logística univariable de variables asociadas a riesgo de desarrollo de infección por CMV post trasplante cardiaco durante el primer año

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Edad, por cada año mas	1.05	1.0063 – 1.094	0.024
Edad > 50 años	3.30	1.21 – 8.99	0.019
Sexo, mujer vs hombre	1.06	0.46 – 2.48	0.878
Genotipo insuficiente (baja, intermedia, vs alta) *	2.57	1.14 – 5.79	0.023
MBL < 1389 pre-trasplante	2.84	0.89 – 9.02	0.077
Insuficiencia renal pre-trasplante (no tener)	0.67	0.27 – 1.65	0.387
Infección pre-trasplante (no tener)	2.13	0.47 – 9.69	0.328
Diabetes pre-trasplante (precisa terapia)	1.03	0.63 – 1.69	0.903
Receptor seronegativo IgG para CMV	1.26	0.81 – 1.99	0.314
Ventilación mecánica pre-trasplante (no usa)	1.31	0.46 – 3.69	0.608
Uso de asistencia ventricular pre-trasplante	0.89	0.65 – 1.23	0.486
Donante seronegativo para IgG CMV	0.91	0.63 – 1.32	0.609
Discordancia Receptor IgG CMV (-) D (+)	6.04	2.23 – 16.37	0.0004
Tiempo de isquemia (por aumento de minutos)	1.001	0.99 – 1.006	0.708
Tiempo de circulación extracorpórea	1.003	0.99 – 1.009	0.324
Re-trasplante (No vs Si)	0.57	0.14 – 2.31	0.428
Inducción citolítica vs no citolítica	0.89	0.34 – 2.36	0.819
Uso de gammaglobulina anti timocítica	2.14	0.47 – 9.69	0.328
Inducción con basiliximab	0.71	0.33 – 1.53	0.388
Fallo primario del injerto	1.81	0.85 – 3.88	0.127
Horas de intubación, por cada hora más	0.99	0.99 – 0.001	0.491
Por cada rechazo más en primer año	5.46	0.63 – 46.88	0.122
Rechazo celular durante el primer año	7.05	0.609 – 81.57	0.118
Diabetes tratada post trasplante	0.88	0.43 – 1.84	0.741
Diálisis post-trasplante	1.27	0.12 – 12.56	0.838
Infección bacteriana durante el primer año	2.46	1.09 – 5.53	0.029
MBL < 1219 ng/ml día 7 post trasplante cardiaco	2.62	0.71 – 9.64	0.149
MBL < 1104 ng/ml día 30 post trasplante cardiaco	11.92	1.43 – 99.38	0.022

*Genotipo de baja, intermedia vs alta producción de MBL.

Para ver si esta asociación entre MBL y la concentración de MBL del mes son variables independientes de los factores clínicos que predisponen a esta infección se realizó un análisis multivariable (ver tabla 23). Se identificaron como factores de riesgo independientes para el desarrollo de infección por CMV post-TC el primer año, al genotipo de MBL asociado a producción insuficiente o baja, la discordancia receptor IgG CMV (-) D (+) y la edad, todas manteniéndose en el modelo de regresión como estadísticamente significativas. Debido a que hay buena correlación genotipo fenotipo no consideramos adecuado enfrentar ambas variables en el mismo modelo y así van por separado.

Así pues, por su parte teniendo en cuenta la concentración sérica de MBL post-TC, en el modelo univariante, se obtiene asociación como factores de riesgo para la edad, MBL < 1104 ng/ml a día 30 post trasplante cardíaco, a la discordancia receptor IgG CMV (-) D (+) y para la infección bacteriana durante el primer año para el desarrollo de infección CMV post-TC. Se estableció en el modelo multivariable una asociación como factor de riesgo independiente para la infección bacteriana durante el primer año y para la concentración baja de MBL al mes en el modelo multivariable.

Tabla 23. Regresión logística multivariable de variables asociadas a riesgo de desarrollo de infección por CMV post trasplante cardíaco durante el primer año

Genotipo MBL insuficiente

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Modelo Univariante			
Edad > 50 años	3.30	1.21 – 8.99	0.019
Genotipo insuficiente (baja, intermedia, vs alta)*	2.57	1.14 – 5.79	0.023
Discordancia Receptor IgG CMV (-) D (+)	6.04	2.23 – 16.37	0.0004
Infección bacteriana durante el primer año	2.46	1.09 – 5.53	0.029
Modelo Multivariante			
Edad > 50 años	3.34	1.007 – 11.09	0.048
Genotipo insuficiente (baja, intermedia, vs alta)*	2.54	1.03 – 6.23	0.041
Discordancia Receptor IgG CMV (-) D (+)	5.17	1.63 – 16.41	0.0053
Infección bacteriana durante el primer año	2.42	0.97 – 5.99	0.055

*Genotipo de baja, intermedia vs alta producción de MBL.

MBL día 30 post trasplante cardiaco

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Modelo Univariante			
Edad > 50 años	3.30	1.21 – 8.99	0.019
MBL < 1104 ng/ml día 30 post trasplante cardiaco	11.92	1.43 – 99.38	0.022
Discordancia Receptor IgG CMV (-) D (+)	6.04	2.23 – 16.37	0.0004
Infección bacteriana durante el primer año	2.46	1.09 – 5.53	0.029
Modelo Multivariante			
Edad > 50 años	5.42	2.16 – 49.17	0.354
MBL < 1104 ng/ml día 30 post trasplante cardiaco	32.275	2.23 – 46.77	0.011
Discordancia Receptor IgG CMV (-) D (+)	8.0049	0.56 – 114.1	0.124
Infección bacteriana durante el primer año	8.86	1.14 – 68.76	0.0369

Variable Combinada de Riesgo de infección de CMV: Genotipo MBL e hipogammaglobulinemia IgG día 7

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Modelo Univariante			
Hipogammaglobulinemia IgG < 600 mg/dL día 7	5.18	1.59 – 16.86	0.0063
Genotipo insuficiente (baja, intermedia, vs alta)*	2.57	1.14 – 5.79	0.023
V Combinada: genotipo + hipogammaglobulinemia	6.44	2.22 – 18.68	0.0006
Modelo Multivariante			
Edad > 50 años	4.59	0.85 – 24.91	0.077
V Combinada: genotipo + hipogammaglobulinemia	4.09	1.24 – 13.48	0.021
Discordancia Receptor IgG CMV (-) D (+)	4.19	0.92 – 19.21	0.065
Infección bacteriana durante el primer año	2.68	0.82 – 8.73	0.103

Se hizo una variable combinada de riesgo combinando el genotipo de riesgo MBL con la presencia de hipogammaglobulinemia IgG del día 7. Se observa que es una única variable que permanece en el modelo multivariable, además de asociarse mejor con el desarrollo de infección por CMV que cuando las variables son individuales.

1.6.2. Infección bacteriana post trasplante cardiaco durante el primer año

Una vez demostrado el rol como factor de riesgo de infección por CMV del genotipo MBL y de la concentración sérica de MBL, quisimos valorar lo mismo para predisposición a infección bacteriana.

En la tabla 24 se puede ver los factores de riesgo que han sido estadísticamente significativos en el análisis univariante para la infección bacteriana post trasplante cardiaco durante el primer año y fueron los siguientes: El desarrollo de infección por CMV durante el primer año, la hipogammaglobulinemia IgG < 600 mg/dl al día 7, además de la edad.

Tabla 24. Regresión logística univariable de variables asociadas a riesgo de desarrollo de infección bacteriana post trasplante cardíaco durante el primer año

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Edad, por cada año mas	1.04	1.0001 – 1.075	0.049
Edad > 50 años	2.01	0.92 – 4.41	0.082
Sexo, mujer vs hombre	0.46	0.18 – 1.19	0.112
Genotipo insuficiente (baja, intermedia, vs alta) *	0.81	0.49 – 1.32	0.39
Etiología de trasplante	0.99	0.99 – 1.002	0.553
MBL < 1389 pre-trasplante	0.81	0.285 – 2.31	0.697
Insuficiencia renal pre-trasplante (no tener)	1.09	0.42 – 2.85	0.858
Infección pre-trasplante (no tener)	1.55	0.45 – 5.32	0.48
Diabetes pre-trasplante (precisa terapia)	1.105	0.65 – 1.86	0.71
Receptor seronegativo IgG para CMV	0.466	0.17 – 1.26	0.132
Ventilación mecánica pre-trasplante (no usa)	0.81	0.336 – 1.95	0.638
Uso de asistencia ventricular pre-trasplante	1.02	0.78 – 1.33	0.875
Discordancia Receptor IgG CMV (-) D (+)	0.79	2.27 – 2.30	0.672
Tiempo de isquemia (por aumento de minutos)	0.998	0.993 – 1.003	0.436
Tiempo de circulación extracorpórea	1.003	0.99 – 1.009	0.297
Re-trasplante (No vs Si)	0.32	0.06 – 1.78	0.191
Inducción citolítica vs no citolítica	1.14	0.50 – 2.59	0.753
Uso de gammaglobulina anti timocítica	1.37	0.44 – 4.26	0.586
Inducción con basiliximab	1.31	0.63 – 2.76	0.47
Fallo primario del injerto	1.267	0.58 – 2.789	0.556
Horas de intubación, por cada hora más	1.0006	0.99 – 1.0029	0.59
Por cada rechazo más en primer año	2.35	0.32 – 17.02	0.398
Rechazo celular durante el primer año	2.26	0.195 – 26.26	0.51
Diabetes tratada post trasplante	0.92	0.45 – 1.88	0.823
Enfermedad vascular del injerto	1.21	0.53 – 2.799	0.639
Infección por CMV durante el primer año	2.46	1.09 – 5.53	0.029
MBL < 1219 ng/ml día 7 post trasplante cardíaco	1.63	0.48 – 5.56	0.43
MBL < 1104 ng/ml día 30 post trasplante cardíaco	1.51	0.441 – 5.18	0.511
Hipogammaglobulinemia IgG < 600 mg/dl día 7	3.70	1.17 – 11.72	0.026
Hipocomplementemia C3 día 7	3.12	0.84 – 11.70	0.09

*Genotipo de baja, intermedia vs alta producción de MBL.

De todos los factores que han sido estadísticamente significativos en el análisis univariante destaca tras pasar al ajuste multivariable aquella que es independiente que es nuestro marcador de referencia, la hipogammaglobulinemia IgG < 600 mg/dl del día 7.

Tabla 25. Regresión logística multivariable de variables asociadas a riesgo de desarrollo de infección bacteriana post trasplante cardiaco durante el primer año

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Modelo Univariante			
Edad, por cada año mas	1.04	1.0001 – 1.075	0.049
Hipogammaglobulinemia IgG < 600 mg/dl día 7	3.70	1.17 – 11.72	0.026
Hipocomplementemia C3 día 7	3.12	0.84 – 11.70	0.09
Infección por CMV durante el primer año	2.46	1.09 – 5.53	0.029
Modelo Multivariente			
Edad, por cada año mas	1.04	0.97 – 1.12	0.281
Hipogammaglobulinemia IgG < 600 mg/dl día 7	3.396	1.06 – 10.88	0.039
Hipocomplementemia C3 día 7	2.791	0.71 – 11.01	0.143
Infección por CMV durante el primer año	2.0009	0.45 – 8.73	0.122

1.6.3. Infección recurrente post trasplante cardiaco durante el primer año

Ahora evaluamos que biomarcadores mostraron asociación como factor de riesgo para infección recurrente. Esta variable se seleccionó ya que en los criterios de intervención para inmunoterapia con inmunoglobulinas la actual indicación exige recurrencia de infección que no responde a antimicrobianos. Tras el análisis univariable, destacan los siguientes factores de riesgo para infección recurrente post-TC durante el primer año: El genotipo insuficiente y bajo de MBL, una concentración baja de MBL (< 1389 ng/ml) pre-trasplante, o de MBL (< 1219 ng/ml) el día 7 post trasplante cardiaco al igual que la hipogammaglobulinemia IgG < 600 mg/dl al día 7 y la hipocomplementemia C3 del día 7.

Tabla 26. Regresión logística univariable de variables asociadas a riesgo de desarrollo de infección recurrente post trasplante cardíaco durante el primer año

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Edad, por cada año mas	1.021	0.98 – 1.0607	0.2679
Edad > 50 años	1.80	0.765 – 4.248	0.178
Sexo, mujer vs hombre	0.81	0.31 – 2.10	0.664
Genotipo insuficiente (baja, intermedia, vs alta) *	2.35	1.09 – 5.04	0.027
Etiología de trasplante	1.0006	0.99 – 1.0039	0.702
MBL < 1389 ng/ml pre-trasplante	4.68	1.40 – 15.68	0.012
Insuficiencia renal pre-trasplante (no tener)	1.41	0.48 – 4.17	0.531
Infección pre-trasplante (no tener)	0.94	0.27 – 3.25	0.92
Diabetes pre-trasplante (precisa terapia)	0.96	0.56 – 1.64	0.87
Receptor seronegativo IgG para CMV	0.75	0.33 – 1.66	0.477
Ventilación mecánica pre-trasplante (no usa)	0.51	0.21 – 1.28	0.154
Uso de asistencia ventricular pre-trasplante	1.22	0.92 – 1.61	0.156
Discordancia Receptor IgG CMV (-) D (+)	1.36	0.46 – 3.99	0.57
Tiempo de isquemia (por aumento de minutos)	0.999	0.993 – 1.0049	0.79
Tiempo de circulación extracorpórea	1.049	0.99 – 1.01	0.19
Re-trasplante (No vs Si)	0.62	0.09 – 3.84	0.60
Inducción no citolítica vs citolítica	0.41	0.14 – 1.18	0.098
Uso de gammaglobulina anti timocítica	2.74	0.58 – 12.85	0.201
Inducción con basiliximab	1.75	0.76 – 4.02	0.187
Fallo primario del injerto	1.43	0.62 – 3.29	0.395
Horas de intubación, por cada hora más	1.0014	0.99 – 1.0038	0.228
Por cada rechazo más en primer año	1.55	0.29 – 8.02	0.604
Rechazo celular durante el primer año	1.21	0.53 – 2.75	0.65
Rechazo celular recurrente el primer año	0.779	0.19 – 3.04	0.71
Diabetes tratada post trasplante	0.92	0.68 – 1.24	0.58
Enfermedad vascular del injerto	1.39	0.593 – 3.26	0.448
MBL < 1219 ng/ml día 7 post trasplante cardíaco	3.80	1.02 – 14.21	0.047
MBL < 1104 ng/ml día 30 post trasplante cardíaco	3.33	0.91 – 12.21	0.069
Hipogammaglobulinemia IgG < 600 mg/dl día 7	3.58	1.11 – 11.48	0.032
Hipocomplementemia C3 día 7	3.95	1.04 – 15.04	0.044

*Genotipo de baja, intermedia vs alta producción de MBL.

Como antes se ha hecho para otras variables infecciosas de resultado, para establecer el grado de independencia de los biomarcadores con infección bacteriana recurrente se procedió al ajuste multivariable de rigor. En la regresión multivariable (ver tabla 27), no destacan factores de riesgo independientes, estadísticamente significativos. En el análisis univariable el genotipo insuficiente y la MBL < 1219 ng/ml del día 7 post trasplante cardiaco, tienen una relación estadísticamente significativa con infección recurrente post-TC durante el primer año.

Tabla 27. Regresión logística multivariable de variables asociadas a riesgo de desarrollo de infección recurrente* post trasplante cardiaco durante el primer año

Genotipo MBL insuficiente

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Modelo Univariante			
Genotipo insuficiente (baja, intermedia, vs alta) **	2.35	1.09 – 5.04	0.027
Inducción no citolítica vs citolítica	0.41	0.14 – 1.18	0.098
Modelo Multivariante			
Genotipo insuficiente (baja, intermedia, vs alta) **	1.69	0.984 – 2.90	0.057
Inducción no citolítica vs citolítica	0.38	0.13 – 1.106	0.076

*Incluye infección bacteriana, vírica, fúngica o protozoo. Pre-TC: pre-trasplante cardiaco.

**Genotipo de baja, intermedia vs alta producción de MBL.

MBL día 7 post trasplante cardiaco

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Modelo Univariante			
MBL < 1219 ng/ml día 7 post trasplante cardiaco	3.80	1.02 – 14.21	0.047
Inducción no citolítica vs citolítica	0.41	0.14 – 1.18	0.098
Modelo Multivariante			
MBL < 1219 día 7 ng/ml post trasplante cardiaco	3.60	0.902 – 14.36	0.069
Inducción no citolítica vs citolítica	0.0006	0.90 – 5.42	0.798

Distribución de infecciones según etiología:

En las tablas suplementarias 1 a 3 (anexo 4), se puede consultar el tipo de microorganismo y clínica infecciosa.

Estudio 2. Estudio del genotipo de *IL1RN* para establecer la prevalencia de mutaciones.

2.1. Características demográficas y clínicas de los pacientes

En este segundo estudio de biomarcadores de inmunidad innata se analizaron muestras de 91 pacientes trasplantados cardiacos con seguimiento entre el año 2011 hasta el 2022, para el sitio polimórfico Penta alélico en el intrón 2 que contiene un VNTR (descrito previamente), así como su posible implicación clínica tal como antes se hizo con el modelo MBL.

En la siguiente tabla (28), se hace referencia a variables de los pacientes incluidos y que se verá luego su posible relación con el genotipo y como posibles factores de riesgo de complicaciones. Las cohortes de los biomarcadores no son las mismas ya que debido a la complejidad de este estudio se hizo en un menor número de pacientes por lo que el tamaño muestral es menor y por tanto se reanalizan las variables clínicas. Así, por ejemplo, cabe destacar el sexo del receptor, que en este caso abarca a más del 80 % que eran hombres. La causa principal para el trasplante fue la miocardiopatía dilatada.

El periodo largo de seguimiento disponible permitió observar una acumulación alta de pacientes que fallecieron en el periodo post trasplante por lo que el análisis se centró en esta complicación clínica como variable primaria.

Tabla 28. Estudio Genético de Receptor de Antagonista de IL-1. Características demográficas y Clínicas

Variables	Frecuencias
Número de pacientes estudiados	91
Tiempo de seguimiento en meses, media (rango intercuartil)	146 (71-207)
Edad, media (mínimo y máximo), rango intercuartil	55 (22-69), 51-63
Hombres, número (%)	77 (84.6)
Etiología de miocardiopatía dilatada, número (%)	63 (70)
Etiología de enfermedad de arteria coronaria, número (%)	8 (8.9)
Etiología de enfermedad valvular, número (%)	3 (3.3)
Etiología de enfermedad congénita, número (%)	5 (5.5)
Insuficiencia renal, número (%)	13 (14.4)
Infecciones pre-trasplante, número (%)	11 (12.2)
Diabetes pre-trasplante tratada con insulina, número (%)	5 (5.5)
Diabetes pre-trasplante tratada con antidiabéticos orales, número (%)	8 (8.8)
Requerimiento de ventilación mecánica, número (%)	16 (17.6)
Asistencia circulatoria por balón, número (%)	17 (18.7)
Asistencia circulatoria por ECMO, número (%)	1 (1.1)
Asistencia circulatoria por DAV continuo, número (%)	2 (2.2)
Asistencia circulatoria por DAV pulsátil, número (%)	11 (12.1)
Receptor seronegativo, número (%)	13 (14.3)
Discordancia de serología CMV IgG donante (+), receptor (-)	9 (9.9)
Retrasplante como indicación, número (%)	5 (5.5)
Inducción con gammaglobulina anti-timocito, número (%)	19 (20.9)
Inducción con daclizumab, número (%)	42 (46.2)
Inducción con basiliximab, número (%)	26 (28.6)
Horas de intubación, media (rango intercuartil)	103.8 (21-114)
Tiempo de isquemia, minutos, media (rango intercuartil)	222 (172-265)
Tiempo de circulación extracorpórea, minutos, media (rango intercuartil)	151 (115-161)
Fallo primario del injerto, número (%)	22 (24.2)
Rechazo celular, número (%)	27 (29.7)
Rechazo celular recurrente, número (%)	15 (8.1)
Enfermedad vascular del injerto, número (%)	21 (23.1)
Infección por CMV primeros 12 meses, número (%)	21 (23.1)
Infección bacteriana primeros 12 meses, número (%)	39 (42.9)
Infección recurrente primeros 12 meses, número (%)*	25 (27.5)
Diabetes post trasplante tratada con dieta, número (%)	5 (5.5)
Diabetes post trasplante tratadas con antidiabéticos orales, número (%)	8 (8.8)
Diabetes post trasplante tratadas con insulina, número (%)	22 (24.2)
Diálisis post trasplante, número (%)	2 (2.2)
Muerte post trasplante a lo largo del todo el seguimiento, número (%)	43 (47.3)
Muerte de primer año, número (%)	5 (5.5)

2.2. Frecuencia relativa de los genotipos y alelos

En la tabla 29 y 30, se presentan las frecuencias de los genotipos de mayor prevalencia y la presencia de los correspondientes alelos. El alelo A salvaje y alelo B mutante; los otros 3 alelos son minoritarios como ya se detalló.

Tabla 29. Frecuencia de polimorfismo del receptor de antagonista de IL-1

Genotipo	Frecuencia N (%)
AA	47 (51.6)
AB	35 (38.5)
AC	1 (1.1)
BB	7 (7.7)
BC	1 (1.1)

Tabla 30. Frecuencias de Alelos 1 y 2 del receptor de antagonista de IL-1

Genotipo	Frecuencia N (%)
Alelo 1	
A	83 (91.2)
B	8 (8.8)
C	-
Alelo 2	
A	47 (51.6)
B	42 (46.2)
C	2 (2.2)
Presencia de alelo B	43 (47.3)

2.3. Asociación del alelo B con variables clínicas

En este análisis se busca una asociación entre el estudio genético y el desarrollo de muerte. A continuación, se muestra una comparación de frecuencias. Se seleccionó el alelo mutante B ya que en estudios previos en otros modelos de enfermedad fue el que mostraba asociación con variables clínicas de resultado. En la tabla 31 se ve que no había asociación entre su presencia y distintos parámetros relacionados con la etapa inicial del trasplante y con niveles de PCR como parámetro de referencia de inflamación. En la tabla 32 se observa que su presencia si mostró una clara tendencia estadística como factor de riesgo de muerte.

Tabla 31. Asociación entre presencia de alelo B del genotipo del receptor para antagonista de IL-1 con varias variables de resultado clínico y de laboratorio

Variable	Alelo B presente	Alelo B ausente	Valor de p
Tiempo de isquemia	227 ± 67	217 ± 68	0.536
Días en UCI post TC	13 ± 12	12 ± 9	0.92
Horas de Intubación	92 ± 139	112 ± 211	0.713
PCR pre-TC	3.7 ± 4.4	7.6 ± 11.5	0.135
PCR día 7	2.48 ± 4.96	2.21 ± 3.42	0.85
PCR día 30	2.75 ± 4.99	1.99 ± 2.21	0.514
PCR día 90	1.28 ± 2.63	0.26 ± 0.19	0.176
PCR día 180	0.71 ± 0.88	0.79 ± 1.81	0.895
PCR 1 año	0.76 ± 0.98	0.39 ± 0.55	0.29

Pre-TC: Pre trasplante cardiaco; post-TC: post trasplante cardiac. PCR: Proteína C reactiva.

Tabla 32. Regresión logística de asociación entre alelo B del genotipo del receptor para antagonista de IL-1 con varias variables de resultado clínico

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Infección por CMV tratada durante el primer año	0.794	0.29 – 2.12	0.645
Infección bacteriana tratada durante el primer año	1.43	0.62 – 3.33	0.405
Infección recurrente tratada durante el primer año**	0.923	0.36 – 2.33	0.865
Ventilación mecánica durante el periodo pre-TC	0.89	0.30 – 2.64	0.844
Retrasplante como indicación	3.90	0.42 – 36.37	0.232
Fallo primario del injerto	0.539	0.20 – 1.45	0.221
Rechazo celular	1.93	0.78 – 4.85	0.156
Rechazo celular recurrente	2.85	0.687 – 11.82	0.148
Enfermedad vascular del injerto	1.17	0.43 – 3.14	0.753
Enfermedad vascular	1.39	0.22 – 8.79	0.721
Desarrollo de neoplasia	1.13	0.29 – 4.27	0.858
Muerte	2.31	0.99 – 5.37	0.051

**Incluye infección bacteriana, vírica, fúngica o protozoo. Pre-TC: pre-trasplante cardiaco.

Quisimos ver si algún factor de laboratorio disponible en la base de datos mostraba asociación con la presencia del alelo B mutante y como puede verse en la siguiente tabla (tabla 33) salvo el nivel de IgG3 que es menor en los que tienen este alelo no hubo diferencias significativas en otros parámetros de laboratorio.

