

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO MICROBIOLOGÍA**



TESIS DOCTORAL

**Polimorfismos de factores de la inmunidad innata en
receptores de injertos hepáticos:**

influencia en la evolución del trasplante

PRESENTADA POR

Diana María Valero Hervás

Directora

Estela Paz Artal

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



**POLIMORFISMOS DE FACTORES DE LA INMUNIDAD
INNATA EN RECEPTORES DE INJERTOS HEPÁTICOS:
INFLUENCIA EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE.**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

Diana María Valero Hervás

Directora

Dra. Estela Paz Artal

Madrid, 2014



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Diana María Valero Hervás
Título de la Tesis	Polimorfismos de factores de la inmunidad innata en receptores de injertos hepáticos: Influencia en la evolución del trasplante
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	Estela Paz Artal
Centro al que pertenece y dirección	Servicio de Inmunología Hospital Universitario 12 de Octubre Av/ de Córdoba s/n 28041, Madrid
D.N.I/Pasaporte	25131880-X
e-mail	estela.paz@salud.madrid.org

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	x			
Definición Objetivos	x			
Metodología	x			
Relevancia Resultados	x			
Discusión / Conclusiones	x			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

La tesis doctoral que se presenta analiza una amplia serie de pacientes trasplantados de hígado con el objetivo de investigar el papel de polimorfismos genéticos de tres factores de la inmunidad innata del receptor, TLR4, C3 del complemento y receptores KIR/ligandos HLA, sobre la evolución de los injertos en el primer año.

La metodología incluye una correcta recogida de datos clínicos, de la histología de los órganos trasplantados y de la terapia inmunosupresora, entre otros. Además se ha empleado una diversidad de técnicas para la determinación de las variantes genéticas, que incluyen, entre otras, PCR a tiempo real, secuenciación y PCR-SSP. El análisis estadístico incluye así mismo distintas herramientas y análisis multivariantes que aumentan el rigor de los resultados obtenidos.

Los resultados permiten concluir que las variantes de TLR4 no juegan un papel relevante en la evolución del trasplante. En el análisis de KIR y sus ligandos HLA se observa que Bw4 es un factor protector frente al rechazo. Por la contundencia en la significación estadística, el resultado más relevante de este trabajo sostiene que la variante C3F del receptor del injerto protege del rechazo pero por el contrario favorece las infecciones virales y se asocia a supervivencias más reducidas del injerto. Estas observaciones, además de indicar que el factor C3 del complemento juega un papel importante en la modulación de la inmunidad adaptativa (ya que el C3 analizado corresponde al receptor y es diferente al sintetizado por el hígado), apoyan una diferente funcionalidad entre C3F y C3S. Finalmente, la definición de las

variantes de C3 en el receptor del trasplante podría servir para estratificar el riesgo y personalizar las medidas preventivas y terapéuticas.

Madrid, a 3 de Octubre de 2014

Fdo.:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Estela Paz Artal', with a long horizontal line extending to the right.

Estela Paz Artal

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.

"No basta con dar pasos que un día puedan conducir hasta la meta, sino que cada paso ha de ser una meta sin dejar de ser un paso...."

Johann P. Eckermann

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a la realización de este trabajo, especialmente:

A la Dra. Estela Paz Artal, directora del presente trabajo de tesis doctoral, sin cuyo apoyo, perseverancia, capacidad crítica e interés, no podría haberse realizado. Gracias igualmente por transmitirme esa dedicación y constante implicación en el trabajo a lo largo de los años de residencia en el Servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre.

A la Dra. M^a José Castro Panete, a quien tengo un especial aprecio, por su inestimable ayuda continuada a nivel profesional y personal, a lo largo de todos los días que formé parte de Inmunología.

Al servicio de Inmunología, a todos y cada uno de los adjuntos los que estuvieron durante toda mi estancia y también a aquellos que se marcharon, Pablo Morales, Eva Romo, Esther Mancebo, Pilar Varela, Luis Allende y Antonio Serrano, y a todos y cada uno de los técnicos de laboratorio. Con todos ellos crecí como persona a lo largo de esos duros 4 años en Madrid. Gracias a todos por aceptarme y enseñarme todo lo que estuvo en su mano.

Al los doctores José María Aguado y Rafael San Juan del servicio de Enfermedades Infecciosas y al Dr. Mario Fernández del Servicio de Medicina Interna, por su importante colaboración en gran parte del estudio y su asesoramiento y orientación en relación a las complicaciones infecciosas.