Tabla 33. Correlación (diferencia de medias*) entre la presencia del alelo **B** del receptor del antagonista de IL-1 y concentraciones pre-trasplante de parámetros de inmunocompetencia

	Proteínas	Leucocitos	Linfocitos %	IgG mg/dl	IgA mg/dl	IgM mg/dl
Valores	7 vs 7	11.26 vs 7.57	19 vs 20	1082 vs 1185	291 vs 296	108 vs 118
Valor de p	0.989	0.255	0.67	0.57	0.90	0.563

Leucocitos x 1000/uL

	IgG1 mg/dl	IgG2 mg/dl	IgG3 mg/dl	IgG4 mg/dl	C3 mg/dl	C4 mg/dl
Valores	596 vs 677	365 vs 311	44 vs 63	48 vs 47	126 vs 118	22 vs 22
Valor de p	0.357	0.279	0.047	0.927	0.472	0.955

C3 complemento C3, C4 complemento C4

	FB mg/dl	AC S Typhi	Ac Tetanos	Ac PPS	Ac HBs	Ac CMV
Valores	36 vs 36	7,4 vs 7,4	0.71 vs 0.81	12 vs 14	9 vs 78	21 vs 17
Valor de p	0.897	0.655	0.769	0.582	0.121	0.605

Anti-CMV x1000 units; FB factor B; S Typhi Salmonella Typhi; Ac PPS: anticuerpos anti polisacárido de neumococo; Ac HBs: anticuerpos anti antígeno de superficie de hepatitis B; ac CMV: anticuerpos anti-citomegalovirus.

	Ac HIB	Ac VVZ	CD3%	CD3abs	CD4%	CD4abs
Valores	2 vs 2	663 vs 632	76 vs 76	1221 vs 1182	50 vs 49	787 vs 797
Valor de p	0.864	0.749	0.863	0.831	0.825	0.939

abs, recuento absoluto/uL. Ac HIB: anticuerpos anti-hemófilus influenza tipo B; ac VVZ: anticuerpos anti-varicela zóster.

	CD8%	CD8abs	NK%	NKabs	CD19%	CD19abs
Valores	27 vs 26	428 vs 378	10 vs 10	131 vs 164	11 vs 12	172 vs 177
Valor de p	0.863	0.490	0.904	0.307	0.807	0.881

abs, recuento absoluto/uL.

*Prueba T Student o Mann Whitney entre presencia de alelo *B* vs ausencia de alelo *B*, según corresponda.

2.3.1. Alelo *B* y riesgo de muerte asociado

A continuación, en la tabla 34 se muestran variables estadísticamente significativas en su asociación con el desarrollo de muerte durante el seguimiento: Hipertensión arterial pre-trasplante, hipogammaglobulinemia IgG < 600 mg/dl día 7, inducción no citolítica vs citolítica e infección bacteriana tratada el primer año, así como la tendencia antes mencionada de asociación con la presencia del alelo mutado *B*. Las demás no presentan tal significación.

Tabla 34. Regresión logística univariable de variables asociadas a riesgo de muerte post trasplante cardiaco

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Tiempo de seguimiento (por cada mes más)	0.996	0.99 – 1.0014	0.151
Edad, por cada año mas	1.03	0.99 – 1.0854	0.106
Edad > 50 años	1.80	0.67 – 4.841	0.243
Sexo, mujer vs hombre	0.57	0.18 – 1.86	0.351
Etiología de trasplante	0.792	0.61 – 1.02	0.0755
Hipertensión arterial pre-trasplante	3.876	0.99 – 1.0017	0.0039
Hipercolesterolemia pre-trasplante	1.68	0.72 – 3.94	0.229
Insuficiencia renal pre-trasplante (no tener)	1.55	0.46 – 5.19	0.469
Infección pre-trasplante (no tener)	1.11	0.31 – 3.94	0.869
Diabetes pre-trasplante (precisa terapia)	1.08	0.61 – 1.90	0.797
Receptor seronegativo IgG para CMV	1.35	0.68 – 2.65	0.389
Ventilación mecánica pre-trasplante (no usa)	0.89	0.30 – 2.65	0.844
Uso de asistencia ventricular pre-trasplante	0.95	0.69 – 1.29	0.757
Discordancia Receptor IgG CMV (-) D (+)	0.53	0.12 – 2.26	0.387
Tiempo de isquemia (por aumento de minutos)	0.998	0.992 – 1.0046	0.61
Tiempo de circulación extracorpórea (por aumento)	0.999	0.99 – 1.0048	0.67
Re-trasplante (No vs Si)	1.40	0.22 – 8.79	0.72
Inducción no citolítica vs citolítica	0.65	0.43 – 0.986	0.042
Uso de gammaglobulina anti timocitica	2.09	0.57 – 7.71	0.268
Inducción con basiliximab	0.376	0.14 – 1.03	0.058
Fallo primario del injerto	1.13	0.43 – 2.94	0.810
Horas de intubación, por cada hora más	1.0016	0.99 – 1.0051	0.370
Días en la REA, por cada día más	1.01	0.96 – 1.07	0.581
Días en la UCI, por cada día más	1.01	0.96 – 1.07	0.581
Por cada rechazo más en primer año	1.36	0.08 – 23.01	0.83
Rechazo celular durante el primer año	1.26	0.51 – 3.11	0.61
Rechazo celular recurrente el primer año	1.11	0.29 – 4.12	0.88
Diabetes tratada post trasplante	1.19	0.86 – 1.64	0.29
Enfermedad vascular del injerto	2.21	0.82 – 6.01	0.118
Complicación vascular post trasplante	0.59	0.09 – 3.72	0.577
Infección por CMV el primer año	1.02	0.38 – 2.71	0.969
Infección bacteriana tratada el primer año	2.53	1.06 – 5.99	0.035
Desarrollo neoplasia durante todo el seguimiento	3.17	0.751 – 13.33	0.116
Presencia de alelo B en gen antagonista r-IL1	2.31	0.99 – 5.37	0.051
Hipogammaglobulinemia IgG < 600 mg/dl día 7	5.42	1.75 – 16.80	0.0033
Hipocomplementemia C3 día 7	1.60	0.44 – 5.88	0.479

REA: Recuperación post anestésica. UCI: Unidad de cuidados intensivos.

Para ver si alguna de estas variables con tendencia o asociación significativa con riesgo de muerte era independientes tras ajuste multivariable se hicieron los modelos de regresión correspondientes. En la tabla 35 se ve una asociación significativa tras ajuste entre el genotipo alelo *B* de IL1RN con el desarrollo de muerte permaneciendo en el modelo también la hipertensión arterial y la hipogammaglobulinemia temprana del día 7.

Tabla 35. Regresión logística multivariable de variables asociadas a riesgo de muerte post trasplante cardiaco*

Presencia de alelo *B* en genotipo del antagonista R-IL1

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Modelo Univariante			
Presencia de alelo B en genotipo del antagonista R-IL1	2.31	0.99 – 5.37	0.051
Hipogammaglobulinemia día 7 post trasplante	5.42	1.75 – 16.80	0.0033
Hipertensión arterial pre-trasplante	3.876	0.99 – 1.0017	0.0039
Uso de Basiliximab en inducción vs otras	0.376	0.14 – 1.03	0.058
Infección bacteriana tratada el primer año	2.53	1.06 – 5.99	0.035
Modelo Multivariante			
Presencia de alelo B en genotipo del antagonista R-IL1	4.19	1.17 – 15.0086	0.0275
Hipogammaglobulinemia día 7 post trasplante	8.13	2.21 – 29.91	0.0016
Hipertensión arterial pre-trasplante	3.94	1.07 – 14.57	0.0275
Uso de Basiliximab en inducción vs otras	0.272	0.04 – 1.77	0.1732
Infección bacteriana del primer año	0.786	0.199 – 3.10	0.732

*Riesgo de muerte durante todo el seguimiento.

Por la relevancia importante de la variable de resultado que se esta analizando en esta parte de la tesis, y al detectarse dos factores inmunológicos como factor de riesgo decidimos hacer una variable combinada de riesgo considerando la presencia tanto de presencia de alelo *B* mutado como de la hipogammaglobulinemia IgG de día 7. El resultado se observa en la tabla 36. El OR que se alcanza de 9 es mayor que el que aportaban cualquiera de las variables individualmente, lo que apunta a que el uso combinado de biomarcadores suma o añade en la capacidad de detección del riesgo.

Tabla 36. Evaluación de una variable combinada inmunológica de riesgo de muerte

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
Modelo Univariante			
Presencia de alelo B en genotipo del antagonista R-IL1 combinado con hipogammaglobulinemia IgG día 7*	9.32	2.43 – 35.70	0.0011
Hipertensión arterial pre-trasplante	3.876	0.99 – 1.0017	0.0039
Uso de Basiliximab en inducción vs otras	0.376	0.14 – 1.03	0.058
Infección bacteriana del primer año	2.53	1.06 – 5.99	0.035
Modelo Multivariante			
Presencia de alelo B en genotipo del antagonista R-IL1 combinado con hipogammaglobulinemia IgG día 7*	9.28	2.31 – 37.28	0.0017
Hipertensión arterial pre-trasplante	3.24	1.13 – 9.25	0.028
Uso de Basiliximab en inducción vs otras	0.48	0.14 – 1.69	0.255
Infección bacteriana del primer año	1.52	0.52 – 4.43	0.447

*IgG < 600 mg/dL.

Estudio 3. Caracterización cinética de la expresión de TLR2 y TLR4 en distintas subpoblaciones celulares.

3.1. Características clínicas de los pacientes

En este estudio se ha explorado la cinética de expresión de dos proteínas del sistema de presentación de antígenos de la inmunidad innata seleccionando a los TLR2 y TLR4 para su evaluación en distintos tiempos antes y tras el trasplante cardiaco. Dada la complejidad de este estudio el grupo estuvo conformado por solo 30 pacientes con diagnóstico de cardiopatía terminal y que ingresaron para evaluación de trasplante cardíaco (20 masculino, 10 femenino), cuyas características clínicas se exhiben en la tabla 37. Como los otros estudios de cinética de la tesis es un estudio prospectivo realizado antes y después del trasplante cardiaco sin pérdida de seguimiento. Para el seguimiento clínico este se hizo entre el año 2011 hasta el 2022, lo que dio oportunidad para acumular muchos eventos de muerte que luego se analizaron preliminarmente al no tener tamaño suficiente para un análisis completo. Como ya se ha explicado esta cohorte no coincide con las otras por lo que se reanaliza por separado las características clínicas que pueden verse en la siguiente tabla.

Tabla 37. Estudio Celular de Cinética de Receptores Tipo Toll en Trasplante Cardíaco. Características Clínicas

Variables	Frecuencias
Número de pacientes estudiados	30
Tiempo de seguimiento en meses, media (rango intercuartil)	76 (0.5-134)
Edad, media (mínimo y máximo), rango intercuartil	57.3 (20-69), 54-63
Edad > 50 años, número (%)	24 (80)
Hombres, número (%)	20 (66.7)
Etiología de miocardiopatía dilatada, número (%)	24 (80)
Etiología de enfermedad de arteria coronaria, número (%)	2 (6.7)
Etiología de enfermedad valvular, número (%)	3 (10)
Etiología de enfermedad congénita, número (%)	1 (3.3)
Hipertensión arterial pre-trasplante, número (%)	9 (30)
Hipercolesterolemia pre-trasplante, número (%)	11 (36.7)
Insuficiencia renal, número (%)	5 (16.7)
Infecciones pre-trasplante, número (%)	4 (13.3)
Diabetes pre-trasplante tratada con insulina, número (%)	2 (6.7)
Diabetes pre-trasplante tratada con antidiabéticos orales, número (%)	8 (26.7)
Requerimiento de ventilación mecánica, número (%)	7 (23.3)
Asistencia circulatoria por balón, número (%)	4 (13.3)
Asistencia circulatoria por DAV pulsátil, número (%)	7 (23.3)
Donante seronegativo, número (%)	18 (60)
Receptor seronegativo, número (%)	4 (13.3)
Discordancia de serología CMV IgG donante (+), receptor (-)	1 (3.3)
Retrasplante como indicación, número (%)	1 (3.3)
Inducción con gammaglobulina anti-timocito, número (%)	0 (-)
Inducción con daclizumab, número (%)	17 (56.7)
Inducción con basiliximab, número (%)	13 (43.3)
Horas de intubación, media (rango intercuartil)	136.6 (20-120)
Tiempo de isquemia, minutos, media (rango intercuartil)	259.4 (213-322)
Tiempo de circulación extracorpórea, minutos, media (rango intercuartil)	157.5 (116-172)
Fallo primario del injerto, número (%)	11 (36.7)
Rechazo celular, número (%)	7 (23.3)
Rechazo celular recurrente, número (%)	0 (-)
Enfermedad vascular del injerto, número (%)	8 (26.6)
Infección por CMV primeros 12 meses, número (%)	5 (16.7)
Infección bacteriana primeros 12 meses, número (%)	12 (40)
Infección recurrente primeros 12 meses, número (%) *	8 (26.6)
Diabetes post trasplante tratada con dieta, número (%)	4 (13.3)
Diabetes post trasplante tratadas con antidiabéticos orales, número (%)	4 (13.3)
Diabetes post trasplante tratadas con insulina, número (%)	4 (13.3)
Díalisis post trasplante, número (%)	1 (3.3)
Neoplasia, número (%)	1 (3.3)
Muerte post trasplante a lo largo del todo el seguimiento, número (%)	15 (50)
Muerte de primer año, número (%)	9 (30)
Hipogammaglobulinemia día 7 < 600 mg/dl	13 (43.3)
Hipocomplementemia día 7 C3 < 80 mg/dl	8 (26.6)

3.2. Expresión de TLR2 y TLR4 en distintas subpoblaciones celulares

Para comprobar la conveniencia del uso de las MFI en relación con otras unidades de medida a manera de ejemplo se muestran las correlaciones entre porcentajes, MFI y otra unidad calculada ajustada (ratio MFI). Se muestran los Coeficientes de Correlación de Spearman's para el caso de TLR2 sobre CD mieloides y plasmacitoides (tabla 38).

Tabla 38. Coeficiente de correlación de Spearman's para TLR2 sobre CDm y CDp

	Porcentaje	Ratio MFI
TLR2 en CD mieloides		
MFI	0.764 ($p < 0.0001$)	0.694 ($p < 0.0001$)
TLR 2 en CD plasmacitoides		
MFI	0.648 ($p = 0.004$)	0.721 ($p < 0.0001$)

El posible uso de la ratio de MFI se valoró debido a que los TLRs se expresan de forma pleiotrópica en la membrana celular, por lo que se puede corregir la autofluorescencia emitida al incidir el haz de luz fluorescente con los componentes proteicos constitutivos del receptor, para ello hemos utilizado además del tubo correspondiente a cada TLR conjugado con su respectivo fluorocromo, otro tubo sin anticuerpo, fluorescence Minus One (FMO)²⁸⁴⁻²⁸⁷ para establecer la ratio entre las medianas de MFI de cada uno de los tubos (con y sin marcaje); y así determinar el umbral a partir del cual se cuantifica la intensidad de expresión del receptor de estudio (TLR2/TLR4). Al final se decidió utilizar la información directa de MFI en los análisis, tal como se ha hecho en otros trabajos, y tras verificar que había buena correlación (figura 43).

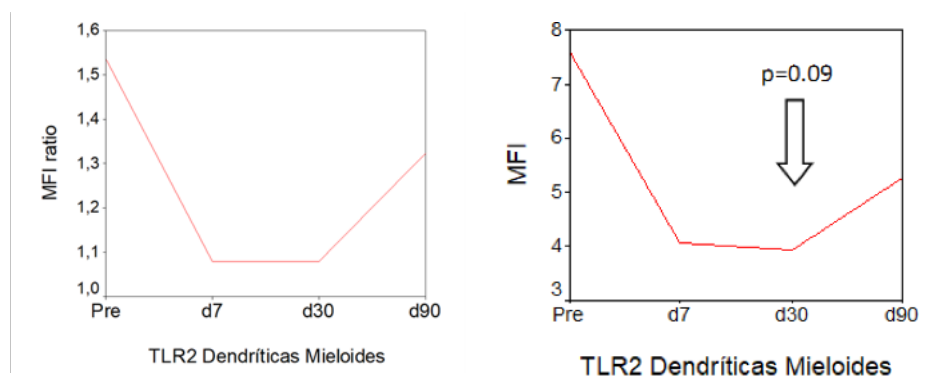


Figura 43. Comparativa de la cinética de células dendríticas mieloides que expresan TLR2 (Unidades en ratio MFI versus MFI)

3.2.1 Expresión basal de TLR2

En la siguiente figura se puede apreciar la expresión del receptor de reconocimiento de patrones TLR2 sobre las distintas subpoblaciones estudiadas. Se observaron mayores MFI en células dendríticas y en monocitos que en linfocitos B, NK y CD8 como era esperable.

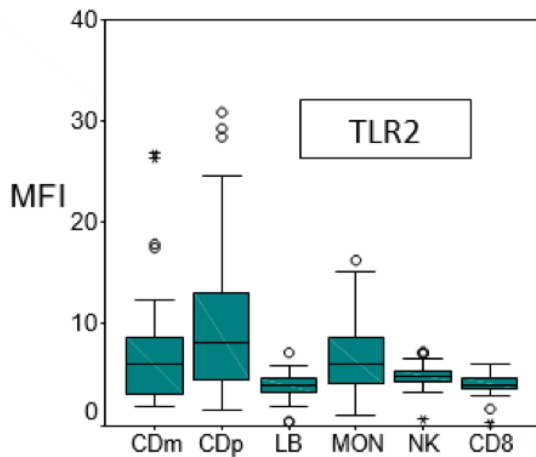


Figura 44. Expresión pre-trasplante de TLR2 en distintas subpoblaciones mononucleares

Leyenda y comentarios a la figura: CDm células dendríticas mieloides; CDp células dendríticas plasmocitoides; LB linfocitos B; MON monocitos, NK células natural killer; CD8 células T CD8+; MFI intensidad media de fluorescencia en citometría de flujo. * Valores extremos. °Valores fuera de rango.

3.2.2. Expresión basal de TLR4

Otros de los receptores de reconocimientos de patrón estudiados fue el TLR4. En la siguiente figura se puede apreciar la expresión de TLR4 sobre las distintas subpoblaciones estudiadas predominando, como también era esperable, mayores MFI en células dendríticas mieloides y plasmocitoides.

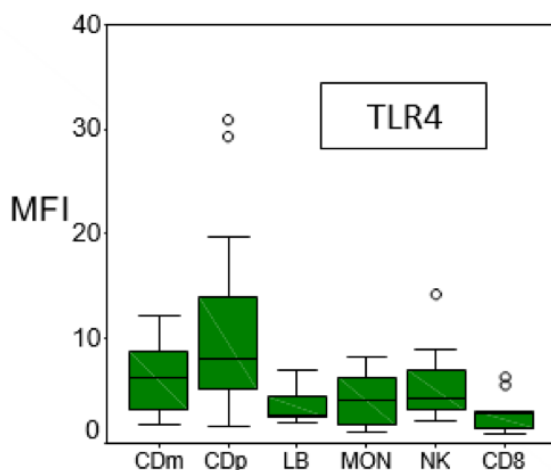


Figura 45. Expresión pre-trasplante de TLR4 en distintas subpoblaciones mononucleares.

* Valores extremos. °Valores fuera de rango.

Leyenda y comentarios a la figura: CDm células dendríticas mieloides; CDp células dendríticas plasmocitoides; LB linfocitos B; MON monocitos, NK células natural killer; CD8 células T CD8+; MFI intensidad media de fluorescencia en citometría de flujo.

3.2.3. Cinética de expresión de TLR2 y TLR4 en distintas subpoblaciones en distintos tiempos post TC.

Para estudiar el posible papel de la inmunidad innata en la respuesta aloimmune, inflamatoria o antiinfecciosa temprana después del trasplante cardíaco, se estudió la intensidad media de fluorescencia (MFI), de la expresión de TLR-2 y TLR-4 en células dendríticas mieloides y plasmocitoides circulantes, monocitos CD14+, células B CD19+, Células NK CD56+/CD16+ y células T CD8+ de pacientes antes el TC y a los días 7, 30 y 90 después del trasplante cardíaco (figura 46). No tenemos conocimiento de otros trabajos describiendo algo similar, por lo que no tenemos referencia en este caso.

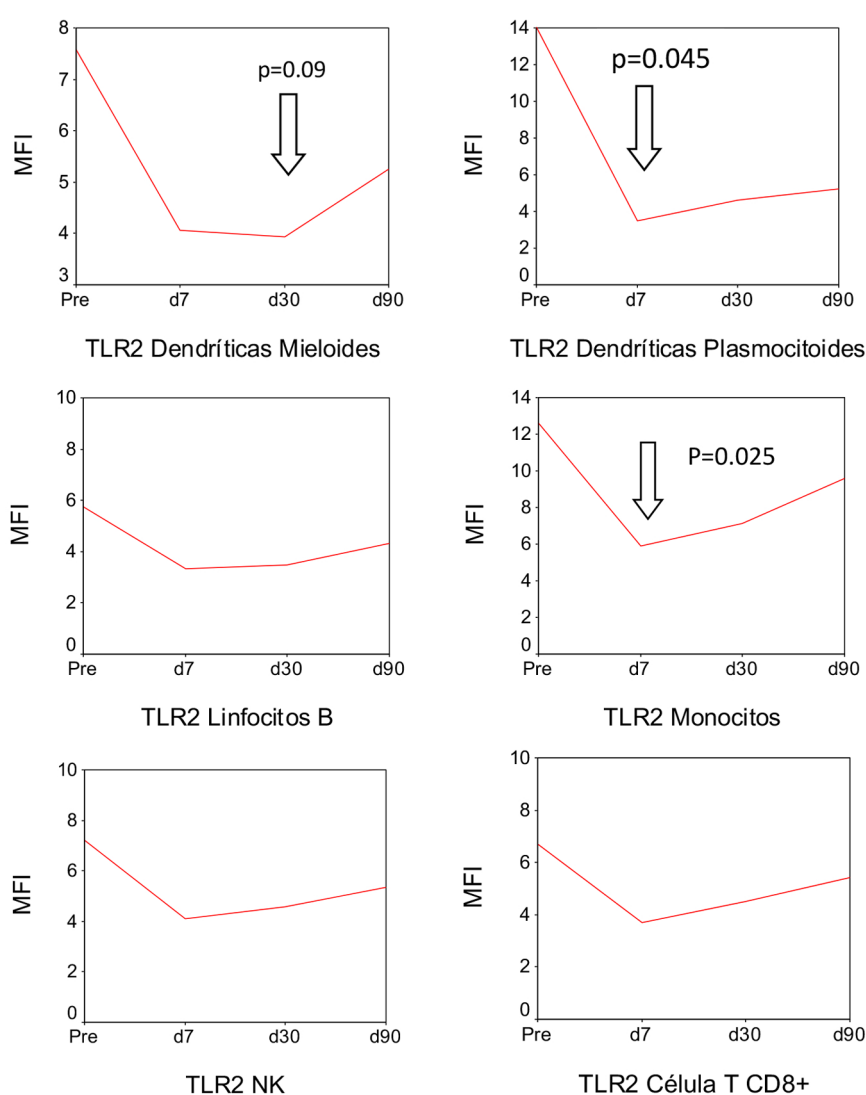


Figura 46. Cinética de Receptores Tipo Toll 2 en distintas subpoblaciones en trasplante cardíaco

Los resultados iniciales mostraron que la expresión de TLR-2 disminuyó en comparación con el basal pre-trasplante en todas las poblaciones estudiadas siendo significativo el cambio a día 7 en el caso de células dendríticas plasmocitoides y monocitos y con tendencia estadística a día 30 para dendríticas mieloides.²²⁴

Por el contrario, la expresión de TLR-4 experimentó un aumento significativo relativo al estudio pretrasplante a los 90 días para células dendríticas mieloides y mostró tendencia significativa a día 7 para monocitos y a día 90 para células NK.

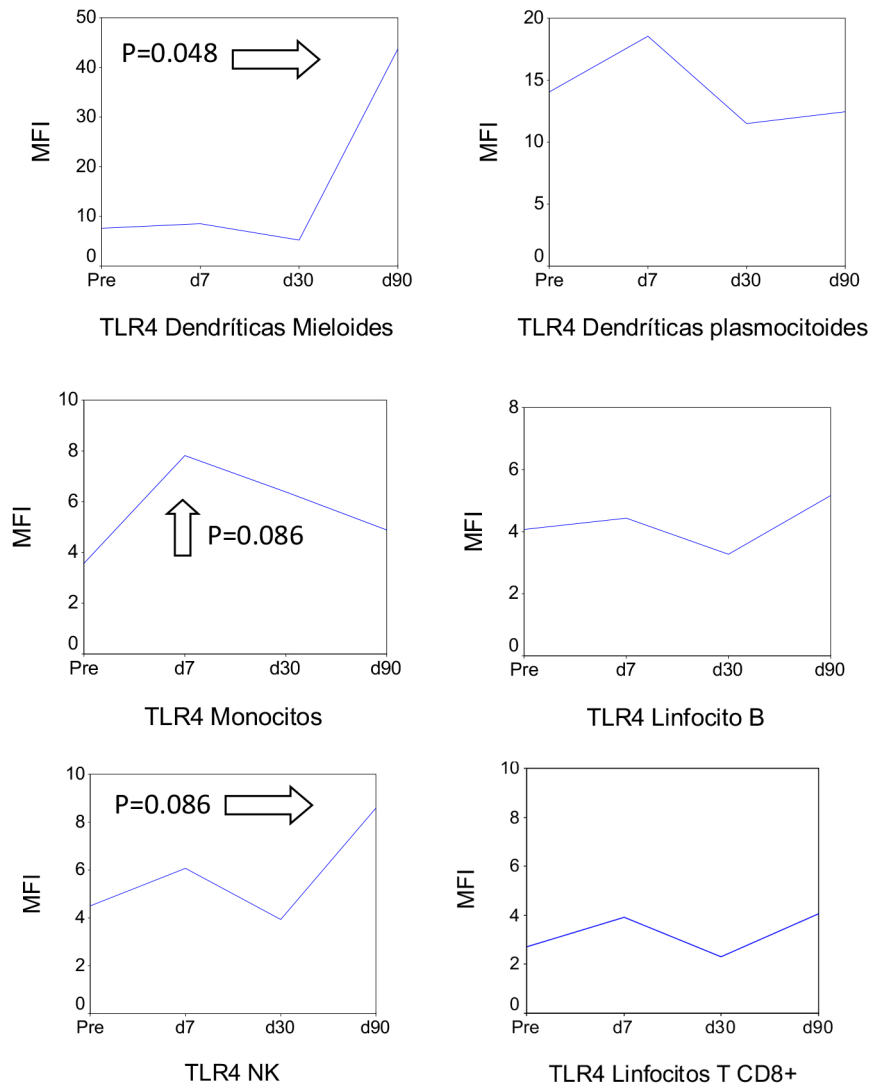


Figura 47. Cinética de Receptores Tipo Toll 4 en distintas subpoblaciones en trasplante cardíaco

3.2.4 Expresión de TLR2 y TLR4 en TC frente a controles sanos.

Ante la falta de referencias de los valores de expresión de TLRs en trasplantados hicimos una comparación de los valores basales de un grupo de 41 controles sanos con edad y sexo similar a la cohorte trasplantada. Ver las siguientes figuras (48,49).