A mis compañeros residentes Paloma, Vero, Marcela, Iván, Sara, Elena, Ana, Raquel, Sergio y Fer, y compañeros de investigación Elisa, Javi y María, con los que durante 5 años he compartido mis alegrías y tristezas, mis triunfos y fracasos. Con ellos y gracias a ellos he andado este largo camino.

A Madrid, por acogerme como ciudad adoptiva de la que sinceramente no esperaba mucho y me ha regalado tanto, amigos excepcionales, experiencia y recuerdos inolvidables. Y a Valencia, por estar siempre ahí cuando necesité un respiro y por recibirme con los brazos abiertos cuando tuve que volver, como si no hubiera partido nunca.

A mi familia, en especial a mis padres, a mi hermano, a Fran y a Paula, las palabras jamás llegarían a la altura de expresar mi agradecimiento, ellos son los responsables de que haya conseguido llegar hasta el final.

Índice

Summary	1
Abreviaturas	9
I. Introducción	17
1. RELEVANCIA ANATÓMICO-FUNCIONAL DEL HÍGADO	19
1.1. Anatomía y sistemas circulatorios	19
1.2. Funciones del hígado	21
2. EL TRASPLANTE HEPÁTICO	22
2.1. Hepatopatía terminal: indicaciones y contraindicaciones del trasplante	24
2.2. Tipos de trasplante	27
2.3. Terapias inmunosupresoras actuales	28
2.4. Complicaciones del trasplante	30
2.4.1. Daño por isquemia-reperfusión (IR)	30
2.4.2. Rechazo del injerto	34
2.4.3. Infecciones	36
2.4.4. Otras complicaciones	41
3. LA INMUNIDAD INNATA	42
3.1. Reconocimiento de patrones moleculares mediante receptores	44
3.1.1. Toll-like receptor 4 (TLR4)	48
3.1.2. Papel de TLR4 en la inmunidad adaptativa y la respuesta inmune al trasplante	53
3.1.3. Factor C3 del sistema del complemento	56
3.1.4. Polimorfismos del factor C3 determinantes de la respuesta del sistema del complemento	62
3.1.5. Papel de C3 en la inmunidad adaptativa	64
3.2. Componentes celulares	65
3.2.1. Células natural killer (NK)	66
3.2.2. Significado de las interacciones KIR-HLA en el trasplante	76
II. Hipótesis y Objetivos	81

III. Materiales y Métodos	85
1. PACIENTES Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	87
2. DEMOGRAFÍA Y DEFINICIÓN DE EVENTOS POST-TRASPLANTE	87
2.1. Supervivencia, rechazo y recidiva de VHC	87
2.2. Infecciones	89
3. REAL TIME-PCR HybProbe (LIGHT CYCLER®2.0 CAPILAR)	89
4. REAL TIME-PCR-HIGH RESOLUTION MELTING (LIGHT CYCLER®480)	92
5. TETRA-AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM (T-ARMS)	96
6. SECUENCIACIÓN SANGER	98
7. CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DE COMPLEMENTO (CDC) PARA LA TIPIFICACIÓN DE MOLÉCULAS HLA-A Y -B	102
7.1. Clasificación de las moléculas HLA-B	103
8. SEQUENCE SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE-PCR (SSO-PCR) PARA EL GENOTIPADO DE MOLÉCULAS HLA-C	103
8.1. Clasificación de las moléculas HLA-C	106
9. SEQUENCE SPECIFIC PRIMER-PCR (SSP-PCR) PARA EL GENOTIPADO DE GENES KILLER IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS (KIR)	106
9.1. Haplotipos y genes KIR e interacciones KIR-HLA	107
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	109
REACTIVOS UTILIZADOS	110
IV. Resultados	111
1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA POBLACIÓN	113
1.1. Frecuencia de polimorfismos de TLR4 y del factor C3 del complemento. Eventos clínicos e infecciones	113
1.1.1. Distribución de polimorfismos de TLR4 y C3 en la cohorte de receptores hepáticos	114
1.1.2. Eventos clínicos: éxitos, pérdida de injerto y rechazo	116
1.1.3. Eventos infecciosos	116
1.2. Distribución de killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). Eventos clínicos e infecciones .	117
1.2.1. Frecuencia de moléculas HLA-B, HLA-C y receptores KIR	118