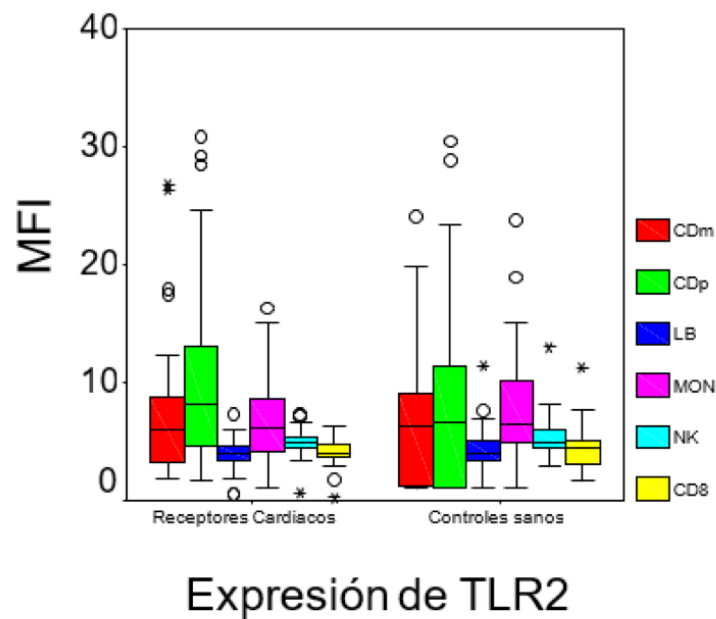


Figura 48. Comparación de expresión de TLR2 con controles sanos

Leyenda y comentarios a la figura: CDm células dendríticas mieloides; CDp células dendríticas plasmocitoides; LB linfocitos B; MON monocitos, NK células natural killer; CD8 células T CD8+; MFI intensidad media de fluorescencia en citometría de flujo. * Valores extremos. °Valores fuera de rango. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de MFI de receptores cardiacos (n 30) y controles sanos (n 41).

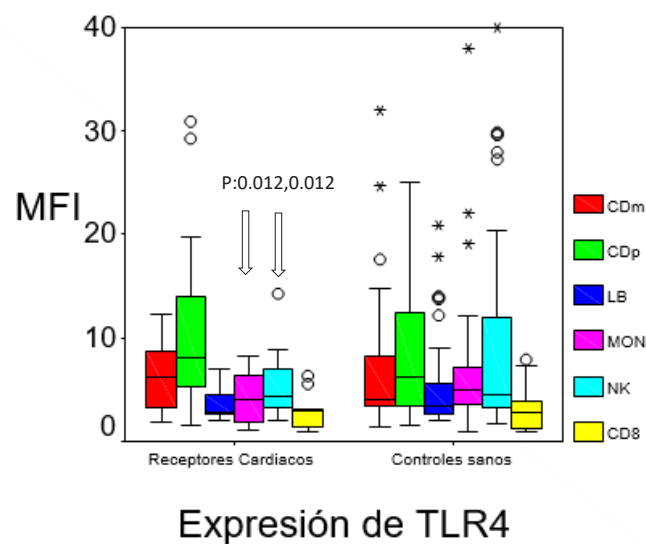


Figura 49. Comparación de expresión de TLR4 con controles sanos.

Leyenda y comentarios a la figura: CDm células dendríticas mieloides; CDp células dendríticas plasmocitoides; LB linfocitos B; MON monocitos, NK células natural killer; CD8 células T CD8+; MFI intensidad media de fluorescencia en citometría de flujo. * Valores extremos. °Valores fuera de rango.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de MFI de receptores cardiacos (n 30) y controles sanos (n 41). Los pacientes receptores cardiacos, evaluados en el momento de inclusión de lista de evaluación para trasplante por tener una patología terminal muestran valores menores de MFI de TLR4 sobre monocitos y células NK.

3.2.4. Posible implicación clínica

En un análisis univariable preliminar generador de hipótesis, ya que el tamaño muestral alcanzado para este estudio no permitía formalmente inferencia estadística completa como si se ha hecho en otras partes de esta tesis, se hizo un modelo de asociación de potenciales factores de riesgo asociados a muerte post TC (tabla 39).

Tabla 39. Regresión logística univariable de variables asociadas a riesgo de muerte post trasplante cardiaco

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
TLR2 sobre CDM en día 90 por cada aumento de MFI	1.59	0.97 – 2.61	0.063
TLR2 sobre CDP en día 90 por cada aumento de MFI	1.26	0.98 – 1.61	0.061
TLR4 sobre CDM en día 90 por cada aumento de MFI	2.65	0.86 – 8.18	0.089
Edad, por cada año mas	0.96	0.89 – 1.04	0.344
Edad > 50 años	0.42	0.065 – 2.766	0.369
Sexo, mujer vs hombre	1.00	0.22 – 4.56	1.00
Etiología de trasplante	1.0041	0.99 – 1.01	0.43
Hipertensión arterial pre-trasplante	1.53	0.31 – 7.44	0.599
Hipercolesterolemia pre-trasplante	1.11	0.24 – 5.14	0.893
Insuficiencia renal pre-trasplante (no tener)	0.62	0.08 – 4.34	0.626
Infección pre-trasplante (no tener)	0.29	0.02 – 3.12	0.304
Diabetes pre-trasplante (precisa terapia)	2.0059	0.66 – 6.12	0.222
Receptor seronegativo IgG para CMV	3.50	0.32 – 38.23	0.304
Ventilación mecánica pre-trasplante (no usa)	0.11	0.01 – 1.04	0.055
Uso de asistencia ventricular pre-trasplante	1.65	0.97 – 2.82	0.065
Tiempo de isquemia (por aumento de minutos)	1.0027	0.992 – 1.0136	0.63
Tiempo de circulación extracorpórea (por aumento)	1.0035	0.99 – 1.017	0.62
Fallo primario del injerto	4.57	0.90 – 23.14	0.06
Horas de intubación, por cada hora más	1.0019	0.99 – 1.0064	0.419
Días en la UCI, por cada día más	0.99	0.92 – 1.07	0.844
Rechazo celular durante el primer año	0.69	0.13 – 3.79	0.66
Infección por CMV el primer año	0.19	0.02 – 2.02	0.171
Infección bacteriana tratada el primer año	6.87	0.93 – 50.78	0.058
Infección bacteriana recurrente tratada el primer año	9.59	0.85 – 108.71	0.067

Así pues, en la figura 50 se puede ver que los pacientes fallecidos mostraron MFI más elevadas de TLR2 sobre células dendríticas mieloides y plasmocitoides y también sobre linfocitos B que los pacientes que sobrevivieron durante el seguimiento retrospectivo realizado. Se recuerda en este punto que los biomarcadores no se recuperaron de historia clínica al no ser rutina, sino que fueron parte de un seguimiento prospectivo realizado antes y como parte de esta tesis hasta completar los 30 pacientes. A su vez la expresión de TLR4 sobre células dendríticas mieloides resultó también más elevado en pacientes que fallecieron post trasplante.

En un modelo de regresión logística exploratoria (tabla 39) se observa que por cada unidad de aumento de MFI de TLR2 sobre células dendríticas mieloides o plasmocitoides a día 90 o de TLR4 sobre células dendríticas mieloides en el mismo tiempo el riesgo de muerte aumentó con una clara tendencia significativa (3 primeras filas de la tabla 39) siendo mayor esta para TLR4 sobre células dendríticas mieloides a día 90.

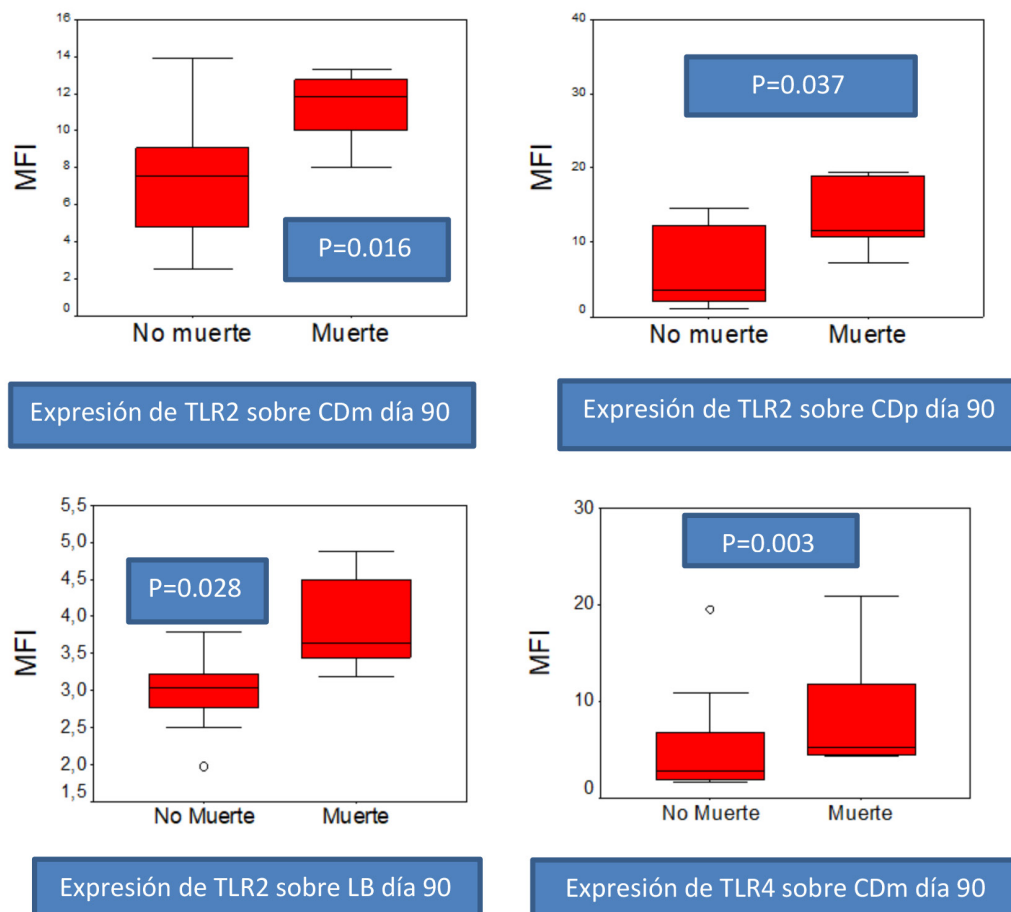


Figura 50. Asociación entre fenotipo de expresión de TLR2 y 4 en varias subpoblaciones en pacientes trasplantados cardíacos con resultado de muerte post trasplante. *Valores extremos. °Valores fuera de rango.

Legenda y comentarios a la figura 51: TLR Receptores tipo Toll; CDm células dendríticas mieloides; CDp células dendríticas plasmocitoides; LB linfocitos B; MFI intensidad media de fluorescencia en citometría de flujo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de MFI de TLR 2 y 4 de distintas subpoblaciones evaluadas en receptores cardíacos que fallecieron post trasplante frente a supervivientes. Se hizo seguimiento prospectivo para llenar la BD, el análisis ha sido retrospectivo. *Valores extremos. °Valores fuera de rango.

3.2.5. Cinética de células dendríticas en trasplante cardiaco

Como aportación para futuras investigaciones que se hagan sobre células dendríticas en pacientes trasplantados cardiacos en la siguiente figura 51, se representan los cambios observados en células dendríticas totales, células dendríticas mieloides y plasmocitoides. Destaca el descenso significativo del porcentaje de estas células en el periodo inmediato (día 7) tras el trasplante.

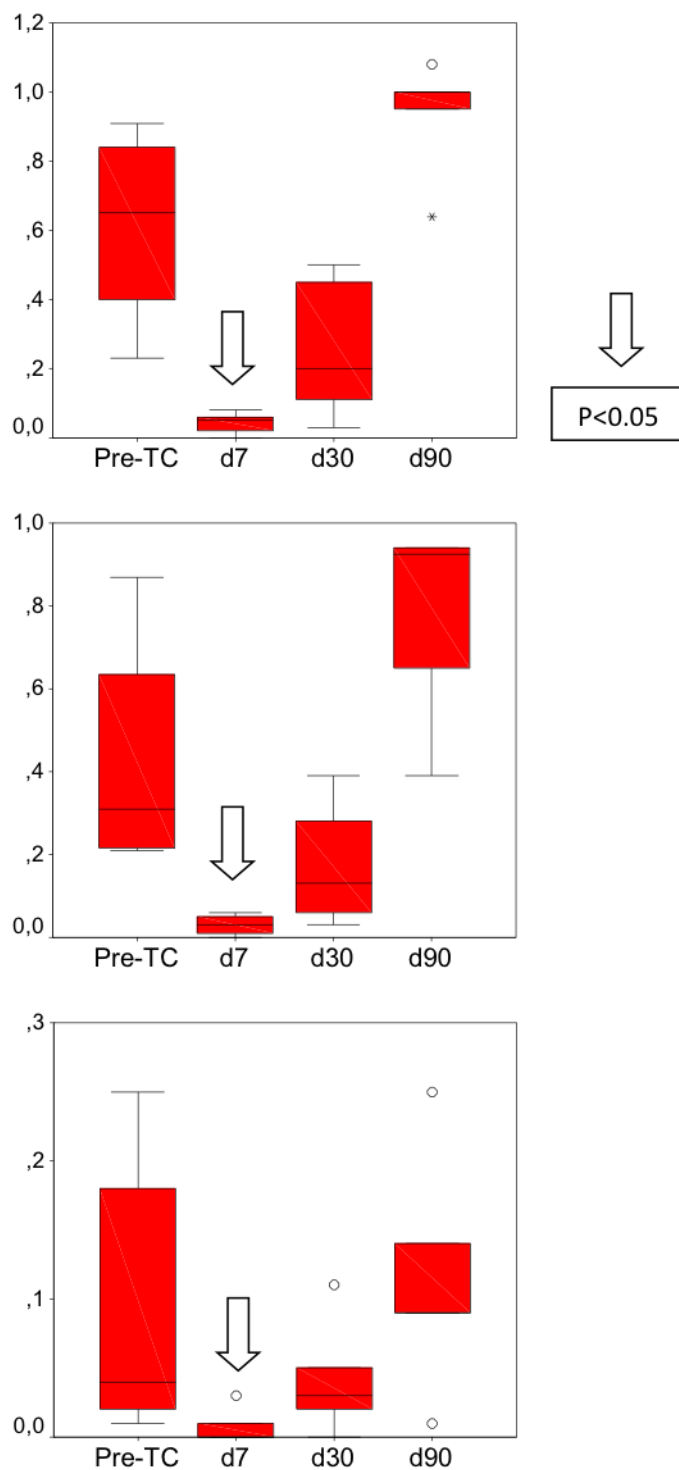


Figura 51. Cinética de células dendríticas tras el trasplante cardiaco. *Valores extremos. °Valores fuera de rango.

Estudio 4. Cinética de subpoblaciones activadas de monocitos y su correlación clínica con variables clínicas.

En este último estudio de la tesis se seleccionaron subpoblaciones activadas de monocitos CD14+CD38+DR+ y CD14+DR+ como otro componente de la inmunidad innata. Como en anteriores estudios la cinética es prospectiva, en fase posterior se completa seguimiento con revisión retrospectiva de historia electrónica y se busca si hay asociación con distintas variables clínicas. El tamaño muestral alcanzado fue de 95 pacientes estudiados con los biomarcadores y el seguimiento clínico acumulado desde 2011 hasta 2022. Las características clínicas de los pacientes se exhiben en la siguiente tabla 40.

Tabla 40. Estudio Celular de Cinética de Monocitos Activados en Trasplante Cardíaco. Características Clínicas

Variables	Frecuencias
Número de pacientes estudiados	95
Tiempo de seguimiento en meses, media (rango intercuartil)	71 (2.7-115)
Edad, media (mínimo y máximo), rango intercuartil	55.3 (20-70), 50-63
Edad > 50 años, número (%)	70 (73.7)
Hombres, número (%)	66 (69.5)
Etiología de miocardiopatía dilatada isquémica, número (%)	35 (36.8)
Etiología de miocardiopatía dilatada idiopática, número (%)	21 (22.1)
Peso del receptor, media (rango intercuartil, kg)	72 (62-82)
Índice de masa corporal, media (rango intercuartil)	26 (23-29)
Hipertensión arterial pre-trasplante, número (%)	41 (43.2)
Hipercolesterolemia pre-trasplante, número (%)	40 (42.1)
Insuficiencia renal, número (%)	19 (20)
Infecciones pre-trasplante, número (%)	11 (11.6)
Diabetes pre-trasplante	26 (27.4)
Ventilación mecánica (%)	13 (13.7)
Asistencia circulatoria (%)	34 (35.8)
Receptor seronegativo, número (%)	14 (14.7)
Retrasplante como indicación, número (%)	3 (3.1)
Horas de intubación, media (rango intercuartil)	144.5 (12-120)
Tiempo de isquemia, minutos, media (rango intercuartil)	236.4 (180-275)
Tiempo de circulación extracorpórea, minutos, media (rango intercuartil)	172.5 (130-200)
Fallo primario del injerto, número (%)	41 (43.6)
Rechazo celular, número (%)	12 (12.9)
Días en UCI, media (rango intercuartil)	16.2 (5-20)
Infección por CMV primeros 12 meses, número (%)	12 (13.2)
Infección bacteriana recurrente primeros 12 meses, número (%)	28 (30.1)
Infección bacteriana primeros 12 meses, número (%)*	55 (59.1)
Muerte post-trasplante a lo largo del todo el seguimiento, número (%)	34 (35.8)

En la figura 52 podemos observar la cinética de expresión monocitaria de HLA-DR, así como la fig. 53 muestra la expresión en monocitos de CD 38 y HLA-DR; observándose en los dos casos un descenso significativo a los 7 días post TC. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en los otros puntos de estudio analizados.

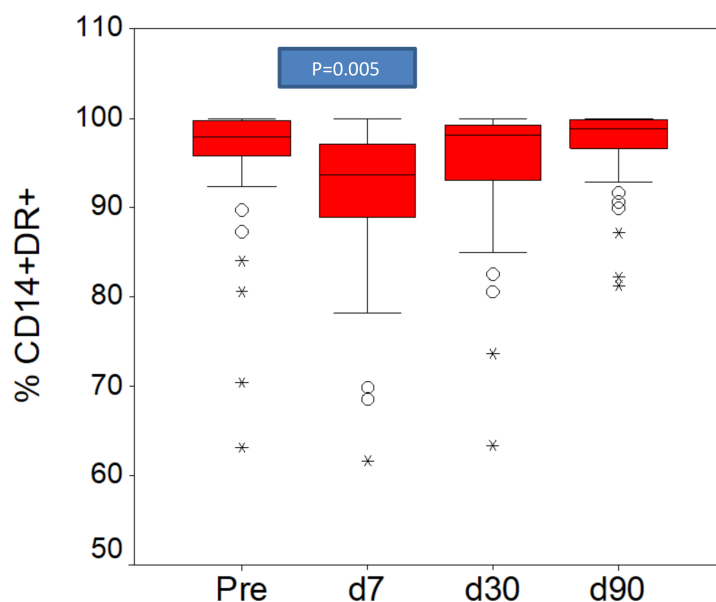


Figura 52. Cinética de expresión de HLA-DR en monocitos.

*Valores extremos. °Valores fuera de rango.

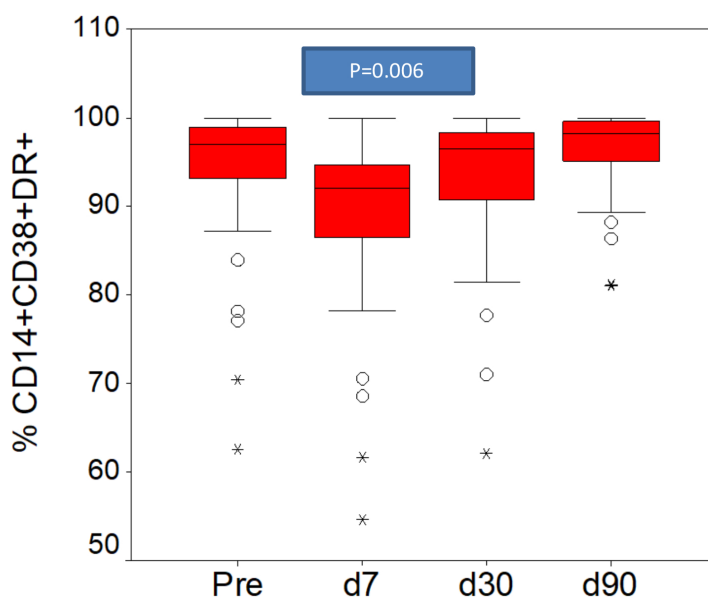


Figura 53. Cinética de expresión de CD38 y HLA-DR en monocitos.

*Valores extremos. °Valores fuera de rango.

Al estudiar la presencia de infección se observó que tanto las infecciones bacterianas, así como las infecciones bacterianas recurrentes, la incidencia era mayor en pacientes en los que el porcentaje de células que expresaban HLA-DR y CD38 era menor a los 7 días post-TC (figuras 54-57).

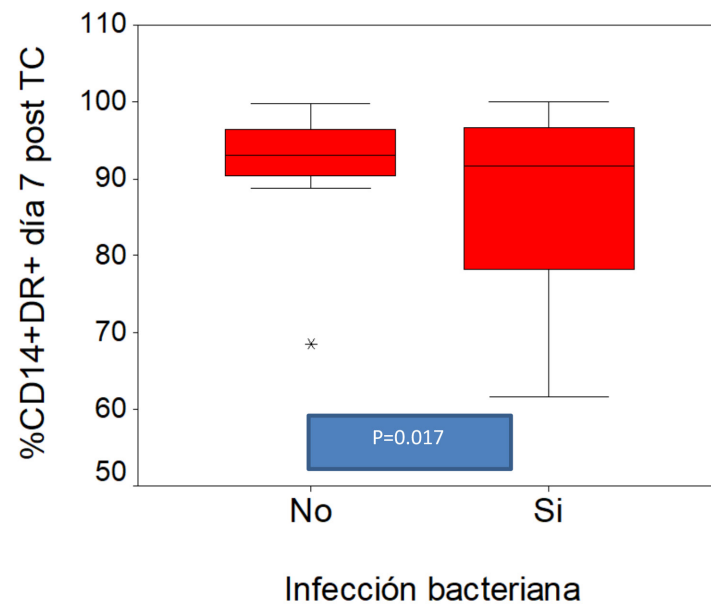


Figura 54. Asociación de infección bacteriana en monocitos HLA-DR

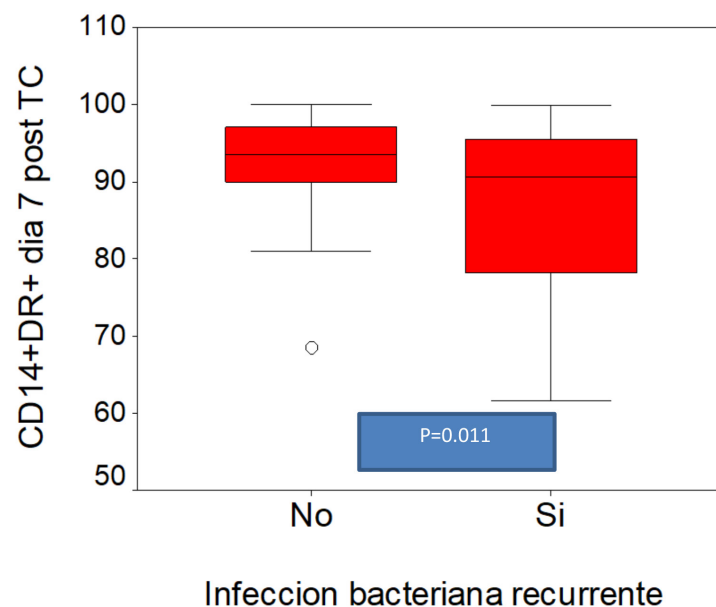


Figura 55. Asociación de infección bacteriana recurrente en monocitos HLA-DR.