1.2.2. Eventos clínicos: éxitos, pérdida de injerto y rechazo	118
1.2.3. Desarrollo de infecciones	120
2. RELACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE TLR4, C3 Y EL REPERTORIO KIR Y SUPERVIVENCIA, RECHAZO Y RECIDIVA DE VHC	120
2.1. Análisis de los polimorfismos de TLR4 c.896A>G (TLR4-299) y c.1196C>T (TLR4-399) y del polimorfismo c.304G>C del factor C3 del complemento	120
2.1.1. Supervivencia de pacientes e injerto	120
2.1.2. Rechazo del injerto	123
2.1.3. Efecto de los polimorfismos de TLR4 y C3 en pacientes trasplantados por VHC	126
2.1.4. Análisis univariable y multivariable	127
2.2. Papel de KIR y sus ligandos en supervivencia y rechazo	130
2.2.1. Influencia de haplotipos HLA-C, HLA-Bw4 y KIR en el desarrollo del evento clínico	130
2.2.2. Influencia del número de receptores KIR e interacciones KIR-HLA en el desarrollo del evento clínico	133
2.2.3. Efecto de KIR y sus ligandos en pacientes trasplantados por VHC	138
2.2.4. Análisis univariable y multivariable	140
3. INFLUENCIA EN EL DESARROLLO DE INFECCIONES	145
3.1. Análisis de los polimorfismos de TLR4 c.896A>G (TLR4-299) y c.1196C>T (TLR4-399) y del polimorfismo c.304G>C del factor C3 del complemento	145
3.1.1. Influencia de los polimorfismos de TLR4 y C3 en el desarrollo de infecciones	145
3.1.2. Supervivencia libre de infección	147
3.1.3. Análisis univariable y multivariable	150
3.2. Análisis del repertorio genético de killer immunoglobulin-like receptors (KIR)	153
3.2.1. Influencia del sistema KIR-HLA en el desarrollo de infecciones	153
3.2.2. Supervivencia libre de infección	160
3.2.3. Análisis univariable y multivariable	165
V. Discusión	171
1. El alelo C3F en el receptor hepático promueve la pérdida del injerto, protege del rechazo y favorece las infecciones virales	173

2. Las variantes polimórficas de TLR4 Asp299Gly y Thr399Ile no influyen en la evolución del trasplante hepático ni en el desarrollo de complicaciones infecciosas	176
3. Bw4 es el único ligando HLA conocido para los receptores KIR protector frente al rechazo del injerto	178
4. Un repertorio KIR predominantemente activador potencia el rechazo del injerto	180
5. En pacientes trasplantados por cirrosis por VHC la presencia de haplotipos Bx incrementa el desarrollo de recidiva por este virus	181
6. El desarrollo de eventos infecciosos está determinado por el repertorio genético del sistema KIR-HLA	183
VI. Conclusiones	187
VII. Bibliografía	191
VIII. Publicaciones.....	213

Polymorphisms of innate immunity factors in liver graft recipients: Influence on transplant outcome

Introduction

The orthotopic liver transplantation is the most relevant therapeutic alternative for end-stage liver disease patients. However, despite the important advances in organ preservation and in surgical and immunosuppression fields, the clinical and infectious post-transplant complications are yet important limitations for long-term survival and quality of life of these patients. Liver transplanted patients receive important immunosuppressive drugs mostly directed towards the control of acquired immunity. In this setting, the innate immunity may exert an important role for an optimal balance between graft acceptance and protection from external aggressions.

Hypothesis

In the context of liver transplantation, the genetic variants of the innate immune compartment in the recipient may shape the functional capacity of the innate immune response. Specific genetic profiles in the innate immunity may then play different roles and modify transplantation outcome.

Objectives

In this work we aimed to analyse the influence of genetic polymorphisms in three effector mechanisms of the innate immunity, TLR4, complement system C3 factor and KIR-HLA system, on clinical events development related to transplantation outcome (loss and/or rejection of the graft and patient survival) and post-transplant infections, during the first year after transplantation.

Materials and Methods

A retrospective follow-up was realized during the first year after transplantation for two cohorts of patients undergoing liver transplantation in the Hospital Universitario 12 de Octubre. The first group consisted of 522 recipients who were genotyped for c.896A>G and c.1196C>T TLR4 receptor polymorphisms and for c.304C>G complement system C3 factor polymorphism. The second cohort consisted of 95 patients in whom the KIR receptors repertoire and their putative ligands, the HLA-A HLA-B and HLA-C molecules were determined.