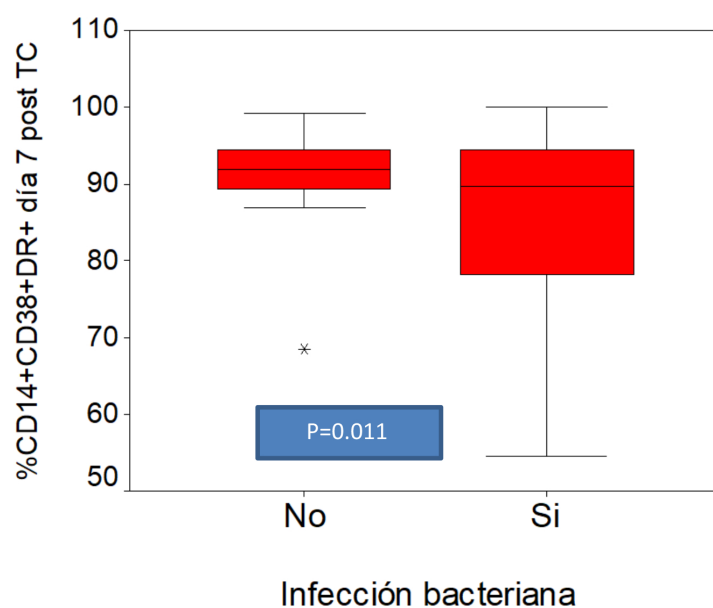


Figura 56. Asociación de infección bacteriana en monocitos CD38 y HLA-DR.

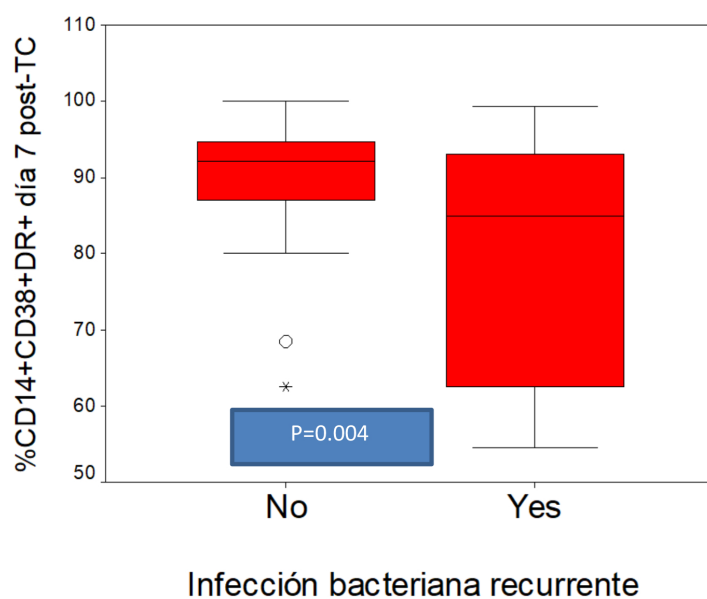


Figura 57. Asociación de infección bacteriana recurrente en monocitos CD38 y HLA-DR.

Posteriormente se hizo un análisis de regresión logística para ver la asociación con complicaciones clínicas (Tabla 41). Las 2 subpoblaciones de monocitos activadas se asociaron con riesgo de desarrollo de infección bacteriana recurrente. Como covariables clínicas de riesgo estaban el tiempo de intubación, tiempo en UCI y la presencia de infección CMV. En el modelo multivariable solo el tiempo de intubación fue independiente.

Tabla 41. Regresión logística univariable de variables asociadas a riesgo de infección bacteriana recurrente post trasplante

Variables	OR	IC 95%	Valor de p
%CD14+DR+ a día 7 post-TC por cada unidad que baja	1.06	1.01 – 1.109	0.016
%CD14+CD38+DR+ a día 7 post-TC por cada unidad que baja	1.07	1.017 – 1.118	0.008
Edad, por cada año mas	1.03	0.98 – 1.07	0.173
Edad > 50 años	1.90	0.62 – 5.74	0.254
Sexo, mujer vs hombre	0.90	0.34 – 2.38	0.832
Peso, por cada unidad de peso que aumente (Kg)	0.99	0.96 – 1.02	0.586
Índice de masa corporal, por cada aumento de unidad	0.99	0.89 – 1.11	0.95
Etiología de trasplante	1.0004	0.996 – 1.004	0.846
NYHA, por cada unidad que empeora	1.15	0.697 – 1.91	0.577
Hipertensión arterial pre-trasplante	1.85	0.75 – 4.52	0.179
Hipercolesterolemia pre-trasplante	1.50	0.62 – 3.66	0.373
Insuficiencia renal pre-trasplante	1.47	0.51 – 4.25	0.474
Infección pre-trasplante (no tener)	0.85	0.21 – 3.49	0.827
Diabetes pre-trasplante	1.34	0.51 – 3.52	0.556
Receptor seronegativo IgG para CMV	1.04	0.29 – 3.69	0.955
Ventilación mecánica pre-trasplante	1.04	0.29 – 3.69	0.955
Uso de asistencia ventricular pre-trasplante	1.26	0.51 – 3.16	0.615
Tiempo de isquemia (por aumento de minutos)	0.996	0.991 – 1.0025	0.266
Tiempo de circulación extracorpórea (por aumento)	0.998	0.991 – 1.0057	0.706
Fallo primario del injerto	1.500	0.62 – 3.658	0.372
Horas de intubación, por cada hora más	1.0023	1.0001 – 1.0045	0.044
Días en la UCI, por cada día más	1.0465	1.01 – 1.08	0.0056
Rechazo celular durante el primer año	2.68	0.78 – 9.20	0.116
Infección por CMV el primer año	2.22	1.08 – 4.57	0.03
Diabetes tratada post-trasplante	1.16	0.76 – 1.778	0.482

The background of the slide features a dark blue gradient. On the right side, a DNA double helix is depicted, with one strand highlighted in orange and red. Scattered across the left and bottom areas are several translucent, light blue circular shapes that resemble cells or nuclei, each with a darker blue center.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Estudio 1

El período posterior al trasplante se considera una fase crítica durante la cual las infecciones pueden causar enfermedades y tener efectos perjudiciales en el huésped, prolongación de estancias, elevado coste por uso de antimicrobianos, resistencias a antibacterianos y a antivirales, elevada morbilidad y riesgo de muerte.

Como ya se ha significado antes en esta tesis la inmunidad innata ha sido poco explorada en cuanto a su potencial rol como biomarcador, de allí que esta tesis trata de aportar información novedosa en trasplante cardíaco seleccionando varios protagonistas de la respuesta inmunitaria innata.

En cuanto a la cinética de MBL sérica, los pacientes trasplantados cardíacos mostraron concentraciones más bajas de MBL en todos los puntos de estudio, desde el pre-trasplante hasta el mes post trasplante en comparación con controles sanos. De entrada, este dato habla de que la cardiopatía terminal podría ir asociada a concentraciones más bajas por distintas razones. En relación con el estudio basal pre-trasplante se produce un descenso que tiende a ser significativo al mes post trasplante, de allí que la concentración de MBL a día 30 puede ser clave en la predisposición al riesgo de infección.

Fuimos capaces de demostrar una buena correlación entre las concentraciones séricas de MBL y los genotipos de MBL asociados al nivel de producción de esta proteína. Así los pacientes con genotipo de producción baja tuvieron coherentemente niveles muy bajos en suero.

En la búsqueda de una asociación entre las concentraciones séricas de MBL o del genotipo MBL e infección, hay experiencias previas como un estudio que relacionó la infección por CMV con la deficiencia de MBL en trasplante. Este estudio involucró a sólo 16 receptores de riñón con un estado serológico de alto riesgo para CMV (D+/R-). Oriol M et al observaron que los pacientes con concentraciones séricas bajas de MBL tenían una incidencia significativamente mayor de infección por CMV²²⁵. Es una primera evidencia que la suma de inmunidad adaptativa de riesgo (seronegativo) con déficit de inmunidad innata puede suponer un riesgo. En el trasplante hepático, de Rooij et al, describieron que los pacientes que recibieron hígados de donantes deficientes en *MBL2* tenían un mayor riesgo de infección por CMV en comparación con los que recibieron un hígado de tipo salvaje⁵⁷. Como estos trabajos no incluyeron receptores de corazón nuestra tesis era una oportunidad para verificar si estas asociaciones también se producen en el trasplante cardíaco. Los resultados antes expuestos de correlación entre concentración baja de MBL y desarrollo de infecciones están de acuerdo con nuestros hallazgos en receptores de corazón. El presente estudio es el primero de diseño prospectivo desarrollado para evaluar una relación entre las concentraciones séricas de MBL con el riesgo de desarrollar infecciones graves y muestra una asociación entre concentraciones séricas más

bajas de MBL con desarrollo de CMV en receptores de corazón. Esto sugiere que la evaluación de la concentración sérica de MBL fue una herramienta útil para el control inmunológico en los receptores de corazón evaluados para detectar el riesgo de CMV.

Si se validan estos resultados, la determinación del fenotipo podría ser un biomarcador fiable para estratificar a los pacientes y finalmente seleccionar receptores de corazón para una profilaxis anti-CMV prolongada. Los estudios futuros que evalúen pacientes trasplantados con antecedentes clínicos de CMV o infecciones recurrentes pueden ser útiles para respaldar el manejo agresivo en pacientes con concentraciones reducidas de MBL.

Asociación entre genotipos de MBL e infección

Los trasplantes de hígado de un donante con una variante del genotipo *MBL2* exón 1 sufren infecciones bacterianas más graves y fatales después de la cirugía²²⁶. Como se describió recientemente, los receptores de trasplante hepático deficientes en MBL tienen un mayor riesgo de infección bacteriana, neumonía, shock séptico y mortalidad relacionada con la infección bacteriana al cabo de 1 año después del trasplante¹⁸⁶. Más recientemente, Fernández-Ruiz et al. del equipo de infecciosas del Hospital 12 de octubre de Madrid, realizaron un metanálisis que incluyó 11 estudios (con 1858 pacientes), en los que los receptores de trasplante hepático representaron el 80,4% de la población acumulada. Estos autores observaron que, en comparación con los haplotipos de alta expresión de MBL, cualquier haplotipo deficiente en MBL se asoció con un mayor riesgo de infecciones bacterianas y fúngicas posteriores al trasplante. Los haplotipos de expresión baja/nula de MBL también aumentaron el riesgo de eventos de CMV¹⁸⁵. En un estudio multicéntrico realizado por Bodro et al en 2022, los genotipos responsables de concentraciones bajas de MBL se asociaron con un mayor riesgo de infección y enfermedad por CMV en TOS³⁰.

La relación entre MBL e infección por CMV ha ofrecido también resultados contradictorios en otros estudios realizados en trasplante de órgano sólido. Cervera et al sugirieron que la presencia de un haplotipo AA de tipo salvaje en el exón 1 se asoció con una mayor incidencia de enfermedad invasiva por CMV que en los haplotipos A/O u O/O (36 % frente a 9 % respectivamente) en comparación con la presencia de síndrome viral por CMV, en un grupo corto de 45 pacientes trasplantados incluyendo (22 renales, 7 simultáneos riñón-páncreas, 11 hepáticos y tan sólo 5 cardíacos, lo que limita cualquier inferencia de este trabajo para este último órgano)²²⁷. Bodro et al. sugiere que el genotipado de MBL debería realizarse en el donante en los receptores hepáticos, teniendo en cuenta que esta proteína es sintetizada por el hígado³⁰.

Al igual que lo ocurrido y comentado antes sobre la práctica ausencia de datos de correlación entre fenotipo MBL en receptores cardíacos con riesgo de infección, ocurre lo mismo a en relación con el genotipo de MBL en este órgano. Nuestro análisis retrospectivo mostró también una asociación entre genotipo de baja e intermedia producción de MBL con riesgo de infección por CMV en comparación con individuos con genotipo de alta producción. Dado que como hemos mostrado antes existe una

buena correlación genotipo fenotipo para MBL, el valor añadido del genotipo es su atemporalidad, lo que supone que ya desde antes del trasplante podemos saber que receptor cardiaco es de más riesgo para desarrollar CMV.

De especial interés ha sido que el factor de riesgo clásico D+R- no fue un factor de riesgo en nuestro estudio, lo cual da mayor impacto al hallazgo de las correlaciones encontradas entre genética y fenotipo MBL y riesgo de infección CMV.

¿Pero porqué puede ser esta asociación? Varios estudios han investigado el papel de MBL en el control de la infección por CMV. Wu et al, sugirieron que MBL puede inhibir la invasión de CMV a las células huésped²²⁸. Es probable que la inhibición se deba a la interacción del dominio de reconocimiento de carbohidratos de la MBL con las glicoproteínas de la cubierta del CMV²²⁸. Además, varios mecanismos de interacción propuestos por Van Breedam et al, incluyeron el papel de las lectinas del huésped solubles y asociadas a la membrana que podrían estar implicadas en la defensa antiviral al unirse los glicanos asociados al virión con las lectinas del huésped asociadas a la membrana que conducen a la absorción, degradación y presentación del virus a las células del sistema inmune adaptativo²²⁹.

Según la opinión de los expertos, la replicación y/o infección por CMV es una complicación común después del trasplante de órgano sólido y la infección tardía por CMV sigue siendo un problema importante. De allí que identificar un perfil genómico de riesgo resulta de interés al ser un estudio que no es dependiente del tiempo de estudio tal como hemos significado antes^{30,180}.

La actividad de MBL depende de la presencia de formas altamente oligoméricas y esto podría ser una posible limitación de la prueba ELISA en suero. Por lo tanto, el genotipado de *MBL2* podría ser un mejor enfoque clínico antes del trasplante. Por otro lado, sin embargo, el ELISA de suero MBL podría ser más fácil de introducir en centros sin instalaciones de pruebas genéticas. Además, dado que la terapia de reconstitución de MBL se ha explorado como un nuevo enfoque potencial para el tratamiento de ciertos pacientes inmunocomprometidos, la terapia guiada por las concentraciones séricas de MBL podría ser necesaria para una mejor selección de esta herramienta terapéutica en el futuro^{230,231,232,233}. Hay que tener en cuenta que cualquier biomarcador que sea susceptible de modulación terapéutica adquiere un mayor interés en su validación hasta el final.

La alta prevalencia de deficiencia de MBL en población sana lleva a opiniones contradictorias sobre si se debe considerar una inmunodeficiencia primaria o no. Sin embargo, parece claro que, en entornos clínicos inmunosupresores, estos factores genéticos del huésped podrían estar asociados con un mal control de la infección bacteriana y por CMV. Además, se ha descrito que las infecciones recurrentes persisten en pacientes con inmunodeficiencias primarias (IDP) a pesar del reemplazo de inmunoglobulina intravenosa debido a un defecto concomitante, como la deficiencia de *MBL2*³⁴. El papel potencial de este biomarcador genético justifica una mayor evaluación en estudios prospectivos multicéntricos en trasplante de órgano sólido.

Interesantemente el genotipo de producción baja y concentraciones más bajas a día 7 de MBL se asociaron a riesgo de infección recurrente definida como la acumulación de 2 o más eventos de infección sumando bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias. En los modelos univariantes mostraron asociación, aunque perdieron significación tras ajuste por variable clínica. Este hallazgo es de potencial importancia ya que las infecciones bacterianas (que fueron el componente predominante de la recurrencia infecciosa) son las que más se asocian a riesgo de muerte.

Estudio 2

Los genes del complejo de la IL-1 codifican tres proteínas, IL-1 α , IL-1 β y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra). La gravedad de una infección dada está influenciada por el equilibrio entre las concentraciones de IL-1 β , el principal agonista extracelular, y los de IL-1Ra. En individuos sanos, el alelo más raro de IL-1 β -511 (alelo 2) se asoció significativamente con la presencia del alelo 2 de IL-1Ra; el efecto potenciador del alelo 2 de IL-1Ra en las concentraciones plasmáticas de IL-1Ra requirió la presencia del alelo 2 de IL-1 β -511 o la ausencia de la concentración de IL-1 β +395332. En algunos estudios en los que las personas homocigotas para *IL1RN**2 tenían concentraciones circulantes de IL-1Ra más altas que las personas con otros genotipos, las concentraciones de IL-1 β también fueron elevadas. Esto resultó en la proporción más baja de IL-1Ra/IL-1 β y se asoció con una respuesta inmunitaria proinflamatoria aumentada y prolongada^{235,236}.

Se observa en enfermedades autoinmunes donde típicamente hay una relación IL-1Ra/IL-1 β baja en personas homocigotas para el alelo 2 del gen IL-1Ra (*IL1RN**2) y que tienen más respuesta inmune proinflamatoria severa que las personas con otros genotipos de IL-1Ra²³⁷.

Se observó en un estudio de osteomielitis en el noreste de Brasil que sugiere que el genotipo *IL1RN**2/*2 y el alelo *IL1RN**2 están significativamente asociados con un mayor riesgo, la posible participación también se puede atribuir al alelo IL1 β -511T para el desarrollo de la osteomielitis²³⁸.

En el campo de infecciones se observó que la colonización vaginal por los micoplasmas *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* se redujo en mujeres que eran homocigotas para *IL1RN**2²³⁹. Se vio en un estudio con ratones knockout para IL-1Ra, que los ratones deficientes para IL-1Ra demostraron estar completamente protegidos contra el desarrollo de aspergilosis invasiva. Es importante destacar que el galactosaminogalactano, un componente antiinflamatorio de la pared celular de *A. fumigatus*, fue capaz de inducir IL-1Ra in vivo y, en consecuencia, suprimir la vía IL-1, lo que conduce a una mayor susceptibilidad a la aspergilosis invasiva²⁴⁰. En un modelo de ratón de fibrosis pulmonar, la expresión de *IL1RN* por parte de las MSC mejora la respuesta inflamatoria en el pulmón lesionado^{195,196}.

Los SNPs de 3 genes entre ellos *IL1RN* se asoció con la colonización por moho o IMI en receptores de TOS blancos. Es importante destacar que el número de pacientes con colonización por moho y/o IMI, infección invasiva por moho, fue pequeño, lo que llevó a un poder estadístico limitado, especialmente para los SNPs poco frecuentes²⁴¹. El estado homocigoto del alelo 2 es un mayor productor de IL-

1Ra que los estados heterocigoto o homocigoto de tipo salvaje. Por lo tanto, el genotipo 1/2 de IL-1Ra puede considerarse como un 'bajo productor' de IL-1Ra, que a su vez no puede contrarrestar la respuesta proinflamatoria de IL-1 en el momento de la lesión renal. El genotipo 1/2 (410/240) de IL-1Ra se asoció con un mayor riesgo de función retardada del injerto (DGF) en esta cohorte de 136 receptores de trasplante renal y 150 controles sanos.¹⁹³

Existen discrepancias, pero pueden deberse, al menos en parte, al uso de diferentes células o tejidos; el uso de diferentes estímulos, concentraciones estimulantes o duraciones; y/o la falta de consideración de otros factores genéticos pueden representar limitaciones, hasta ahora desconocidas, de los factores reguladores.

Pero la falta de estudios en trasplante de órgano sólido al respecto hace que sea necesario un mayor enfoque.

Los genotipos de IL-1RN evaluados en esta tesis doctoral (en especial el alelo mutado b) no se asociaron con resultados infecciosos en este estudio piloto realizado en receptores de corazón. Una posible explicación de esta falta de asociación puede ser que la red de citocinas es muy redundante y que, en ausencia de suficiente actividad de IL-1, otras citocinas, como el factor de necrosis tumoral, pueden compensar esta deficiencia²⁴².

La posible relación del genotipo B con la variable muerte es de mucho interés y amerita una mayor exploración en futuros estudios con mayor número de pacientes.

Es más, la combinación del alelo B con la presencia de hipogammaglobulinemia IgG post trasplante aumentó el nivel de asociación con el desarrollo de muerte post trasplante. Teniendo en cuenta que la respuesta inmunitaria post trasplante es muy complejo, resulta poco creíble que marcadores individuales, analizados como única variable puedan explicarlo todo. De allí que, si la combinación de una mutación del área de inmunidad innata que hemos evaluado con otra de inmunidad adquirida como la hipogammaglobulinemia IgG adquieren mayor nivel de asociación, esto sugiere que hay mayor plausibilidad biológica combinando biomarcadores.

Estudio 3

Cinética de receptores TLR2 y TLR4 en trasplante cardiaco

En los últimos años, varios estudios han sugerido que cambios en el sistema inmunitario involucrado en presentación de los antígenos durante un trasplante pueden impactar en el riesgo de infección, pero también en el de rechazo, del fallo de injerto o de la vasculopatía del trasplante, entre otros. Por lo tanto, la evaluación de este sistema en los primeros momentos tras el trasplante puede ser una estrategia atractiva para predecir el resultado clínico de los pacientes y, eventualmente, una herramienta útil para ajustar las intervenciones terapéuticas.

En esta tesis enfocamos nuestra atención preliminar de este sistema analizando la cinética de TLR para ver cómo se producen los cambios de estos receptores con relación al estado basal pre-trasplante a través de la expresión caracterizada por TLR2 y TLR4 humanos en distintas subpoblaciones linfocitarias y en algunas APC circulantes. También realizamos un estudio de expresión de marcadores de activación de inmunofenotipo (HLA-DR y CD38) en monocitos periféricos antes y después del trasplante cardiaco. Estudios previos han establecido asociación entre la concentración de monocitos que expresan DR y el desarrollo de complicaciones infecciosas.

Los TLR se expresan en múltiples tejidos. El sitio predominante de expresión de TLR se encuentra en las células del sistema inmunitario innato, especialmente en los monocitos²⁴³. Cabe mencionar que el trasplante de un órgano sólido se acompaña de isquemia tisular, necrosis e infección. La lesión tisular y la necrosis provocan la producción de varios mediadores inflamatorios mediados por las CD a través de TLR²⁰².

TLR-2 y TLR-4 son miembros de una familia de receptores de reconocimiento de patrones cuya función principal es servir como sensores iniciales de patrones moleculares asociados a patógenos²⁴⁴. Expresados en la superficie celular, son receptores pleiotrópicos que señalan al huésped la presencia de una amplia gama de patrones moleculares no propios, que incluyen peptidoglicano y lipopéptidos de bacterias grampositivas^{245,246} y glicoproteínas B y H de la cubierta del CMV²⁴⁷, entre otros para TLR-2. Por el contrario, el reconocimiento de patrones de TLR-4 son los lipopolisacáridos de bacterias gramnegativas y del virus sincitial respiratorio^{248,249}, además de otras moléculas peligrosas. A modo de ejemplo se ha descrito que las células NK podrían ser activadas por lipofosfoglicano de *Leishmania* a través de TLR2²⁵⁰. Y la expresión de TLR4 es mayor en las células NK después de infección con *Schistosoma japonicum* en ratón²⁵¹.

El reconocimiento de patógenos por parte de ambos TLRs inicia una serie de eventos de señalización intracelular mediados por la proteína adaptadora MyD88 y el factor de transcripción NF-κB, que culmina en la liberación de péptidos antivirales, quimiocinas y citocinas que posteriormente prepara la respuesta inmunitaria adaptativa²⁴⁶. TLR2 y TLR4 se expresan de manera ubicua y la inflamación mediada por TLR funciona para proteger al huésped contra la infección. Por otro lado, el TLR4 desencadena respuestas inflamatorias también frente a ligandos endógenos, como la fibronectina, el ácido hialurónico y el heparán sulfato, incluso sin la presencia de infección, en respuesta al daño tisular que parece importante en el proceso de remodelación. La activación de las células dendríticas por el ácido hialurónico es mediada por TLR4. Los depósitos de fibrina extravascular, derivados del fibrinógeno plasmático, son marcadores de inflamación en el contexto de daño, infección y trastornos inmunológicos. La capacidad del fibrinógeno de inducir producción de quimioquinas por los macrófagos parece estar mediada por el TLR4²⁵². Proteínas de choque térmico, que se generan durante la cirugía cardiaca, también pueden actuar como activador de ligandos endógenos para TLR, como se ha demostrado para TLR4 en el miocardio infartado, en un modelo murino de lesión por isquemia/reperfusión miocárdica regional²⁵³. El miocardio humano y murino lesionado tiene una expresión intensa de TLR4²⁵⁴; la expresión de TLR4 dentro del corazón ocurre principalmente en los cardiomiocitos, células que carecen de cualquier función identificada en la inmunidad.

Además, la respuesta intrínseca durante un largo período de tiempo de la inmunidad innata activada por TLR, puede desembocar la ruptura de la tolerancia periférica hacia algunos auto antígenos que puede conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunes. Dependiendo de como evoluciona esta respuesta inmunitaria, las células T autorreactivas pueden llegar a diferenciarse en células efectoras y desencadenar el daño²⁵⁵.

Focalizando en el tema de cinética de TLR, Krejsek et al. en un estudio realizado en cirugía cardíaca, describieron disminución de la intensidad media de fluorescencia de TLR2 en la cirugía, lo cual podría ser similar a lo que nosotros observamos en la fase inicial post trasplante donde mostramos que la expresión, medida como intensidad media de fluorescencia de TLR2 sobre células dendríticas plasmocitoides y sobre monocitos también baja significativamente en comparación con el estudio basal pre trasplante²⁵⁶. También Hosseinzadeh M. et al, en trasplante renal, describieron una bajada de expresión de TLR2, entre el estado basal y 2 días post trasplante, similar a lo observado en nuestro estudio realizado a los 7 días post trasplante cardíaco, baja desde el estudio pre-trasplante. En este estudio también se describieron intensidades medias de fluorescencia de TLR-2 y TLR-4 significativamente más altas en monocitos CD14+ en pacientes con disfunción del injerto (GD) frente a pacientes con buen funcionamiento del injerto (WFG). Comparativamente en nuestra tesis hemos documentado que la intensidad media de fluorescencia de TLR4 experimenta una subida en la expresión por células dendríticas mieloides a los 90 días. Debido al escaso número de eventos de rechazo que se observó en esta parte de la tesis no se analizó el potencial efecto de estos cambios de la cinética de TLR2 y TLR4 sobre parámetros de disfunción del injerto, lo cual queda pendiente para futuros estudios con mayor tamaño muestral que permitan este análisis. Sin embargo, si se podría especular en esta discusión con que esta subida en la expresión de TLR4 pudiese estar causada por la exposición a aloantígenos durante los primeros días del trasplante o bien a antígenos infecciosos tempranos en esta fase del periodo post trasplante. En este mismo estudio de Hosseinzadeh et al se describió un aumento de la expresión TLR4 sobre monocitos también en pacientes con disfunción del injerto²⁵⁷, con un patrón similar a lo que observamos entre fase basal pre trasplante y los 30 días postrasplante.

Por otro lado, en otros estudios se ha observado un aumento en la circulación de monocitos positivos para TLR2 o TLR4 en patologías cardíacas como angina inestable, angina estable, infarto agudo de miocardio e insuficiencia cardíaca crónica^{258,259} con el uso de citometría de flujo. Todo ello apunta a que la modulación positiva de TLR4 en distintas situaciones clínicas podría indicar que su monitorización puede ser informativa de la participación de esta vía in vivo ya que puede implicar reconocimiento de patrones infecciosos o inflamatorios en los primeros momentos post trasplante.

Interesantemente en la tesis observamos una tendencia significativa de asociación entre aumentos de MFI de TLR4 a día 90 con la variable muerte, tendencia que será interesante de reanalizar con mayor tamaño muestral.

El TLR2 se ha identificado como un receptor de superficie celular que activa la secreción de citocinas inflamatorias en respuesta a la infección por CMV²⁴⁷. La estimulación in vitro de TLR2 por CMV dio

como resultado la activación de NF- κ B y la secreción de citoquinas. CMV también pudo activar TLR4 y mediar la secreción de citocinas en células monocíticas humanas²⁶⁰. Como esta parte de la cinética se ha limitado a los primeros tres meses post trasplante y por el tamaño muestral de esta parte de la tesis, tampoco se ha analizado el posible impacto de los cambios de la cinética con variables infecciosas tempranas incluyendo CMV. La infección por CMV suele ocurrir en estados posteriores, cuando las medidas de profilaxis se quitan o minimizan, pero en estudios posteriores será interesante analizar que efecto tienen estos cambios de cinética en la predisposición a esta infección.

Estudio 4

Expresión de marcadores de activación sobre monocitos

La molécula de membrana CD38 se expresa en el estado estacionario^{267,268} y se regula aún más con la infección o el daño²⁶⁹, desempeña un papel central en la activación, proliferación y adhesión de tipo selectina a las células endoteliales de los monocitos²⁷⁰. Por otro lado, como se ha sugerido en otros entornos clínicos, la expresión de HLA-DR en monocitos puede ser un biomarcador para una predicción temprana de infecciones graves.

La expresión superficial de HLA-DR y CD38 en los monocitos CD14+ refleja el grado en que se han activado estas células. Dado el papel central que juegan los monocitos en el sistema inmunitario, la alteración de la expresión de HLA-DR y CD38 en los monocitos CD14+ da como resultado una característica de alteración del estado inmunitario durante el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIR)²⁷¹. Presumimos que la expresión de HLA-DR y CD38 podría verse alterada de manera similar después del trasplante de corazón y durante las complicaciones posteriores al trasplante.

Usando citometría de flujo, investigamos la expresión superficial de HLA-DR y CD38 en monocitos CD14+ en los pacientes trasplantados hasta los 90 días después del trasplante de corazón. Hemos observado un descenso significativo del porcentaje a los 7 días tanto de células CD14+CD38+DR+ como CD14+DR+.

El hallazgo de regulación a la baja de HLA-DR y CD38 en receptores de trasplantes de manera temprana parece algo sorprendente ya que el IFN- γ , que se considera un mediador proinflamatorio importante en el contexto quirúrgico inmediato, es un potente estimulador de la expresión de HLA-DR. Por lo tanto, otras citoquinas capaces de regular a la baja HLA-DR como IL-1²⁷⁴ e IL-10²⁷⁵ podrían modular este efecto estimulador de IFN- γ . Por otro lado, según estudios experimentales previos con diferentes líneas celulares o muestras de sangre de pacientes con neoplasias malignas, la expresión de HLA-DR no se vio alterada por esteroides²⁷⁴ o tratamientos inmunosupresores²⁷⁶.

Otros investigadores han demostrado que la expresión de CD38 y HLA-DR aumentaba significativamente en pacientes reactivados con CMV en comparación con los no reactivados²⁷². Por lo tanto, la interferencia del CMV con la maduración de los monocitos promueve la propagación viral

al paralizar el sistema inmunitario adaptativo²⁷³. Especialmente, en los receptores trasplantados, los monocitos son menos capaces de desarrollar APC activadas por antivirales, lo que puede dar lugar a respuestas inmunitarias alteradas no solo contra el CMV, sino muy probablemente también contra otros microorganismos invasores.

Volk et al. han demostrado que la exposición inicial de los monocitos a la endotoxina (lipopolisacárido) provoca una respuesta proinflamatoria masiva de estas células. Sin embargo, la exposición repetida a los lipopolisacáridos da como resultado un estado de tolerancia a la endotoxina que va acompañado de una regulación a la baja drástica de la expresión de HLA-DR²⁷⁷. Más del 90% de los monocitos circulantes son positivos para CD14 y negativos para CD16, y actúan principalmente como fagocitos, con una fuerte actividad de peroxidasa y predominantemente liberación de interleucina-10 (IL-10) en respuesta a LPS^{278,279}. Sin embargo, de acuerdo con los hallazgos de Ziegler-Heitbrock et al., se puede delinear una subpoblación de monocitos que es positiva para CD16 y se considera “proinflamatoria” con una mayor producción de citoquinas inflamatorias. Además, estos monocitos CD14+CD16+ muestran una mayor expresión de HLA-DR, que se asocia con una mayor capacidad de presentación de antígeno²⁸⁰. Como muestran Blumenstein et al., la subpoblación CD14+CD16+ se expande después de la bacteriemia²⁸¹.

La activación y diferenciación de monocitos hacia distintas subpoblaciones, depende del microambiente pro o antiinflamatorio predominante dentro de la lesión²⁸².

En nuestra tesis ha sido interesante comprobar que los pacientes que desarrollan infecciones bacterianas y bacterianas recurrentes exhiben MFI significativamente más bajas a los 7 días post trasplante de las 2 subpoblaciones analizadas de monocitos activados. Este hallazgo es importante porque respalda nuestra conclusión de que la expresión de HLA-DR y CD38 en monocitos CD14+ podría servir como un marcador clínico predictivo de desarrollo de infección bacteriana en los receptores de trasplante de corazón en sus primeros momentos post trasplante.

Posibilidades de traslación y aplicabilidad de los resultados de esta tesis doctoral

Estudio genético de MBL

Durante décadas, los estudios de susceptibilidad genética a las enfermedades infecciosas han estado centrados en la identificación de defectos monogénicos hereditarios o polimorfismos individuales en genes candidatos. Estos se han utilizado mucho en el mundo de la inmunodeficiencia primaria, pero en el contexto de inmunosupresión y trasplante se ha explorado mucho menos. Resulta de interés, ya en el contexto de un paciente trasplantado, porque se da la circunstancia de que se suman dos estados de inmunodeficiencia, uno primario (la predisposición genética) con el secundario que se deriva del procedimiento de trasplante y de la propia inmunosupresión que se utiliza. En práctica habitual de predicción de infecciones no hay ninguna combinación de este tipo que se utilice.

Los pocos estudios que se han realizado en trasplante cardiaco para el genotipo de MBL explorado en esta tesis se han hecho en cohortes de pacientes muy pequeñas.

Los genes relacionados con la inmunidad son un caso especial en el genoma porque, dependiendo de la región geográfica, la presión selectiva sobre ellos ha sido diferente; esa es la razón por la que la mayoría de esos genes son altamente polimórficos y, en consecuencia, muy propensos a los sesgos de estratificación de la población.

Conocer las vías subyacentes de la defensa del huésped humano permite, por ejemplo, identificar formas de prevenir la enfermedad, desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico para la estratificación del riesgo de los pacientes y la identificación de nuevas terapias potenciales. Para una aplicación sólida de esta terapia orientada al huésped es especialmente importante asegurarse de que los resultados se validen adecuadamente.

El estudio genético de MBL de esta tesis doctoral parece cumplir varios de estos requisitos. Se ha demostrado que se asocia a susceptibilidad a infección con el mayor tamaño muestral en una cohorte de trasplantados cardiacos nunca antes publicada con este tamaño, y hay estudios previos que dan un racional a que el defecto puede conducir a un mal control de las mismas, hay plausibilidad biológica. Además, como se ha comentado en la introducción es susceptible de terapia. Del esquema que se expone en la figura 58 se trata del estudio de genes candidatos, el modelo clásico de estudio que sigue siendo válido.

Muchos hospitales tienen fácilmente al alcance plataformas Sanger para este tipo de estudios, lo cual es un aspecto traslacional a tener en cuenta, aunque las plataformas de NGS se están haciendo también accesibles en los centros de mayor complejidad. Así pues, el equipo de investigadores de esta tesis esta valorando la implementación del estudio de genotipo via Sanger para la rutina en trasplante cardiaco. El otro biomarcador que esta posicionado para potencial uso en rutina es la cuantificación de la respuesta inmune celular anti péptidos de CMV mediada por células T CD4 y sobretodo CD8. Pero estas últimas aun no han conseguido posicionarse en guias clínicas que las recomienden. Podemos especular que el uso combinado de éstas con marcadores genéticos como la MBL podría ser una opción a valorar. El camino hasta la inclusión de un biomarcador en guía clínica es muy largo y puede exigir, en algunos casos, la realización de ensayos clínicos de intervención que demuestren que la modificación del factor de riesgo impacta en la reducción del riesgo. Podemos especular que el uso combinado de alteraciones secundarias al trasplante como la hipogammaglobulinemia IgG temprana con marcadores genéticos como la MBL podría ser una opción a valorar ya que son factibles de introducción en rutina. El genotipo de MBL bien puede hacerse antes del trasplante a los candidatos que entren en lista de espera o bien lo antes posible post trasplante ya que no se afecta por los procedimientos del mismo.

La otra asociación detectada del alelo *B* como posible marcador de riesgo de muerte amerita una evaluación más amplia.

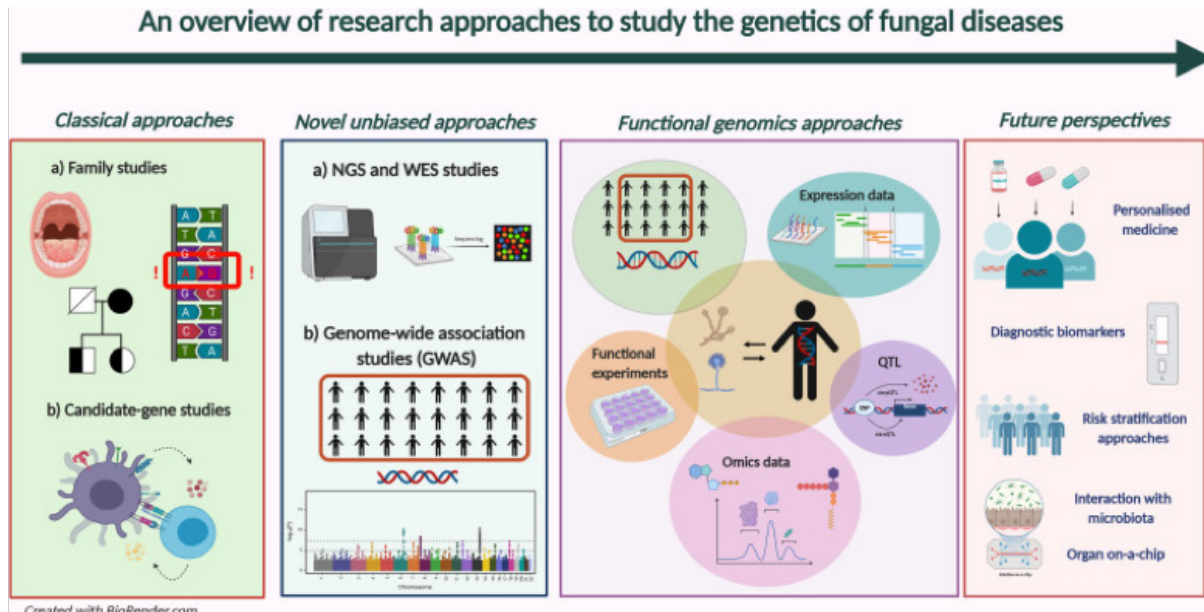


Figura 58. Enfoques de investigación clásicos y novedosos para estudiar la genética de las infecciones fúngicas.
Fuente Bruno, M. et al., 2021

Sigüientes pasos de evaluación de biomarcadores de inmunidad innata

Estudio de asociación del genoma completo y genómica funcional:

Sigüiendo con el esquema antes expuesto, los estudios clásicos incluían un gen sospechoso (nuestra propuesta es mutación MBL y alelo *B* del modelo de IL-1Ra), aumentando la posibilidad de dar con la mutación/es culpables de la susceptibilidad a complicaciones post trasplante. Es la aproximación utilizada en esta tesis. Sin embargo, con el **GWAS** se examinan todas las mutaciones presentes en el genoma, aumentando la probabilidad de encontrar el gen o los genes, reclutar gente sana y gente con ese defecto, luego se secuencian el genoma de todos ellos y un análisis estadístico, haciendo un test de asociación entre mutación y la enfermedad/complicación post trasplante. Presenta una enorme ventaja frente a genes candidatos, pero precisa mayores tamaños muestrales si el defecto genético es poco prevalente. Después llegaría la **genómica funcional** para determinar cómo componentes individuales de un sistema biológico trabajan juntos para producir un fenotipo particular. El objetivo último de los estudios genómicos funcionales es proporcionar “datos procesables” con potencial traslativo. Varias herramientas como la medicina personalizada, con evaluación de nuevas pruebas de biomarcadores (genes, proteínas y otras sustancias), pueden contribuir a mejorar la estratificación del riesgo para predecir eventos adversos futuros, están enfocadas en la **perspectiva futura** que incluye ya la utilización de la inteligencia artificial¹⁸⁸

Otros biomarcadores

De los otros modelos evaluados, TLRs y monocitos activados hay aun mucho trabajo para confirmar su posible implicación en el riesgo de infección en trasplantados cardiacos, pero esta tesis sirve de partida para su evaluación más detallada en el futuro. Para todos los biomarcadores evaluados en esta tesis en un centro único de Madrid queda por hacer el largo recorrido de estudio multicéntrico para validar el biomarcador utilizando modelos de inteligencia artificial y en los modelos que proceda, los ensayos de intervención terapéutica como se ha comentado más arriba.

Reflexión final

Se dice que, en 2050, si no se toman las medidas necesarias, las infecciones por bacterias resistentes serán la primera causa de muerte en el mundo. Sin duda una de las medidas necesarias que, hoy por hoy no se utiliza y no queda mucho tiempo para desarrollar los modelos preventivos, será la predicción mediante monitorización inmunológica y en este sentido esta tesis nos da pistas de algunos componentes de la inmunidad innata que podriamos evaluar en el modelo de trasplante cardiaco y porque no, extender hacia otros trasplantes de órgano sólido así como a otros modelos de estado de inmunodeficiencia secundaria, donde se concentrarán para entonces las mayores prevalencias de este tipo infecciones resistentes a los antimicrobianos.

The background of the slide features a dark blue gradient. On the right side, a DNA double helix is depicted, with one strand highlighted in orange and red. Scattered across the left and bottom areas are several stylized, semi-transparent blue cells, each with a darker blue nucleus.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. Se observó correlación entre genotipo y concentración de MBL, asociándose ambos a infección por CMV y recurrencia infecciosa por cualquier patógeno en periodo post trasplante cardiaco.
2. El estudio del genotipo del antagonista del receptor de la IL-1 muestra que su alelo mutado *B* se asocia con riesgo de muerte en trasplantados cardiacos.
3. Se observó diferente expresión de TLR-2 y TLR-4 entre las células presentadoras de antígeno clásicas y las subpoblaciones linfocitarias, y la cinética de expresión de éstos receptores mostró cambios significativos en periodo post trasplante en diferentes subpoblaciones estudiadas.
4. En el periodo temprano post trasplante se produce un descenso del porcentaje de monocitos activados CD14+CD38+DR+ y CD14+DR+ asociandose a riesgo de infección bacteriana e infección bacteriana recurrente en pacientes sometidos a trasplante cardiaco.
5. Se han identificado varias combinaciones de biomarcadores de inmunidad innata y adaptativa que añaden riesgo de complicaciones post trasplante en comparación con el que tienen los biomarcadores usados individualmente.
6. Estos biomarcadores de inmunidad innata y las combinaciones de biomarcadores de inmunidad innata con adaptativa podrían ser útiles para seleccionar receptores cardíacos en ensayos de evaluación de profilaxis antimicrobiana anticipada o prolongada.



VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Almenar, L., Delgado, J., Crespo, M. & Segovia, J. Situación actual del trasplante cardiaco en España. *Rev. Española Cardiol.* **63**, 132–149 (2010).
2. Sánchez-Lázaro, I. J. et al. Timing, Etiology, and Location of First Infection in First Year After Heart Transplantation. *Transplant. Proc.* **42**, 3017–3019 (2010).
3. González-Vílchez, F. et al. Registro español de trasplante cardiaco. XXXIII informe oficial de la Asociación de Insuficiencia Cardiaca de la Sociedad Española de Cardiología. *Rev. Española Cardiol.* **75**, 926–935 (2022).
4. Lund, L. H. et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report—2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *J. Hear. Lung Transplant.* **36**, 1037–1046 (2017).
5. Athanassopoulos, P. et al. Impaired circulating dendritic cell reconstitution identifies rejecting recipients after clinical heart transplantation independent of rejection therapy. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* **27**, 783–789 (2005).
6. Khush, K. K. et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult heart transplantation report — 2019; focus theme: Donor and recipient size match. *J. Hear. Lung Transplant.* **38**, 1056–1066 (2019).
7. ONT. Actividad de donación y trasplante España 2021. *Mem. Act. donación y Traspl. 2021* (2022).
8. Timsit, J.-F. et al. Diagnostic and therapeutic approach to infectious diseases in solid organ transplant recipients. *Intensive Care Med.* **45**, 573–591 (2019).
9. Dorschner, P., McElroy, L. M. & Ison, M. G. Nosocomial infections within the first month of solid organ transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* **16**, 171–187 (2014).
10. Fishman, J. A. Infection in Organ Transplantation. *Am. J. Transplant.* **17**, 856–879 (2017).
11. Mittal, C. et al. Clostridium difficile Infection in Liver Transplant Recipients: A Retrospective Study of Rates, Risk Factors and Outcomes. *Am. J. Transplant.* **14**, 1901–1907 (2014).
12. B. Alberts, et al. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. (2002).
13. Turvey, S. E. & Broide, D. H. Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S24–S32 (2010).
14. Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W. & Kim, H. L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **14**, 49 (2018).
15. Monserrat Sanz, J., Gómez Lahoz, A. M., Sosa Reina, M. D. & Prieto Martín, A. Introducción al sistema inmune. Componentes celulares del sistema inmune innato. *Med. - Programa Form. Médica Contin. Acreditado* **12**, 1369–1378 (2017).
16. Sastry, R. et al. Characterization of murine mannose-binding protein genes Mbl1 and Mbl2 reveals features common to other collectin genes. *Mamm. Genome* **6**, 103–110 (1995).
17. Jack, D. L., Klein, N. J. & Turner, M. W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol. Rev.* **180**, 86–99 (2001).
18. Sanclemente, G. Genetic variants of innate immune receptors and infections after liver transplantation. *World J. Gastroenterol.* **20**, 11116 (2014).

19. Loris, R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1572**, 198–208 (2002).
20. Cervera, A. et al. Genetically-Defined Deficiency of Mannose-Binding Lectin Is Associated with Protection after Experimental Stroke in Mice and Outcome in Human Stroke. *PLoS One* **5**, e8433 (2010).
21. Kravitz, M. S. & Shoenfeld, Y. Autoimmunity to protective molecules: is it the perpetuum mobile (vicious cycle) of autoimmune rheumatic diseases? *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2**, 481–490 (2006).
22. Garred, P., Larsen, F., Madsen, H. O. & Koch, C. Mannose-binding lectin deficiency—revisited. *Mol. Immunol.* **40**, 73–84 (2003).
23. Ogden, C. A. et al. C1q and Mannose Binding Lectin Engagement of Cell Surface Calreticulin and Cd91 Initiates Macropinocytosis and Uptake of Apoptotic Cells. *J. Exp. Med.* **194**, 781–796 (2001).
24. Hibberd, M. L., Sumiya, M., Summerfield, J. A., Booy, R. & Levin, M. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. *Lancet* **353**, 1049–1053 (1999).
25. Kakkanaiah, V. N., Shen, G. Q., Ojo-Amaize, E. A. & Peter, J. B. Association of Low Concentrations of Serum Mannose-Binding Protein with Recurrent Infections in Adults. *Clin. Diagnostic Lab. Immunol.* **5**, 319–321 (1998).
26. Summerfield, J. A. et al. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* **345**, 886–889 (1995).
27. Eisen, D. P. et al. Low Serum Mannose-Binding Lectin Level Increases the Risk of Death due to Pneumococcal Infection. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 510–516 (2008).
28. BOUWMAN, L. et al. Mannose Binding Lectin Gene Polymorphisms Confer a Major Risk for Severe Infections After Liver Transplantation. *Gastroenterology* **129**, 408–414 (2005).
29. Golshayan, D. et al. Polymorphisms in the lectin pathway of complement activation influence the incidence of acute rejection and graft outcome after kidney transplantation. *Kidney Int.* **89**, 927–938 (2016).
30. Bodro, M. et al. Polygenic Innate Immunity Score to Predict the Risk of Cytomegalovirus Infection in CMV D+/R- Transplant Recipients. A Prospective Multicenter Cohort Study. *Front. Immunol.* **13**, (2022).
31. Pavlov, V. I. et al. Absence of Mannose-Binding Lectin Prevents Hyperglycemic Cardiovascular Complications. *Am. J. Pathol.* **180**, 104–112 (2012).
32. CHRISTIANSEN et al. Mannan-Binding Lectin Deficiency is Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage. *Scand. J. Immunol.* **49**, 193–196 (1999).
33. Jauniaux, E. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* **21**, 2216–2222 (2006).
34. Garcia-Laorden, M. I. 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.* **122**, 368–374.e2 (2008).
35. Mason, C. & Tarr, A. Human Lectins and Their Roles in Viral Infections. *Molecules* **20**, 2229–2271 (2015).
36. Kilpatrick, D. C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfus. Med.* **12**, 335–352 (2002).
37. Eisen, D. P. & Minchinton, R. M. Impact of Mannose-Binding Lectin on Susceptibility to Infectious Diseases. *Clin. Infect. Dis.* **37**, 1496–1505 (2003).
38. Jack, D. L. & Turner, M. W. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 753–757 (2003).

39. Filho, R. M. et al. High Frequency of Variant Alleles of the Mannose-Binding Lectin 2 (*MBL2*) Gene Are Associated with Patients Infected by Hepatitis B Virus. *Viral Immunol.* **23**, 449–453 (2010).
40. Fuchs, A. et al. Direct Complement Restriction of Flavivirus Infection Requires Glycan Recognition by Mannose-Binding Lectin. *Cell Host Microbe* **8**, 186–195 (2010).
41. Fuchs, A. et al. Direct complement restriction of flavivirus infection requires glycan recognition by mannose-binding lectin. *Cell Host Microbe* **8**, 186–95 (2010).
42. Speletas, M. et al. MBL deficiency-causing B allele (rs1800450) as a risk factor for severe COVID-19. *Immunobiology* **226**, 152136 (2021).
43. Thielens, N. M., Gaboriaud, C. & Arlaud, G. J. Ficolins: innate immune recognition proteins for danger sensing. *Inmunología* **26**, 145–156 (2007).
44. Liu, Y. et al. The roles of direct recognition by animal lectins in antiviral immunity and viral pathogenesis. *Molecules* **20**, 2272–95 (2015).
45. Sastry, K. et al. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J. Exp. Med.* **170**, 1175–1189 (1989).
46. Beltrame, M. H., Catarino, S. J., Goeldner, I., Boldt, A. B. W. & de Messias-Reason, I. J. The Lectin Pathway of Complement and Rheumatic Heart Disease. *Front. Pediatr.* **2**, (2015).
47. Dommett, R. M., Klein, N. & Turner, M. W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* **68**, 193–209 (2006).
48. Eisen, D. P. Mannose-Binding Lectin Deficiency and Respiratory Tract Infection. *J. Innate Immun.* **2**, 114–122 (2010).
49. Chalmers, J. D. et al. Mannose-binding lectin deficiency and disease severity in non-cystic fibrosis bronchiectasis: a prospective study. *Lancet Respir. Med.* **1**, 224–232 (2013).
50. Larsen, F., Madsen, H. O., Sim, R. B., Koch, C. & Garred, P. Disease-associated Mutations in Human Mannose-binding Lectin Compromise Oligomerization and Activity of the Final Protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 21302–21311 (2004).
51. De Robert L. Nussbaum, Roderick R. McInnes, H. F. W. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*. (2015).
52. Wright, A. F. Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations. in *eLS* (Wiley, 2005). doi:10.1038/npg.els.0005005.
53. Cox, A., Camp, N. J., Nicklin, M. J. H., di Giovine, F. S. & Duff, G. W. An Analysis of Linkage Disequilibrium in the Interleukin-1 Gene Cluster, Using a Novel Grouping Method for Multiallelic Markers. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 1180–1188 (1998).
54. Valderrama, G., Vijande, F., Escribano, J. M., Garrido-Pertierra, A. & Bascones, A. La IL-1 y su eventual asociación con la enfermedad periodontal crónica: Una revisión de la literatura (I). *Av. en Periodoncia e Implantol. Oral* **17**, (2005).
55. Robert Nussbaum, Roderick McInnes, H. W. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*. (2015).
56. Kalia, N., Sharma, A., Kaur, M., Kamboj, S. S. & Singh, J. A comprehensive in silico analysis of non-synonymous and regulatory SNPs of human *MBL2* gene. *Springerplus* **5**, 811 (2016).
57. de Rooij, B.-J. F. et al. Mannose-binding lectin and Ficolin-2 gene polymorphisms predispose to cytomegalovirus (re)infection after orthotopic liver transplantation. *J. Hepatol.* **55**, 800–807 (2011).

58. Garred, P., Larsen, F., Seyfarth, J., Fujita, R. & Madsen, H. O. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun.* **7**, 85–94 (2006).
59. Madsen, H. O. et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* **40**, 37–44 (1994).
60. Choi, E. et al. Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Genes Immun.* **2**, 248–253 (2001).
61. de Messias-Reason, I. J. et al. The Association between Mannan-Binding Lectin Gene Polymorphism and Clinical Leprosy: New Insight into an Old Paradigm. *J. Infect. Dis.* **196**, 1379–1385 (2007).
62. Summerfield, J. A., Sumiya, M., Levin, M. & Turner, M. W. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ* **314**, 1229–1229 (1997).
63. Moens, L. et al. Mannose-Binding Lectin Genotype and Invasive Pneumococcal Infection. *Hum. Immunol.* **67**, 605–611 (2006).
64. Madsen, H. O. et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannann-binding protein. *J. Immunol.* **155**, 3013–20 (1995).
65. Sjöberg, A. P. et al. Short leucine-rich glycoproteins of the extracellular matrix display diverse patterns of complement interaction and activation. *Mol. Immunol.* **46**, 830–839 (2009).
66. Swingle, T. E. et al. Degradome expression profiling in human articular cartilage. *Arthritis Res. Ther.* **11**, R96 (2009).
67. Rantala, A. et al. Mannose-Binding Lectin Concentrations, *MBL2* Polymorphisms, and Susceptibility to Respiratory Tract Infections in Young Men. *J. Infect. Dis.* **198**, 1247–1253 (2008).
68. Roos, A. et al. Antibody-mediated activation of the classical pathway of complement may compensate for mannose-binding lectin deficiency. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2589–2598 (2004).
69. Minchinton, R. M., Dean, M. M., Clark, T. R., Heatley, S. & Mullighan, C. G. Analysis of the Relationship Between Mannose-Binding Lectin (MBL) Genotype, MBL Levels and Function in an Australian Blood Donor Population. *Scand. J. Immunol.* **56**, 630–641 (2002).
70. Madsen, H. O., Satz, M. L., Høgh, B., Svejgaard, A. & Garred, P. Different molecular events result in low protein levels of mannann-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J. Immunol.* **161**, 3169–75 (1998).
71. Bouwman, L. H., Roep, B. O. & Roos, A. Mannose-Binding Lectin: Clinical Implications for Infection, Transplantation, and Autoimmunity. *Hum. Immunol.* **67**, 247–256 (2006).
72. Casanova, J.-L. & Abel, L. Human Mannose-binding Lectin in Immunity. *J. Exp. Med.* **199**, 1295–1299 (2004).
73. Degen, S. E. & Thiel, S. Humoral Pattern Recognition and the Complement System. *Scand. J. Immunol.* **78**, 181–193 (2013).
74. Bajic, G., Degen, S. E., Thiel, S. & Andersen, G. R. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *EMBO J.* **34**, 2735–2757 (2015).
75. Gingras, A. R. et al. Structural Basis of Mannan-Binding Lectin Recognition by Its Associated Serine Protease MASP-1: Implications for Complement Activation. *Structure* **19**, 1635–1643 (2011).
76. Gibson, M. S., Kaiser, P. & Fife, M. The chicken IL-1 family: evolution in the context of the studied vertebrate lineage. *Immunogenetics* **66**, 427–438 (2014).
77. *Cytokine Gene Polymorphisms in Multifactorial Conditions.* (CRC Press, 2006). doi:10.1201/9781420005325.

78. Oberholzer, A., Oberholzer, C. & Moldawer, L. L. Cytokine signaling-regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit. Care Med.* **28**, N3–N12 (2000).
79. Nicklin, M. J. H., Weith, A. & Duff, G. W. A Physical Map of the Region Encompassing the Human Interleukin-1 α , Interleukin-1 β , and Interleukin-1 Receptor Antagonist Genes. *Genomics* **19**, 382–384 (1994).
80. Cañas, M. et al. Polimorfismo genético de interleuquina-1: Asociación con cáncer gástrico en la población de alto riesgo del Centroccidente de Venezuela. *Rev. Med. Chil.* **137**, (2009).
81. Arend, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J. Clin. Invest.* **88**, 1445–1451 (1991).
82. Carter, D. B. et al. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* **344**, 633–638 (1990).
83. Arend, W. P. & Gabay, C. Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Res.* **2**, 245–8 (2000).
84. Schreuder, H. et al. A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. *Nature* **386**, 194–200 (1997).
85. Vigers, G. P. A., Anderson, L. J., Caffes, P. & Brandhuber, B. J. Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1 β . *Nature* **386**, 190–194 (1997).
86. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=27368251&dopt=GenBank.
87. Stockman, B. J. et al. Solution structure of human interleukin-1 receptor antagonist protein. *FEBS Lett.* **349**, 79–83 (1994).
88. Dinarello, C. A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* **8**, 1314–25 (1994).
89. Gabay, C., Lamacchia, C. & Palmer, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 232–241 (2010).
90. Ortiz, L. A. et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 11002–11007 (2007).
91. Meier, R. P. H., Müller, Y. D., Morel, P., Gonelle-Gispert, C. & Bühler, L. H. Transplantation of mesenchymal stem cells for the treatment of liver diseases, is there enough evidence? *Stem Cell Res.* **11**, 1348–1364 (2013).
92. Nouri Barkestani, M., Naserian, S., Khoddam, F., Shamdani, S. & Bambai, B. Optimization of IL-1RA structure to achieve a smaller protein with a higher affinity to its receptor. *Sci. Rep.* **12**, 7483 (2022).
93. Arend, W. P. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann. Rheum. Dis.* **59**, 60i – 64 (2000).
94. Redlitz, K. H., Yamshchikov, V. F. & Cominelli, F. Differential Contribution of IL-1Ra Isoforms to Allele-Specific IL-1Ra mRNA Accumulation. *J. Interf. Cytokine Res.* **24**, 253–260 (2004).
95. Gabay, C., Smith, M. F., Eidlen, D. & Arend, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *J. Clin. Invest.* **99**, 2930–2940 (1997).
96. Dinarello, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 519–550 (2009).
97. Haskill, S. et al. cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 3681–3685 (1991).

98. Butcher, C., Steinkasserer, A., Tejura, S. & Lennard, A. C. Comparison of two promoters controlling expression of secreted or intracellular IL-1 receptor antagonist. *J. Immunol.* **153**, 701–11 (1994).
99. Gibson, M. S., Fife, M., Bird, S., Salmon, N. & Kaiser, P. Identification, Cloning, and Functional Characterization of the IL-1 Receptor Antagonist in the Chicken Reveal Important Differences between the Chicken and Mammals. *J. Immunol.* **189**, 539–550 (2012).
100. Khazim, K., Azulay, E. E., Kristal, B. & Cohen, I. Interleukin 1 gene polymorphism and susceptibility to disease. *Immunol. Rev.* **281**, 40–56 (2018).
101. Jaiswal, D., Trivedi, S., Singh, R., Dada, R. & Singh, K. Association of the *IL1RN* Gene VNTR Polymorphism with Human Male Infertility. *PLoS One* **7**, e51899 (2012).
102. Rad, R. et al. Synergistic Effect of *Helicobacter pylori* Virulence Factors and Interleukin-1 Polymorphisms for the Development of Severe Histological Changes in the Gastric Mucosa. *J. Infect. Dis.* **188**, 272–281 (2003).
103. Arnalich, F. et al. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and mortality in patients with severe sepsis. *Clin. Exp. Immunol.* **127**, 331–6 (2002).
104. Bid, H. K., Kumar, A., Mishra, P. K. & Mittal, R. D. Study of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism in healthy individuals from Northern India. *Indian J. Clin. Biochem.* **19**, 119–23 (2004).
105. Danis, V. A., Millington, M., Hyland, V. J. & Grennan, D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin. Exp. Immunol.* **99**, 303–10 (1995).
106. Bid, H. K., Kumar, A., Mishra, P. K. & Mittal, R. D. Study of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism in healthy individuals from Northern India. *Indian J. Clin. Biochem.* **19**, 119–123 (2004).
107. Witkin, S. S., Gerber, S. & Ledger, W. J. Influence of Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Polymorphism on Disease. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 204–209 (2002).
108. Fang, X. M., Schroder, S., Hoeft, A. & Stuber, F. Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family. *Crit. Care Med.* **27**, 1330–1334 (1999).
109. Dinarello, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**, 2095–147 (1996).
110. Susana Vélez-Castrillón, José F. Camargo, Paula A. Correa, J.-M. A. Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1. *Rev. Colomb. Reumatol.* **11**, 11–39 (2004).
111. Aksentijevich, I. et al. An Autoinflammatory Disease with Deficiency of the Interleukin-1-Receptor Antagonist. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2426–2437 (2009).
112. Rego-Pérez, I., Fernández-Moreno, M., Carreira-García, V. & Blanco, F. J. Polimorfismos genéticos y farmacogenética en la artritis reumatoide. *Reumatol. Clínica* **5**, 268–279 (2009).
113. Luís, J. P., Simões, C. J. V. & Brito, R. M. M. The Therapeutic Prospects of Targeting IL-1R1 for the Modulation of Neuroinflammation in Central Nervous System Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1731 (2022).
114. Giancane, G. et al. IL-1 Inhibition in Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *Front. Pharmacol.* **7**, (2016).
115. Arthur, V. L. et al. *IL1RN* Variation Influences Both Disease Susceptibility and Response to Recombinant Human Interleukin-1 Receptor Antagonist Therapy in Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **70**, 1319–1330 (2018).
116. Pardeo, M. et al. Early Treatment and *IL1RN* Single-Nucleotide Polymorphisms Affect Response to Anakinra in Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **73**, 1053–1061 (2021).
117. Cao, Y. et al. Anakinra as an interleukin 1 receptor antagonist, complicated genetics and molecular impacts- from the point of view of mouse genomics. *Int. Immunopharmacol.* **13**, 28–36 (2012).

118. Jones, I. K. A. et al. Blocking the IL-1 receptor reduces cardiac transplant ischemia and reperfusion injury and mitigates CMV-accelerated chronic rejection. *Am. J. Transplant.* **21**, 44–59 (2021).
119. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397 (1997).
120. Poltorak, A. et al. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* (80-.). **282**, 2085–2088 (1998).
121. Okamura, Y. et al. The Extra Domain A of Fibronectin Activates Toll-like Receptor 4. *J. Biol. Chem.* **276**, 10229–10233 (2001).
122. Xu, Y. et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111–115 (2000).
123. Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S. & Kolb, H. Cutting Edge: Heat Shock Protein 60 Is a Putative Endogenous Ligand of the Toll-Like Receptor-4 Complex. *J. Immunol.* **164**, 558–561 (2000).
124. Martín-Medina, A. et al. TLR/WNT: A Novel Relationship in Immunomodulation of Lung Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 6539 (2022).
125. Hernández, J. C., Montoya, C. J. & Urcuqui-Inchima, S. [The role of toll-like receptors in viral infections: HIV-1 as a model]. *Biomedica* **27**, 280–93 (2007).
126. McGettrick, A. F. & O'Neill, L. A. J. Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. *Br. J. Haematol.* **139**, 185–193 (2007).
127. Mitchell, J. A., Paul-Clark, M. J., Clarke, G. W., McMaster, S. K. & Cartwright, N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J. Endocrinol.* **193**, 323–330 (2007).
128. Hess, C. et al. Myeloid RelA regulates pulmonary host defense networks. *Eur. Respir. J.* **35**, 343–352 (2010).
129. Ding, X. et al. TLR4 signaling induces TLR3 up-regulation in alveolar macrophages during acute lung injury. *Sci. Rep.* **7**, 34278 (2017).
130. Michelsen, K. S. et al. The Role of Toll-like Receptors (TLRs) in Bacteria-induced Maturation of Murine Dendritic Cells (DCs). *J. Biol. Chem.* **276**, 25680–25686 (2001).
131. Kitamura, H. et al. Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nat. Immunol.* **7**, 971–977 (2006).
132. Frleta, D., Noelle, R. J. & Wade, W. F. CD40-mediated up-regulation of Toll-like receptor 4-MD2 complex on the surface of murine dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 1064–1073 (2003).
133. Geisel, J. et al. IL-6 and Maturation Govern TLR2 and TLR4 Induced TLR Agonist Tolerance and Cross-Tolerance in Dendritic Cells. *J. Immunol.* **179**, 5811–5818 (2007).
134. Mitchell, J. A., Paul-Clark, M. J., Clarke, G. W., McMaster, S. K. & Cartwright, N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J. Endocrinol.* **193**, 323–30 (2007).
135. Lambert, C., Preijers, F. W. M. B., Yanikkaya Demirel, G. & Sack, U. Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* **92**, 180–188 (2017).
136. Abbas AK, Lichtman AH, P. S. Cells and tissues of immune system. in *Cellular and molecular immunology* 15–37 (2015).

137. Villaseñor-Cardoso, M. I., Frausto-Del-Río, D. A. & Ortega, E. Aminopeptidase N (CD13) Is Involved in Phagocytic Processes in Human Dendritic Cells and Macrophages. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1–12 (2013).
138. Segura, E. & Amigorena, S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* **34**, 440–445 (2013).
139. Varol, C., Mildner, A. & Jung, S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 643–675 (2015).
140. Lauvau, G., Loke, P. & Hohl, T. M. Monocyte-mediated defense against bacteria, fungi, and parasites. *Semin. Immunol.* **27**, 397–409 (2015).
141. Lambert, C., Preijers, F. W. M. B., Yanikkaya Demirel, G. & Sack, U. Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry B. Clin. Cytom.* **92**, 180–188 (2017).
142. Amici, S. A. et al. CD38 Is Robustly Induced in Human Macrophages and Monocytes in Inflammatory Conditions. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
143. Cheadle, W. G. The human leukocyte antigens and their relationship to infection. *Am. J. Surg.* **165**, 75S-81S (1993).
144. Genel, F., Atlihan, F., Ozsu, E. & Ozbek, E. Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. *J. Infect.* **60**, 224–228 (2010).
145. Chéron, A., Monneret, G., Landelle, C., Floccard, B. & Allaouchiche, B. Diminution de l'expression monocytaire de HLA-DR et risque d'infection hospitalière. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* **29**, 368–376 (2010).
146. Döring, M. et al. Human leukocyte antigen DR surface expression on CD14+ monocytes during adverse events after hematopoietic stem cell transplantation. *Ann. Hematol.* **94**, 265–273 (2015).
147. Wahl, S. M. et al. Monocyte interleukin 2 receptor gene expression and interleukin 2 augmentation of microbicidal activity. *J. Immunol.* **139**, 1342–7 (1987).
148. Jørgensen, P. F. et al. Peptidoglycan and Lipoteichoic Acid Modify Monocyte Phenotype in Human Whole Blood. *Clin. Diagnostic Lab. Immunol.* **8**, 515–521 (2001).
149. Basham, T. Y. & Merigan, T. C. Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression. *J. Immunol.* **130**, 1492–4 (1983).
150. Livingston, D. H. Interferon Gamma Administration Increases Monocyte HLA-DR Antigen Expression but Not Endogenous Interferon Production. *Arch. Surg.* **129**, 172 (1994).
151. Gerrard, T. L., Dyer, D. R. & Mostowski, H. S. IL-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor selectively increase HLA-DR and HLA-DP antigens but not HLA-DQ antigens on human monocytes. *J. Immunol.* **144**, 4670–4 (1990).
152. Al-Banna, N., Raghupathy, R. & Albert, M. J. Correlation of Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokine Levels with Histopathological Changes in an Adult Mouse Lung Model of *Campylobacter jejuni* Infection. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1780–1787 (2008).
153. Islam, D., Bardhan, P. K., Lindberg, A. A. & Christensson, B. Shigella infection induces cellular activation of T and B cells and distinct species-related changes in peripheral blood lymphocyte subsets during the course of the disease. *Infect. Immun.* **63**, 2941–2949 (1995).
154. Ziegler-Heitbrock, L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell. Immunol.* **289**, 135–139 (2014).
155. Carlin, L. M. et al. Nr4a1-Dependent Ly6Clow Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. *Cell* **153**, 362–375 (2013).

156. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
157. Matsushima, N. et al. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* **8**, 124 (2007).
158. Tsukamoto, H., Fukudome, K., Takao, S., Tsuneyoshi, N. & Kimoto, M. Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. *Int. Immunol.* **22**, 271–80 (2010).
159. Ferrao, R., Li, J., Bergamin, E. & Wu, H. Structural Insights into the Assembly of Large Oligomeric Signalosomes in the Toll-Like Receptor–Interleukin-1 Receptor Superfamily. *Sci. Signal.* **5**, (2012).
160. Xu, Y. et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111–5 (2000).
161. O’Neill, L. A. J. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.* **226**, 10–8 (2008).
162. Thomas, C., Bazan, J. F. & Garcia, K. C. Structure of the activating IL-1 receptor signaling complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 455–457 (2012).
163. Ramadan, A. & Paczesny, S. Various Forms of Tissue Damage and Danger Signals Following Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
164. Song, W.-C. Crosstalk between Complement and Toll-Like Receptors. *Toxicol. Pathol.* **40**, 174–182 (2012).
165. Zhang, P., Liu, X. & Cao, X. Extracellular pattern recognition molecules in health and diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **12**, 255–257 (2015).
166. Tan, Y. & Kagan, J. C. Microbe-inducible trafficking pathways that control Toll-like receptor signaling. *Traffic* **18**, 6–17 (2017).
167. Ip, W. K. E., Takahashi, K., Moore, K. J., Stuart, L. M. & Ezekowitz, R. A. B. Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. *J. Exp. Med.* **205**, 169–181 (2008).
168. Manukyan, M. et al. Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. *Eur. J. Immunol.* **35**, 911–921 (2005).
169. Hoebe, K. et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* **433**, 523–527 (2005).
170. Zhang, P., Liu, X. & Cao, X. Extracellular pattern recognition molecules in health and diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **12**, 255–257 (2015).
171. Segovia, J. et al. A Randomized Multicenter Comparison of Basiliximab and Muromonab (OKT3) in Heart Transplantation: SIMCOR Study. *Transplantation* **81**, 1542–1548 (2006).
172. Parlakpınar, H. & Gunata, M. Transplantation and immunosuppression: a review of novel transplant-related immunosuppressant drugs. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **43**, 651–665 (2021).
173. Kalil, A. C., Levitsky, J., Lyden, E., Stoner, J. & Freifeld, A. G. Meta-Analysis: The Efficacy of Strategies To Prevent Organ Disease by Cytomegalovirus in Solid Organ Transplant Recipients. *Ann. Intern. Med.* **143**, 870 (2005).
174. Kalil, A., Dakroub, H. & Freifeld, A. Sepsis and Solid Organ Transplantation. *Curr. Drug Targets* **8**, 533–541 (2007).
175. Florescu, D. F. et al. Does increasing immunoglobulin levels impact survival in solid organ transplant recipients with hypogammaglobulinemia? *Clin. Transplant.* **28**, 1249–1255 (2014).
176. Kotton, C. N. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *Am. J. Transplant.* **13**, 24–40 (2013).

177. Emery, V. C. et al. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* **355**, 2032–2036 (2000).
178. Fishman, J. A. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2601–2614 (2007).
179. Hodson, E. M. et al. Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* **365**, 2105–2115 (2005).
180. Kotton, C. N. et al. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation* **102**, 900–931 (2018).
181. Kotton, C. N. et al. International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *Transplantation* **89**, 779–795 (2010).
182. Kotton, C. N. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *Am. J. Transplant.* **13**, 24–40 (2013).
183. Cervera, C. et al. Effect of mammalian target of rapamycin inhibitors on cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients receiving polyclonal antilymphocyte globulins: a propensity score-matching analysis. *Transpl. Int.* **29**, 1216–1225 (2016).
184. Zamora, D. et al. Cytomegalovirus Humoral Response Against Epithelial Cell Entry-Mediated Infection in the Primary Infection Setting After Hematopoietic Cell Transplantation. *J. Infect. Dis.* **221**, 1470–1479 (2020).
185. Fernández-Ruiz, M. et al. Impact of *MBL2* gene polymorphisms on the risk of infection in solid organ transplant recipients: A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Transplant.* **19**, 1072–1085 (2019).
186. Lombardo-Quezada, J. et al. Mannose-Binding Lectin-Deficient Donors Increase the Risk of Bacterial Infection and Bacterial Infection-Related Mortality After Liver Transplantation. *Am. J. Transplant.* **18**, 197–206 (2018).
187. Yazdi, A. S. & Ghoreschi, K. The Interleukin-1 Family. *Adv. Exp. Med. Biol.* **941**, 21–29 (2016).
188. Bruno, M., Matzaraki, V., van de Veerdonk, F. L., Kumar, V. & Netea, M. G. Challenges and Opportunities in Understanding Genetics of Fungal Diseases: Towards a Functional Genomics Approach. *Infect. Immun.* **89**, (2021).
189. Vencovský, J. et al. Higher frequency of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* **44**, 2387–91 (2001).
190. Cantagrel, A. et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **42**, 1093–100 (1999).
191. Perrier, S., Coussediere, C., Dubost, J. J., Albuissou, E. & Sauvezie, B. IL-1 Receptor Antagonist (IL-1RA) Gene Polymorphism in Sjogren's Syndrome and Rheumatoid Arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **87**, 309–313 (1998).
192. Jin, Y. & Ruiz, P. Molecular genetic analysis of interleukin-1 promoter and receptor antagonist tandem repeat polymorphisms among HLA-identical renal transplant recipient and donor pairs. *Transplant. Proc.* **40**, 1329–32 (2008).
193. Manchanda, P. K., Bid, H. K., Kumar, A. & Mittal, R. D. Genetic association of interleukin-1 β and receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism with allograft function in renal transplant patients. *Transpl. Immunol.* **15**, 289–296 (2006).
194. Agrawal, S. et al. Interleukin-1 gene cluster variants in hemodialysis patients with end stage renal disease: An association and meta-analysis. *Indian J. Nephrol.* **25**, 34 (2015).

195. Ortiz, L. A. et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 8407–8411 (2003).
196. Phinney, D. G. A SAGE View of Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Stem Cells* **2**, 1–10 (2009).
197. Wujcicka, W. et al. TLR9 2848 GA Heterozygotic Status Possibly Predisposes Fetuses and Newborns to Congenital Infection with Human Cytomegalovirus. *PLoS One* **10**, e0122831 (2015).
198. Taniguchi, R. et al. Polymorphisms in TLR-2 are associated with congenital cytomegalovirus (CMV) infection but not with congenital CMV disease. *Int. J. Infect. Dis.* **17**, e1092–e1097 (2013).
199. Tesar, B. M. et al. The Role of Hyaluronan Degradation Products as Innate Alloimmune Agonists. *Am. J. Transplant.* **6**, 2622–2635 (2006).
200. Ducloux, D. et al. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int.* **67**, 2454–2461 (2005).
201. Palmer, S. M. et al. The Role of Innate Immunity in Acute Allograft Rejection after Lung Transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 628–632 (2003).
202. McKay, D., Shigeoka, A., Rubinstein, M., Surh, C. & Sprent, J. Simultaneous deletion of MyD88 and Trif delays major histocompatibility and minor antigen mismatch allograft rejection. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1994–2002 (2006).
203. Lorenz, E. et al. Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **7**, 384–387 (2001).
204. Leventhal, J. S. & Schröppel, B. Toll-like receptors in transplantation: sensing and reacting to injury. *Kidney Int.* **81**, 826–832 (2012).
205. Simon, T., Opelz, G., Wiesel, M., Ott, R. C. & Süsal, C. Serial Peripheral Blood Perforin and Granzyme B Gene Expression Measurements for Prediction of Acute Rejection in Kidney Graft Recipients. *Am. J. Transplant.* **3**, 1121–1127 (2003).
206. Aquino-Dias, E. C. et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int.* **73**, 877–884 (2008).
207. Lozano, F. et al. Novel MASP2 variants detected among North African and Sub-Saharan individuals. *Tissue Antigens* **66**, 131–135 (2005).
208. Kjaer, T. R. et al. Oligomerization of Mannan-binding Lectin Dictates Binding Properties and Complement Activation. *Scand. J. Immunol.* **84**, 12–19 (2016).
209. Mansfield, J. C. et al. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* **106**, 637–642 (1994).
210. Cauci, S., Di Santolo, M., Ryckman, K. K., Williams, S. M. & Banfi, G. Variable number of tandem repeat polymorphisms of the interleukin-1 receptor antagonist gene IL1RN: a novel association with the athlete status. *BMC Med. Genet.* **11**, 29 (2010).
211. Bioque, G. et al. Allelic polymorphism in IL-1 β and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) genes in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* **102**, 379–383 (2008).
212. Rider, L. G. et al. Polymorphisms in the IL-1 receptor antagonist gene VNTR are possible risk factors for juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Clin. Exp. Immunol.* **121**, 47–52 (2001).
213. Barkhuizen, M. et al. Ethnic differences in allelic associations of the interleukin-1 gene cluster in South African patients with inflammatory bowel disease (IBD) and in control individuals. *Immunogenetics* **52**, 249–254 (2001).

214. Magyarics, Z., Csillag, A., Pazmandi, K., Rajnavolgyi, E. & Bacsí, A. Identification of plasmacytoid pre-dendritic cells by one-color flow cytometry for phenotype screening. *Cytom. Part A* **73A**, 254–258 (2008).
215. Koumbi, L. J. et al. Dendritic Cells in Uninfected Infants Born to Hepatitis B Virus-Positive Mothers. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 1079–1085 (2010).
216. Shin, S. et al. Differences in Circulating Dendritic Cell Subtypes in Pregnant Women, Cord Blood and Healthy Adult Women. *J. Korean Med. Sci.* **24**, 853 (2009).
217. Sorg, R. V., Kögler, G. & Wernet, P. Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c-population. *Blood* **93**, 2302–7 (1999).
218. Schreibelt, G. et al. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 1573–1582 (2010).
219. Ito, T. et al. Plasmacytoid Dendritic Cells Regulate Th Cell Responses through OX40 Ligand and Type I IFNs. *J. Immunol.* **172**, 4253–4259 (2004).
220. Blom, B., Ho, S., Antonenko, S. & Liu, Y.-J. Generation of Interferon α -Producing Predendritic Cell (Pre-Dc)2 from Human Cd34+ Hematopoietic Stem Cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1785–1796 (2000).
221. Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F. & Patterson, S. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* **101**, 4505–4511 (2003).
222. Tel, J. et al. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood* **121**, 459–467 (2013).
223. Tel, J. et al. Natural Human Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Antigen-Specific T-Cell Responses in Melanoma Patients. *Cancer Res.* **73**, 1063–1075 (2013).
224. Akira, S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 5–11 (2003).
225. Manuel, O., Pascual, M., Trendelenburg, M. & Meylan, P. R. Association Between Mannose-Binding Lectin Deficiency and Cytomegalovirus Infection After Kidney Transplantation. *Transplantation* **83**, 359–362 (2007).
226. Cervera, C. et al. Donor mannose-binding lectin gene polymorphisms influence the outcome of liver transplantation. *Liver Transplant.* **15**, 1217–1224 (2009).
227. Cervera, C. et al. Influence of Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphisms on The Invasiveness of Cytomegalovirus Disease After Solid Organ Transplantation. *Transplant. Proc.* **41**, 2259–2261 (2009).
228. Wu, W. et al. Human mannose-binding lectin inhibits human cytomegalovirus infection in human embryonic pulmonary fibroblast. *APMIS* **120**, 675–682 (2012).
229. Van Breedam, W., Pöhlmann, S., Favoreel, H. W., de Groot, R. J. & Nauwynck, H. J. Bitter-sweet symphony: glycan–lectin interactions in virus biology. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 598–632 (2014).
230. Summerfield, J. A. Clinical potential of mannose-binding lectin-replacement therapy. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 770–773 (2003).
231. Valdimarsson, H. Infusion of plasma-derived mannan-binding lectin (MBL) into MBL-deficient humans. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 768–769 (2003).
232. Valdimarsson, H. et al. Human Plasma-Derived Mannose-Binding Lectin: A Phase I Safety and Pharmacokinetic Study. *Scand. J. Immunol.* **59**, 97–102 (2004).
233. Petersen, K. A. et al. Phase I Safety, Tolerability, and Pharmacokinetic Study of Recombinant Human Mannan-Binding Lectin. *J. Clin. Immunol.* **26**, 465–475 (2006).

234. Azizi, G. et al. Mannose-Binding Lectin Protein Deficiency Among Patients with Primary Immunodeficiency Disease Receiving IVIG Therapy. *Endocrine, Metab. Immune Disord. - Drug Targets* **18**, 175–183 (2018).
235. Santtila, Savinainen & Hurme. Presence of the IL-1RA Allele 2 (*IL1RN*2*) is Associated with Enhanced IL-1 β Production In Vitro. *Scand. J. Immunol.* **47**, 195–198 (1998).
236. Hurme, M. & Santtila, S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1 β genes. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2598–2602 (1998).
237. Wilkinson, R. J. et al. Influence of Polymorphism in the Genes for the Interleukin (IL)-1 Receptor Antagonist and IL-1 β on Tuberculosis. *J. Exp. Med.* **189**, 1863–1874 (1999).
238. Alves De Souza, C. et al. A link between osteomyelitis and *IL1RN* and *IL1B* polymorphisms—a study in patients from Northeast Brazil. *Acta Orthop.* **88**, 556–561 (2017).
239. Jeremias, J., Giraldo, P., Durrant, S., Ribeiro-Filho, A. & Witkin, S. S. Relationship between *Ureaplasma urealyticum* Vaginal Colonization and Polymorphism in the Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene. *J. Infect. Dis.* **180**, 912–914 (1999).
240. Gresnigt, M. S. et al. A Polysaccharide Virulence Factor from *Aspergillus fumigatus* Elicits Anti-inflammatory Effects through Induction of Interleukin-1 Receptor Antagonist. *PLoS Pathog.* **10**, e1003936 (2014).
241. Wojtowicz, A. et al. *IL1B* and *DEFB1* Polymorphisms Increase Susceptibility to Invasive Mold Infection After Solid-Organ Transplantation. *J. Infect. Dis.* **211**, 1646–1657 (2015).
242. Wojtani, M. D. K. H., de Aguiar, L. M., Baracat, E. C. & Linhares, I. M. Association between mannose-binding lectin and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and recurrent vulvovaginal candidiasis. *Arch. Gynecol. Obstet.* **285**, 149–153 (2012).
243. Devaraj, S. et al. Increased Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR4 Expression in Monocytes from Patients with Type 1 Diabetes: Further Evidence of a Proinflammatory State. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 578–583 (2008).
244. Kimbrell, D. A. & Beutler, B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 256–267 (2001).
245. Tapping, R. I., Akashi, S., Miyake, K., Godowski, P. J. & Tobias, P. S. Toll-Like Receptor 4, But Not Toll-Like Receptor 2, Is a Signaling Receptor for *Escherichia* and *Salmonella* Lipopolysaccharides. *J. Immunol.* **165**, 5780–5787 (2000).
246. Muzio, M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, M. & Mantovani, A. The Human Toll Signaling Pathway: Divergence of Nuclear Factor κ B and JNK/SAPK Activation Upstream of Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 (TRAF6). *J. Exp. Med.* **187**, 2097–2101 (1998).
247. Boehme, K. W., Guerrero, M. & Compton, T. Human Cytomegalovirus Envelope Glycoproteins B and H Are Necessary for TLR2 Activation in Permissive Cells. *J. Immunol.* **177**, 7094–7102 (2006).
248. ATHANASSOPOULOS, P. et al. Peripheral blood dendritic cells in human end-stage heart failure and the early post-transplant period: evidence for systemic Th1 immune responses. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* **25**, 619–626 (2004).
249. Aliprantis, A. O. et al. Cell Activation and Apoptosis by Bacterial Lipoproteins Through Toll-like Receptor-2. *Science (80-.)*. **285**, 736–739 (1999).
250. Becker, I. et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* **130**, 65–74 (2003).

251. Chen, D. et al. Expression of TLR2, TLR3, TLR4, and TLR7 on pulmonary lymphocytes of *Schistosoma japonicum* -infected C57BL/6 mice. *Innate Immun.* **25**, 224–234 (2019).
252. Hormaza, X. Los receptores tipo Toll: 'los ojos de la inmunidad innata'. *Asoc. Colomb. Dermatología Cirugía Dermatológica* **12**, (2004).
253. Chong, A. J. et al. Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **128**, 170–179 (2004).
254. Frantz, S. et al. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J. Clin. Invest.* **104**, 271–280 (1999).
255. Maldonado-López, R. et al. CD8 α ⁺ and CD8 α [–] Subclasses of Dendritic Cells Direct the Development of Distinct T Helper Cells In Vivo. *J. Exp. Med.* **189**, 587–592 (1999).
256. Krejsek, J. et al. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 on innate immunity cells modulated by cardiac surgical operation. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **68**, 749–758 (2008).
257. Hosseinzadeh, M. et al. Increased Expression of Toll-Like Receptors 2 and 4 in Renal Transplant Recipients that Develop Allograft Dysfunction: A Cohort Study. *Iran. J. Immunol.* **14**, 24–34 (2017).
258. Methe, H. et al. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* **111**, 2654–61 (2005).
259. Földes, G. et al. Fluvastatin reduces increased blood monocyte Toll-like receptor 4 expression in whole blood from patients with chronic heart failure. *Int. J. Cardiol.* **124**, 80–5 (2008).
260. Yew, K.-H., Carpenter, C., Duncan, R. S. & Harrison, C. J. Human Cytomegalovirus Induces TLR4 Signaling Components in Monocytes Altering TIRAP, TRAM and Downstream Interferon-Beta and TNF-Alpha Expression. *PLoS One* **7**, e44500 (2012).
261. Kang, Y. J. et al. Calcineurin Negatively Regulates TLR-Mediated Activation Pathways. *J. Immunol.* **179**, 4598–4607 (2007).
262. Lee, J.-I. et al. CYCLOSPORINE A INHIBITS THE EXPRESSION OF COSTIMULATORY MOLECULES ON IN VITRO-GENERATED DENDRITIC CELLS. *Transplantation* **68**, 1255–1263 (1999).
263. Sauma, D. et al. Cyclosporine preconditions dendritic cells during differentiation and reduces IL-2 and IL-12 production following activation: a potential tolerogenic effect. *Transplant. Proc.* **35**, 2515–2517 (2003).
264. Singh, N. Infectious complications in organ transplant recipients with the use of calcineurin-inhibitor agent-based immunosuppressive regimens. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**, 342–345 (2005).
265. Kahan, B. D. Individuality: the barrier to optimal immunosuppression. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 831–838 (2003).
266. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 762–774 (2011).
267. Lund, F. et al. Murine CD38: an immunoregulatory ectoenzyme. *Immunol. Today* **16**, 469–473 (1995).
268. Velin, P. et al. [Double mother-fetus HIV-1 and toxoplasma contamination]. *Presse Med.* **20**, 960 (1991).
269. Partida-Sánchez, S., Randall, T. D. & Lund, F. E. Innate immunity is regulated by CD38, an ecto-enzyme with ADP-ribosyl cyclase activity. *Microbes Infect.* **5**, 49–58 (2003).
270. Talaszka, A. & Le Monies de Sagazan, H. [Silent mesenteric ischemia in chronic dialysis patients]. *Presse Med.* **20**, 961 (1991).

271. Venet, C. et al. Endotoxaemia in patients with severe sepsis or septic shock. *Intensive Care Med.* **26**, 538–544 (2000).
272. Azanan, M. S. et al. Immunity in young adult survivors of childhood leukemia is similar to the elderly rather than age-matched controls: Role of cytomegalovirus. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1715–1726 (2016).
273. Volk, H.-D., Reinke, P. & D'cke, W.-D. Clinical Aspects: From Systemic Inflammation to 'Immunoparalysis'. in *CD14 in the Inflammatory Response* 162–177 (KARGER, 1999). doi:10.1159/000058753.
274. WATANABE, Y., LEE, S. & ALLISON, A. C. Control of the Expression of a Class II Major Histocompatibility Gene (HLA-DR) in Various Human Cell Types: Down-Regulation by IL-1 but not by IL-6, Prostaglandin E2, or Glucocorticoids. *Scand. J. Immunol.* **32**, 601–609 (1990).
275. de Waal Malefyt, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* **174**, 915–924 (1991).
276. Tillinger, W., Jilch, R., Waldhoer, T., Reinisch, W. & Junger, W. Monocyte Human Leukocyte Antigen–DR Expression—A Tool to Distinguish Intestinal Bacterial Infections From Inflammatory Bowel Disease? *Shock* **40**, 89–94 (2013).
277. Wolk, K., Kunz, S., Crompton, N. E. A., Volk, H.-D. & Sabat, R. Multiple Mechanisms of Reduced Major Histocompatibility Complex Class II Expression in Endotoxin Tolerance. *J. Biol. Chem.* **278**, 18030–18036 (2003).
278. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F. & Wang, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* **2**, 1 (2014).
279. Ziegler-Heitbrock, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74–80 (2010).
280. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 584–592 (2007).
281. Blumenstein, M. et al. CYTOKINE PRODUCTION PRECEDES THE EXPANSION OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES IN HUMAN SEPSIS. *Shock* **8**, 73–75 (1997).
282. Hashimoto, D., Miller, J. & Merad, M. Dendritic Cell and Macrophage Heterogeneity In Vivo. *Immunity* **35**, 323–335 (2011).
283. van den Berg, W. B. Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **59**, 81i – 84 (2000).
284. Roederer, M. Distributions of autofluorescence after compensation: Be panglossian, fret not. *Cytom. Part A* **89**, 398–402 (2016).
285. <https://www.uth.edu/imm/service-centers/flow-cytometry/fmo-controls>
286. <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-fmo-controls.html>
287. <https://expert.cheekyscientist.com/why-use-fmo-controls-multicolor-flow-cytometry-experiment>.

The background of the page features a dark blue gradient. On the right side, a DNA double helix is depicted, with one strand highlighted in orange and red. Scattered across the left and bottom areas are several stylized, semi-transparent cells, each with a darker blue nucleus.

VIII. ANEXOS

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Gen "MBL2" del nucleotido 1 hasta el 7869

1 ccctacattg ctgagcccag cctctccct cactctgagg catctgccag agccccaggc
61 tagagggccca gcgtccttgt cactgagtcc ctgctctgca gaaacaccag taagtcattt
121 ctggtgaata aatctgggtt tccggatcaa gggtttgggg agctgacatg accctggagg
181 catggaggag gctttctagg ggtgggggga gtgggatgga aagcagaaat caggttgagg
241 atgtctcttt ttctgcttgt gctggagcat ctgtgacttt cctccattat ctgttcatct
301 gcagtggaga ctgtcttgtg tttcaaaggg aaacttgag gcttagacct atggggctag
361 gctgctgagg tttcttaggg ggcaatagct ggaagaaagc tctgaagaac aaatgaaagg
421 ttaatactga gaaatgggag gaggattcaa ggcaagtttt ctaattgccca gtggtttttg
481 actcacagaa catggggaat **tcctgccaga aagtagagag** gtatttagca ctctgccagg
541 gccaacgtag taagaaattt ccagagaaaa tgcttacca ggcaagcctg tctaaaacac
601 caaggggaag caaactccag ttaattctgg gctgggttgg tgactaaggt tgaggttgat
661 ctgaggttga gaccttcctc ttggatcac cagcttcag ctgaggcct gccaatgagt
721 aatgatagt taacaggtcc tggaggggaa tcagctgcc agatacaaag atgggattca
781 ggtggcagat ggacccgaag aggacatgga gagaaagagg aagctcctac agacacctgg
841 gttccactc attctattc ctaagctaa caggcataag ccagctggca atgcacggtc
901 ccattgttc tactgccac cgaaagcatg ttatagtct tccagcagca acgccaggtg
961 tctaggcaca gatgaacccc tccttaggat cccactgct catcatagtg cctacctttg
1021 ttaaagtact agtcacgcag tgcacaagg aatgtttact ttccaatc cccagctaga
1081 ggccagggat gggatcatc tttctatata gcctgcacc agatttagg acagagggca
1141 tgctcggtaa atatgtgtc attactgag attaacctc cctgagttt ctacaccaa
1201 ggtgaggacc atgtccctgt ttcatcact ccctctcct ctctgagta tgggtgcagc

1261 gtcttactca gaaactgtga cctgtgagga tgcccaaaag acctgccctg cagtgattgc
1321 ctgtagctct ccaggcatca acggcttccc aggcaaagat gggcgtgatg gcaccaaggg
1381 agaaaagggg gaaccaggta cgtgttgggc tgttctgtct ctgcaattct ttaccttcca
1441 gaggaactg cctggggata tgaggagact gatgtcctat ttgagtatat ttttctcaac
1501 tatactgtaa ctcaaacag agattcagct ctatttctct ggcatctcag aattccacac
1561 agcagtttgt gactaatagt tgtcttgcca gcccaggaaa gtggcccaca ggtcaggcca
1621 tcccgtggga cacaggatga attttcttc tctgggtcat tgtcatgtca gaccctatt
1681 cacttcagta gggatggcac caggttcaag aggccaaaga agagatggag tcagcaaaca
1741 aacataggtt ttactggggg aatctgttta caggagatc cagcagcagt gggctggaca
1801 ggagaacaac aactactggt aaaaacaaat gcagtaatt ttactttgc accctcctg
1861 cagcaacctc cagtgggcaa ctttatttct taagtattg ctctcaggtg cccaccatac
1921 agttattgag agcagtgtc agaaaggta gtcctgggtc aaggtctctt ttctctgag
1981 aagggttgg gcatcaaact ctgaagaga gagagcaaga acatagatat taagtcacat
2041 ttcctttgtc ttcaacagg ccaagggtc agaggcttac agggccccc tggaagtgtg
2101 gggcctccag gaaatccagg gccttctggg tcaccaggac caaaggcca aaaaggagac
2161 cctggaaaa gtccgggtaa ggacccagc aaggtctgag ctgacttcac ccagggttct
2221 gagacctga gtatctgga agaggtgccc ctctctgt tcctcaaag gaagataccc
2281 aaatttgctt tctgaccag tgcctcagc cctcttca ttcttagag ctagggaat
2341 tcctataagt gcctgagta agacttaca actttcaag acaactcct catcaggcac
2401 tccctgaag agctgagcct ggattctcca tcagctgaaa cagtctaag tgaggcctg
2461 gtcttagagg gagaaaacag gccatctaag tgtgggctta ttatacctat tttacaaaa
2521 gcatgtaacc atggtatgtc atatttact tcataagaaa ccaagccaaa gcttaatagc
2581 ttaaaaacat agccgtcaat ttaaatcaca agtctgtggg tcggccatgt gatttctctg
2641 ctggtttaag ctgggcttac ccacatgtc gtggtcaact gatggccaat agtctcactc
2701 atgtgtctgg ctgttctctg aatgttagct ggagtatga gggtaattga accacatctc

2761 tcatcatcca acagggcttg ttacatagc agtgattaca ggattcccaa gagtagaaat
2821 aagataggct ttaggcttct tgaagactca gagcacatta tcatttctgt cagactgtat
2881 tggtaaaaac aagtcacaag gccagcccag attcaaggag tggggaata gactcatgtc
2941 ttaatgcgag gagctgtacc ctattgaggc catttttgcc atctactaca acaagtatt
3001 tgctcatgcc ctcccactt ggataatggg caactcaca aaatcttgg ttctgacta
3061 acagaacaaa cctggaaaaa acaaaaacaa aacaaaagac atcaaaagca aaacctctcc
3121 aaagacaaaa actctgcaat cttttcgtc actcttcacc aggtcataat agagtaacgc
3181 ctcaagagat ttcttttag tttagataga acaatttatt tgaaaaaaaa atctgtgaag
3241 aacctggcat atggattgct aggtaatcag ggagtatatg tgtgcatgtg atatgtatgc
3301 gtactttggg atacagtaaa cagacaaaga gggacattg gggttgatg gaaatagcga
3361 ttttcattc ttgggcttt tcagtatttt ttatttcct tcaaagtga aacatcaatg
3421 taaaataagc tttttttc agtttgaata agatactcca ctcccttga tatgcacagt
3481 tctgaggctc ctctcaaca atgctcttt actttgtct aattttctag atggtgatag
3541 tagcctggct gcctcagaaa gaaaagctct gcaaacagaa atggcacgta tcaaaaagt
3601 taagctttt ctctactct ccaggcagct tgaagttgg gaaaaataga atgcaacaaa
3661 tattgttga atgcatataa tttctgtac cctgctaggc atttctata ttctacctc
3721 atgaaattct cacaacattt tggtagaaat ggaggcaaag ggaagttaa ttactgttc
3781 aatgcacag agctaataaa tggcaggggt ggttataga tggaagtcag tctgactga
3841 gagaccctaa tccttaccg tctgatattg ctactgaaa atgggactta tatcccttg
3901 ttgactggg attgagacct ggccgtgggg tctaacctgc ctggggcaaa tatttcaga
3961 catttttgt ttggtctcaa gtaacaatt tagaattcag aagtcacaa tatatgtct
4021 ttagaattct gatctgaaag cacagagagg ctttgtacc agtctgtctg ttacatttg
4081 ggttgccata ttaacaaat aaaaagacaa agcaccagtt aaattggatt tcagctgaaa
4141 aacattttta gtataagtgt gtctgaaaa ttatatggga gatatactaa aatattcatt
4201 gttgtctga aattcaaatt taactggaca tactatatt tatccggcaa ctgtactta

4261 gaagactttt tcttgagaaa taccttgagt tgggctaag gatgagtcag tttcacccac
4321 ttttcacat ttagggctc accttctctc tgggcaaaca agttgggaac aagttcttcc
4381 tgaccaatgg tgaaataatg accttgaaa aagtgaaggc cttgtgtgtc aagttccagg
4441 cctctgtggc cccccagg aatgctgcag agaatggagc cattcagaat ctcatcaagg
4501 aggaagcctt cctgggcatc actgatgaga agacagaagg gcagtttgtg gatctgacag
4561 gaaatagact gacctacaca aactggaacg agggatgaacc caacaatgct ggttctgatg
4621 aagatttgtt attgctactg aaaaatggcc agtggaatga cgtccctgc tccacctccc
4681 atctggcctt ctgtgagttc cctatctgaa gggcatac actcaggccc tccttgtctt
4741 ttactgcaa cccacaggcc cacagatgc ttgaaaagat aaattatc aatttctca
4801 tatccagtat ttttctttt gtgggcaatc actaaaaatg atcactaaca gcaccaacaa
4861 agcaataata gtagtagtag tagttagcag cagcagtagt agtcatgcta attatataat
4921 attttaata tatactatga ggccctatct ttgcatcct acattaatta tctagttaa
4981 ttaatctgta atgcttctga tagtgtaac ttgctgcagt atgaaaataa gacggattta
5041 ttttccatt tacaacaaac acctgtgctc ttttgagcct tcctttctgt ttgggtagag
5101 ggctccccta atgacatcac cacagttaa taccacagct tttaccaag ttcaggtat
5161 taagaaaatc tatttgtaa ctttctctat gaactctgtt ttcttctaa tgagatatta
5221 aaccatgtaa agaacataaa taacaaatct caagcaaaca gttcacaaa ttctcacaca
5281 catacatacc tatatactca ctttctagat taagatatgg gacattttg actccctaga
5341 agccccgtta taactctcc tagtactaac tcctaggaaa atactattct gacctcatg
5401 actgcacagt aatttctgt gttataaac attgtatagt tggaatcata ttgtgtgtaa
5461 tgtgtatgt cttgttact cagaattaag tctgtgagat tcattcatgt catgtgtaca
5521 aaagttcat cttttcatt gccatgtagg gttccctat attaataatc ctcagttcat
5581 ccattctatt gtaataggc acttaagtgg cttccaattt ttggccatga ggaagagaac
5641 ccacgaacat tcctggactt gtcttttggg ggacatgggt cactaattc actacctatc
5701 caggagtgga actggtagag gatgaggaaa gcatgtattc agctttagta gatattacca

5761 gttttcctaa gtgattgtat gaatttatgc tcctaccggc aatgtgtggc agtcctagat
5821 gctctatgtg ctgttaaaaa gtcaatgttt tcagttctct tgattttcat tattcctgtg
5881 gatgtaaagt gatatttccc catggtttta atctgtattt cccaacatg taataagggt
5941 gaacactttt ttatatgctt attgggcact tgggtatctt ttttgtgaa gtacccgttc
6001 acatttttgt attttgtta aattagttag ccaatattt tcttactgat tttaagtta
6061 ttttacatt ctgaatatgt ctttttaaat gtgtattaca aatatttgc tagttttga
6121 ctgtctccta atgttgaatt ttgatgaaca aaatttccta atttgagaa agtcttatt
6181 attcatattt tctttcaaaa ttagtgcttt ttgtgtcatg ttaagaaat tttgcccac
6241 cccaaaatca taagatattt tcatgattt tgaaaccatg aagagattt tcatgattt
6301 gaaatcatga agatattttt ccatttttt ctaatagttt tattaataaa cattctatct
6361 attcctggta gaatagatat ccactgaga cagcactatg taggaaagac cattttcct
6421 ccactgaact aggggtgggc attttgtaa gttaggtaac tgtatgtgtg tgtgtctgtt
6481 tctgggctgt ctattctagt ctattgttg atgcttgtgt caaacagtac actatcttaa
6541 ttattgtaca ttatagttg taactatagt ccagcttgt tcttctaaa gtcaagattt
6601 ccatataaat attagaaaca gcttctcaat ttctacaaaa tcctgatgag gtttctactg
6661 ggaccacatt gagtctatca atcaactat gcagaactgg caacttacta ctgaatctt
6721 aatcaatgtt catcatgtat cgcttcatgt aactagaatt tctttaactt aattgctatg
6781 tttgacatt ttagttaa aaacctgta tatctgttt tgggtgttt agtgattta
6841 ataatatatt taaatattt tttctttct attgtgtac acagaaatac agttaagttt
6901 tgtgtgtagt ctacgatgt ttagtaaact caataagttt atttctaaa tctagtaatt
6961 tgtagattcc tctggattt gtatatgcat agtcatgtaa gctgaaaata tggcaatact
7021 tgcttctcc caattgctt acctttttc ttaccttatt gcactggta gcaaccccaa
7081 tacagagacc accagatcag gtatagactc ctgaaagaca atataatgaa gtgctccagt
7141 caggcctatc taaactggat tcacagctct gtcacttaat tgctacatga tctagagcca
7201 gttactttgt gttcagcca tgtatttgca gctgagagaa aataatcatt ctatttcat

7261 gaaaattgtg gggatgatga aataagttaa cacctttaa gtgtgtagta aagtacagg
7321 atactatatt ttaggtctta atacacacag ttatgccgct agatacatgc ttttaatga
7381 gataatgtga tattatacat aacacatatt gatttttaa aattaaatca accttgctt
7441 gatggaataa actccattta gtcacattt atcttgta tgtattattg gagtggactt
7501 gtaaatagtt tgttagaac gttgcacct atgtcatga gagatactag cttttttcc
7561 cctcctaatt gcacttgcta tggttgggg tcaatgttat gtaagcctca taaaatgag
7621 ctgtgatgtg ctctcatgct cttattatc taaaataatt tgtgtaaat tatacttaa
7681 tgtagataa attcaccagt gaagccatct tggaatggg tttctgttg ggaaatgatt
7741 ttaatttcag atttaattc ctcatgatct aaacctattc atgtttctg tctttgttc
7801 ggtttcagt agttatatt ttcaatgaat gtgtcaatt cctctgaata tatatgatt
7861 ggcataaa

ANEXO 2. Hoja de información al paciente y consentimiento informado (Versión 2.0)

TÍTULO DE PROTOCOLO: ESTUDIO MULTICÉNTRICO INTERNACIONAL DE ESCALAS DE RIESGO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO

Nº DE PROTOCOLO: FIS 15 01472

HOJA DE INFORMACIÓN

Por favor lea atentamente este documento en el cual le proponemos participar en un estudio de pacientes trasplantados Cardiacos, de Pulmón, de Riñón y de Hígado.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Realización de un estudio inmunológico básico añadido a las pruebas de rutina que a Usted se le realizan. Se desea evaluar si la determinación en sangre de estos marcadores del sistema inmune (defensas) en distintos momentos pueden ser útiles para saber qué pacientes están en mayor riesgo de infectarse o de tener una peor evolución.

El estudio lo coordina el Servicio de Inmunología del Hospital Gregorio Marañón de Madrid, conjunta y coordinadamente con distintos Servicios Colaboradores (Cardiología, Nefrología, Digestivo, Cuidados Intensivos post-Operatorios, Microbiología, Cirugía Cardiovascular, Anestesia).

Participarán todos los pacientes adultos que sean programados para trasplante o que ya están trasplantados. Sera estudiado únicamente durante su estancia cuando acuda a revisiones periódicas posteriormente. La extracción de las muestras de sangre será realizada por el personal habitual siempre y cuando coincida con la analítica de rutina protocolizada para estos pacientes, es decir que no se realizará una venopunción extraordinaria para estos estudios. La primera muestra es cuando Usted es evaluado como candidato a trasplante e incluido en la lista de espera. Dependiendo de los subestudios la segunda se obtendrá entre 7 y 15 días tras el trasplante, la tercera el día 30 post trasplante y la cuarta a los 30 días post trasplante.

Entre los parámetros que se evaluarán se **incluye un estudio genético**. Para ello, el protocolo de estudio cumple con los apartados correspondientes de la Ley de Investigación Biomédica 14/2007. Las muestras biológicas serán almacenadas en congeladores del Servicio de Inmunología. Posteriormente se conservarán para la posible realización de estudios futuros en la una Colección de Muestras registrada cuyo titular es el Investigador Principal de este proyecto (Dr Javier Carbone). Es posible, si ello es necesario, que las muestras sean enviadas a otros investigadores para los mismos fines de la línea de investigación de Inmunología del Trasplante.

Se obtendrán los datos clínicos del paciente de la historia clínica y eventualmente se realizará algunas preguntas adicionales a los pacientes si fuera necesario.

Los posibles riesgos de su participación en el estudio están relacionados con la punción venosa para la extracción de sangre, la cual coincidirá con días en que también estén programadas extracciones de rutina.

La participación es voluntaria y debe ser tomada libremente.

Si decide aceptar, usted podrá retirar su consentimiento en cualquier momento del estudio.

La decisión que tome no afectará a la relación con su médico, y seguirá recibiendo el mejor tratamiento posible.

Asimismo, su médico podrá retirarle del estudio en cualquier momento, si considera que ello es lo más apropiado para el paciente.

Usted va a ser tratado exactamente igual que si no estuviera participando en el estudio.

Para el cumplimiento de los objetivos del estudio es necesario que sepamos su evolución clínica, por lo que en caso de abandonar el Hospital por alguna razón (por ejemplo, desplazamiento a otro centro) necesitaríamos contar con una dirección o teléfono de contacto para saber dicha situación. Dicha información permanecerá en su Historia Clínica, por tanto es confidencial.

Usted hará las mismas visitas médicas que habitualmente se programan en los pacientes.

La duración prevista del estudio es de tres años, pero el tiempo de participación de cada paciente puede ser variable.

Confidencialidad de los datos: Los datos del estudio se recogerán en una base de datos, para realizar el análisis estadístico. Su nombre no aparecerá en ningún documento del estudio, sólo se le asignará un número de paciente al inicio del mismo. Los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras, pueden ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle, manteniéndose en todo momento su confidencialidad.

El tratamiento, comunicación y cesión de los datos de carácter personal, se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Según la citada Ley, el consentimiento para el tratamiento de sus datos personales y para su cesión es revocable. Por lo tanto, en cualquier momento usted puede ejercer su derecho de acceso, rectificación, oposición y cancelación de sus datos dirigiéndose a: Dr. Javier Carbone, Servicio de Inmunología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Teléfono 91 4265180.

Los resultados de este estudio serán presentados a las Autoridades Sanitarias, una vez finalizado. Este estudio está aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Por favor, no dude en preguntar al médico responsable en el estudio acerca de cualquier duda que tenga o si desea disponer de mayor información.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ (nombre y apellidos),

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: _____ (nombre y apellidos del investigador).

Comprendo que la participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera.
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en este estudio.

Firma del Paciente: _____ Fecha: _____

Firma del Investigador: _____ Fecha: _____

ANEXO 3. Tabla donde se recogen características del fenotipo/genotipo MBL en distintos estudios

	Autor,año	Fecha de reclutamiento	Tipo estudio	Tamaño muestra	Aloinjerto	Fenotipo	
1	Berger SP et al., 2005	Enero de 1990 a diciembre de 1994	NR	266	Riñon	<400ng/ml; >400ng/ml	
2	JT Bay et al., 2012	Desde 1998 hasta finales de 2009	Prospectivo	544	Riñon	<454ng/ml; >454ng/ml	
3	Dela Golshayan et al., 2015	NR	Prospectivo	710	Riñon	<678,2ng/ml; >678,2ng/ml	
4	M. Ibernón et al., 2014		Revisión				
5	H.L. Stevenson et al., 2013	de 2010 a 2011		1687 pacientes pre y post-trasplante en estudio de genotipado MBL. La concentración sérica de proteína MBL también fue medido en 807	Riñón 1106 Riñón/páncreas 98 Riñón/corazón 1 Riñón/pulmón 2 Riñón/hígado 34 Sólo hígado 412 Resección hepática 14 Hígado/gastrointestinal 3 Hígado/corazón 2 Hígado/pulmón 1 Hígado/intestino delgado 1 Corazón solo 2 Pulmón solamente 4 Intestino delgado	NR	
6	Malcolm W. Turner, 1996; Sheriff S et al.1994; Sanclemente G et al.2014		Revisión				

	Genotipo	ELISA	Tipo detección proteico
	<400ng/ml (A/O o O/O), >400ng/ml (A/A)	Casero	Monómeros y oligómeros de orden bajo también oligómeros de orden alto / proteína activa e inactiva. Un ELISA en el que las placas se recubren con el anticuerpo mAb 3E7 que captura oligómeros de MBL de bajo y alto orden, tal como menciona P. Garred et al 2003.
	<454ng/ml (XA/YO or YO/YO) BAJO >454ng/ml (YA/YA, YA/XA, XA/XA,YA/YO) NORMAL A ALTO	Casero	Proteína activa, el anticuerpo utilizado tanto para la captura como para la detección fue un anti-MBL monoclonal de ratón (HYP-131-01) disponible comercialmente en Bioporto, Dinamarca. (misma casa comercial que el ELISA de tesis)
	<678,2ng/ml (XA/YO ,YO/YO, XA/XA) INTERMEDIO O BAJO >678,2ng/ml (YA/YA, YA/XA,YA/YO) ALTO	MBL Oligomer Elisa Kit, Bioporto Diagnostics, Hellerup, Denmark	MBL funcional
			Los principales problemas en el desarrollo de un sistema de clasificación sérica MBL son los diferentes ensayos de concentración sérica de proteína, que detectan diferentes formas moleculares de MBL. Diferentes técnicas ELISA
	O/O DEFICIENTE; A/O INTERMEDIO; A/A ALTO	R&D System's Quantikine® Human MBL ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN)	Formas oligoméricas de MBL humano natural y recombinante.
			Aunque MBL puede formar varias formas oligoméricas, hay indicios de que los dímeros y trímeros no son biológicamente activos y al menos se necesita una forma de tetrámero para la activación del complemento. tetrámeros a hexámeros siendo las formas efectivas

	Autor,año	Fecha de reclutamiento	Tipo estudio	Tamaño muestra	Aloinjerto	Fenotipo	
7	Summerfield JA 2003; Valdimarsson H et al.2004, Valdimarsson H 2003; Petersen KA et al.2006		Ensayo clinico	Sujetos masculinos sanos, pacientes deficientes en MBL.			
8	Lozano et al., 2005	NR	Analisis tipificacion	169. 104 voluntarios sanos españoles, 65 pacientes de origen africano	Pacientes		
9	Cervera et al.2009	De enero de 2004 a diciembre de 2006		95	Higado	NIVEL SERICO NO EVALUADO	
10	R.M. Minchinton et al.2002	NR		236 donantes sangre	Donantes sangre	2,58 ug/ml; 1,31 ug/ml; 0,10 ug/ml	
11	Puente et al.2019	Entre enero de 2007 y junio de 2009 en un centro terciario de referencia	Estudio prospectivo de cohortes	72 pacientes consecutivos	Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (Allo-HSCT).	Niveles de MBL antes del trasplante < 1000 ng/ml	
12	M.A. Sena, P.M. da Silva Castanha, A.B. Giles Guimarães et al.2022	De 2011 a 2014,	Estudio de cohorte de nacimiento, Brasil	46 niños infectados por dengue y 84 controles sin tratamiento previo con dengue de la misma edad (niños no infectados por DENV durante el seguimiento)		La MBL sérica total fue de 6040, 1923 y 791,3 ng/ml para producción alta, intermedia y baja, respectivamente. Para los niveles séricos de MBL funcional, los niveles medios para los grupos alto, intermedio y bajo fueron 1.089, 719,2 y 247 ng/ml, respectivamente.	

	Genotipo	ELISA	Tipo detección proteico
			La terapia de reemplazo de MBL en estudios fase I, II y III. MBL se preparó a partir de plasma de donantes voluntarios o MBL humano recombinante (rhMBL). Se cuestiona la tolerancia a la perfusión de MBL y/o su valor terapéutico.
	LYQA, HYPA, LYPA, LYPB, LXPA, LYQC, HYPD; ALELOS	Casero	Los resultados de un análisis de tipificación basado en secuencias de los polimorfismos de los genes MBL2 y MASP2 en un grupo de 65 africanos y de 104 españoles.
	YA/YA, YA/XA, producción suficiente de MBL, el resto de las combinaciones definidas como producción insuficiente de MBL	no	La variante del genotipo donante del exon 1, no se asocia con una incidencia de infecciones, pero influye significativamente en el resultado, principalmente debido a eventos infecciosos de mayor severidad.
	A/A, A/0, 0/0	Casero	Este estudio ha confirmado y ampliado informes previos de la influencia de las variantes genéticas MBL2 en los niveles de MBL, tres ensayos diferentes para medir la cantidad y función de MBL.
	1) pacientes homocigotos normales (AA), 2) pacientes con genotipos AO y OO, que como se describió anteriormente, se consideraron productores más bajos de MBL	Kit ELISA (MBL Oligomer ELISA Kit, Bio Porto Diagnostics A/S, Copenhagen, Dinamarca)	Niveles pre-transplante MBL < 1000 ng/ml se asocio con infecciones bacterinas y fungicas; mortalidad e infecciones viricas.
	SNP en el promotor y las regiones del exón 1 del gen MBL2; las 3 variantes de la región estructural (52 [D]), 54 [B] y 57 [C]) como 'O' y el alelo de tipo salvaje como 'A', posiciones -550, -221 y +4	2 ELISAS caseros, MBL total y MBL funcional, relación fenotipo-genotipo	Para evaluar la concentración sérica total de MBL, se uso MBL anti-humano (#HYB 131-01-02; Invitrogen), Para evaluar la MBL funcional, las placas se recubrieron con manano de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .

ANEXO 4. Tablas suplementarias de la distribución de infecciones en Estudio 1 (MBL)

Tabla Suplementaria 1. Distribución de tipo de infecciones recurrentes según la etiología. Estudio 1

Etiología	Número de casos	Porcentaje
Bacteriana	22	56.4
Bacteriana + CMV	3	7,69
Bacteriana + VVZ	1	2.56
Bacteriana + fúngica	3	7,69
Bacteriana + CMV + fúngica	1	2.56
CMV recurrente	4	10.25
CMV + VVZ	1	2.56
Fúngica	3	7,69
Parasitaria (Enf Chagas)	1	2.56

CMV: citomegalovirus; VVZ: Virus varicela zoster

Tabla Suplementaria 2. Distribución de microorganismos en las infecciones recurrentes. Estudio 1

Etiología	Número de casos	Porcentaje
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	5.12
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	2.56
<i>Clostridium difficile</i>	4	10.25
CMV	5	12.8
CMV + VVZ	1	2.56
<i>Escherichia coli</i>	2	5.12
<i>Haemophilus influenzae</i> + CMV	1	2.56
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	2	5.12
<i>Pseudomona aeruginosa</i> + <i>aspergillus mucor</i>	1	2.56
<i>Pseudomona aeruginosa</i> + CMV	2	5.12
<i>Pseudomona aeruginosa</i> + VVZ	1	2.56
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	10.25
<i>Staphylococcus aureus</i> + CMV	1	2.56
<i>Staphylococcus aureus</i> + CMV + <i>aspergillus</i>	1	2.56
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	5.12
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + CMV	2	5.12
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + <i>candida</i>	1	2.56
Nocardia	1	2.56
<i>Tripanosoma cruzi</i>	1	2.56
No recuperado	3	7.69

Tabla Suplementaria 3. Distribución de tipo de infecciones recurrentes según tipo de clínica infecciosa. Estudio 1

Etiología	Número de casos	Porcentaje
Bacteriemia	4	10.25
DACD	4	10.25
CMV recurrente	3	7.69
CMV síndrome viral recurrente	1	2.56
ITU recurrente	5	12.8
Mediastinitis	4	10.25
Meningitis, síndrome viral	1	2.56
Miocarditis	1	2.56
Neumonía	10	25.64
Neumonía, síndrome viral	4	10.25
Otro	2	5.12

CMV: citomegalovirus; VVZ: Virus varicela zoster

DACD: diarrea asociada a *clostridium difficile*; ITU: Infección de tracto urinario.

ANEXO 5. Relación de trabajos presentados en Congresos Nacionales e Internacionales por la doctoranda

Trabajos relacionados con la tesis:

38th ISHLT Annual Meeting & Scientific Sessions. International Society of Heart and Lung Transplantation, April 11-14, 2018. Nice, France. Resumen publicado en JHLT.

Título: *IL1RN* Genotype and Infection Risk in Heart Recipients.

Autores: **I.Ezzahouri**, D. Hernandez, C. Rodríguez-Sainz, L. Valor. E. Sarmiento, E. Fernandez-Cruz, J. Carbone.

27TH INTERNATIONAL CONGRESS OF THE TRANSPLANTATION SOCIETY (TTS), MADRID, 2018

Título: Mannose Binding Lectin (*mb12*) Genotype Frequencies in Solid Organ Transplant Patients. Poster

Autores: **Ikram Ezzahouri**, Elizabeth Sarmiento, Carmen Rodríguez-Sainz, Francisco Lozano, Maria Teresa Arias, Iago Sousa, Eduardo Zatarain, Magdalena Salcedo, Patricia Muñoz, Eduardo Fernandez-Cruz, Javier Carbone.

41 CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INMUNOLOGÍA (SEI). Sevilla 30 de Mayo a 1 de Junio 2019 (En <https://sei2019.com/>).

Título: Mannose Binding Lectin (*MBL2*) measurement as risk factor of viral infection in Solid Organ Transplant Patients

Autores: **Ezzahouri I.**, Sarmiento E., Rodríguez C., Lozano F., Arias M.T., Sousa I., Zatarain E., Salcedo M., Muñoz P., Carbone J.

44 CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INMUNOLOGIA (SEI) Bilbao 10 al 13 Mayo 2023

Título: Cinética de la Expresión de Superficie de *TL2* y *TLR 4* en Distintas Subpoblaciones Celulares en la Etapa Temprana Post Trasplante Cardíaco

Autores: **Ikram Ezzahouri Elkhalkouki**, Antonio Gallego, Elizabeth Angélica Sarmiento Marchese, Leticia Calahorra Melero, Javier Alberto Carbone Campoverde

Trabajos no relacionados con la tesis:

37TH ISHLT ANNUAL MEETING AND SCIENTIFIC SESSIONS. INTERNATIONAL SOCIETY OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION, San Diego, CA,2017

Título: Potential Intravenous Immunoglobulin Mediated Protection Against Severe Infections in a Randomized Clinical Trial in Solid Organ Transplantation.

Autores: E. Sarmiento, **I. Ezzahouri** J. Montanchez, L. Calahorra, J S. Garcia-Jimenez, I. Sousa-Casasnovas, E. Zatarain, P. Navas, M. Rodriguez-Ferrero,M. Salcedo, M. Valerio, J. Navarro,' E. Bouza,5 J. Carbone.

ISHLT 37th Annual Meeting and Scientific Sessions. International Society of Heart and Lung Transplantation, San Diego, CA,2017

Título: Elevated Serum BAFF Levels Are Associated with an increased Risk of Acute Rejection in Lung Recipients.

Autores: L Calahorra, J Cifrian, E. Sarmiento, **I. Ezzahouri**, C. Bravo, S. Lopez, R. Laporta, P. Ussetti, A. Sole, A. De Pablos, M. Jaramillo, J. Carbone.

40 CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INMUNOLOGIA (SEI).2017.

Título: Intravenous immunoglobulin mediated protection against infections in a randomized clinical trial in solid organ transplantation.

Autores: **Ikram Ezzahouri Elkhoulouki**, Elizabeth Angélica Sarmiento Marchese, Judith Montánchez Mateo, Leticia Calahorra Melero, Sandra García Jimenez, Iago Sousa-Casasnovas, María Luisa Rodríguez-Ferrero, Maricela Valerio Minero, Eduardo Fernández-Cruz Perez, Javier Alberto Carbone Campoverde.

1A JORNADA PHDAY-BIOMEDICINA, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. (UCM) 2017. **Título: La Inmunoglobulina Intravenosa media la protección contra las infecciones en un ensayo clínico aleatorizado en el trasplante de órganos sólidos.**

Autores: **I. Ezzahouri**, E. Sarmiento, J. Montánchez, L. Calahorra, S. García, I. Sousa-Casasnovas, ML. Rodríguez, M. Valerio, E. Fernández-Cruz, J. Carbone

18TH Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), Barcelona, Spain 2017

Título: INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN THERAPY INCREASES SERUM ANTI CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXIN SPECIFIC ANTIBODIES IN HEART TRANSPLANT PATIENTS. Comunicación oral.

Autores: Ikram Ezzahouri; Elizabeth Angelica Sarmiento; Judith Montanchez; Leticia Calahorra; Sandra García; Iago Sousa-Casasnovas; Maria Luisa Rodríguez-Ferrero; Maricela Valerio; Magdalena Salcedo; Joaquin Navarro; Eduardo Fernandez-Cruz; Javier Carbone

VIII JORNADA CIENTIFICA DE LA SOCIEDAD DE INMUNOLOGIA DE LA COMUNIDAD DE MADRID (SICAM), MADRID 2018.

Título: Eficacia de la Gammaglobulina Intravenosa en Trasplante de Órgano Sólido con Infección Grave e Hipogammaglobulinemia: Prueba de Concepto. FINALISTA A PREMIO A MEJOR POSTER. Reunión de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid. (SICAM) 2018. Autores: Elizabeth Sarmiento, Judith Montanchez, **Ikram Ezzahouri**, Sandra García, Iago Sousa, Eduardo Zatarain, Pablo Díez, Marisa Rodríguez-Ferrero, Fernando Anaya, Magdalena Salcedo, Diego Rincón, Rosalía Laporta, Javier Segovia, Alicia de Pablos, Joaquín Navarro, Eduardo Fernández-Cruz, Javier Carbone

ISHLT 42nd ANNUAL MEETING & SCIENTIFIC SESSIONS. International Society of Heart and Lung Transplantation. April 27 – 30, 2022. Boston, MA, USA en [https://www.jhltonline.org/article/S1053-2498\(22\)01607-2/pdf#relatedArticles](https://www.jhltonline.org/article/S1053-2498(22)01607-2/pdf#relatedArticles)

Título: Intravenous Immunoglobulin is Associated with Lower Rates of Reinfection in Solid Organ Recipients with Infection and Secondary Antibody Deficiency: A Multicenter Randomized Clinical Trial.

J. Carbone, J. Montanchez, J. Cifrian, E. Zatarain, R. Laporta, P. Ussetti, C. Bravo, S. Lopez, M. Salcedo, M. Rodríguez-Ferrero, J. Gonzalez-Costello, N. Sabe, J. Segovia, M. Gomez-Bueno, A. De Pablos, I. Sousa, A. Alarcon, **I. Ezzahouri**, E. Sarmiento

ESID 27-29 September 2021: Clinical Working Party of the European Society of Immunodeficiencies. <https://2021.esidmeeting.org/wp-content/uploads/sites/147/2021/03/esid-400x125-1.png>

Título: IVIG IS ASSOCIATED WITH LOWER RATES OF RE-INFECTION IN SOLID ORGAN RECIPIENTS WITH INFECTION AND SECONDARY IGG HYPOGAMMAGLOBULINEMIA: FINAL RESULTS OF A MULTICENTER CLINICAL TRIAL.

Autores: J. Carbone, J. Montanchez, E. Zatarain, A. Alarcon, J. Cifrian, C. Bravo, R. Laporta, M. Salcedo, M.L. Rodríguez, J. Gonzalez-Costello, J. Segovia, A. De Pablos, **I. Ezzahouri**, M. Mejía, E. Sarmiento.

Publicaciones no relacionadas con la tesis:

E Sarmiento, J Cifrian, L Calahorra, C Bravo, S Lopez, R Laporta, P Usetti, A Sole, C Morales, A de Pablos, M Jaramillo, **I Ezzahouri**, S García, J Navarro, M Lopez-Hoyos, J Carbone. MONI-TORING OF EARLY HUMORAL IMMUNITY TO IDENTIFY LUNG RECIPIENTS AT RISK FOR DEVELOPMENT OF SEVERE/SERIOUS INFECTIONS: A MULTICENTER PROSPECTIVE STUDY. J HEART LUNG TRANSPLANT. 2018

Sarmiento E, Jimenez M, di Natale M, Rodriguez-Ferrero M, Anaya F, Lopez-Hoyos M, Rodrigo E, Arias M, Perello M, Seron D, Karanovic B, **Ezzahouri I**, Mezzano S, Jaramillo M, Calahorra L, Alarcon A, Navarro J, Muñoz P, Carbone J. SECONDARY ANTIBODY DEFICIENCY IS ASSOCIATED WITH DEVELOPMENT OF INFECTION IN KIDNEY TRANSPLANTATION: RESULTS OF A MULTICENTER STUDY. TRANSPL INFECT DIS. 2020 OCT