DNA was obtained from peripheral blood through DNazol method extraction, at the moment of recipients' inclusion in the waiting transplantation list, and stored at -20°C until use for polymorphisms genotyping. TLR4 polymorphisms were identified by Real Time-PCR (RT-PCR) technique through LightCycler®2.0 and by Real Time-PCR-High Resolution Melting (RT-PCR-HRM) methodology using the LightCycler®480 instrument. For C3 genotyping the RT-PCR-HRM technology was started up. With this aim, C3 typing was performed simultaneously by HRM and tetra-Amplification Refractory Mutation System (t-ARMS) reference technique in 49 patients of the cohort. For resolving ambiguities and guide the subsequent assignment of genotypes in both technologies, 6 cohort samples were genotyped by Sanger sequencing. Once C3 HRM genotyping was optimized, it was used to genotype the remaining cohort. Finally for KIR-HLA system characterization, KIR genes identification were conducted through Sequence Specific Primer-PCR (SSP-PCR), HLA-A and HLA-B molecules were identified by Complement Dependent Cytotoxicity (CDC) and HLA-C molecules were genotyped by Sequence Specific Oligonucleotide-PCR (SSO-PCR). Patients were distributed according to the amino acid presented at position 80 in Bw4 (Isoleucine or Threonine) or Bw6 (Asparagine) for HLA-B molecules and in C1 (Asparagine) or C2 (Lysine) for HLA-C molecules. Furthermore patients were classified depending on their KIR haplotypes, the number of total, activating and inhibitory KIR receptors, and number of interactions between both activating and inhibitory KIR receptors with their respective ligands.

The influence of TLR4 and C3 genotypes, and KIR-HLA repertoire was analysed in relation to: 1) the clinical events related to graft outcome such as graft-loss and graft rejection (defined according to the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection criteria) and patient evolution; 2) infectious complications including both general and specific bacterial, viral and fungal infections; 3) features corresponding to the transplant procedure performed; 4) patients' demographic characteristics. All clinical information was obtained from the personal medical stories of each subject included in the study. SPSSv18 and GraphPad Prismv5.0 software were used for the statistical analysis of data.

Results and Discussion

TLR4 and C3 factor variants, and KIR haplotypes frequencies identified in patients were consistent with those described for Caucasian population in the scientific literature. Both TLR4 and C3 genotype's distribution were adjusted to the Hardy-Weinberg equilibrium (TLR4-299 $p=0.46$; TLR4-399 $p=0.33$, C3 $p=0.24$).

In the corresponding section of Asp299Gly and Thr399Ile TLR4 polymorphisms study, we did not identify any genotype influence of both polymorphisms on patient survival, graft survival and graft rejection either in the global cohort or in the sub-cohort of patients transplanted due to HCV cirrhosis. TLR4 polymorphism did not modify risk for VHC recurrence during first year after transplantation. In addition any differences in global or exclusively bacterial or viral infection development were not observed.

Both polymorphisms have been described in the literature as hyporeactive TLR4 receptors encoding variants, because they modify the receptor surface expression and interfere with the corresponding ligand binding due to their localization near to peptide binding-site. Multiple studies have attempted to elucidate their influence on the solid organ transplantation outcome and susceptibility to infections, but results have been inconclusive and contradictory. These disparate results may be a consequence of the low frequency of

these SNPs in Caucasian population in which the majority of these works have been performed. This situation suggests, that a large population is required to obtain enough heterozygous genotypes who could represent an appropriate statistically group. Because of the same reason it is very difficult to analyse the possible effect of homozygous genotypes for both SNPs.

For the analysis of C3 variants effect, the C3 factor polymorphism typing by RT-PCR-HRM was next implemented. The comparison of RT-PCR-HRM versus tARMS technique carried out through McNemar symmetry test, showed a 93.8% of concordance and revealed the absence of genotyping differences between both methodologies ($p=0.89$). Moreover, typing resolution of C3 obtained by RT-PCR-HRM resulted higher (98%) than that provided by t-ARMS (96%).

We identified a double effect of the C3F allelic variant. C3FF homozygous patients and those who carried C3F allelic variant, suffered an increased ($p=0.014$ for C3FF homozygosis; $p=0.026$ for C3F allele carriers) and earlier graft loss ($p=0.014$ for C3FF homozygosis; $p=0.018$ C3F allele carriers) compared with the other genotypes and the presence of C3S allele respectively. Nevertheless the C3F allele exerted a protective effect against graft rejection, reducing rejection rates in these patients ($p=0.0037$ for C3FF homozygosis; $p=0.033$ C3F allele carriers) and increasing free-rejection survival ($p=0.005$ for C3FF homozygosis; $p=0.019$ C3F allele carriers). Simultaneously, the presence of the C3FF genotype implied a deleterious effect favouring first viral infection ($p=0.043$) and the overall viral infections ($p=0.026$) represented mainly by HSV, VZV and CMV.

There is an emerging evidence of a strong relationship between the complement recipient-dependent locally produced and activated (most probably in immune cells) and the subsequent adaptive response triggered during allograft recognition. Thus, the functional differences between C3S and C3F allelic variants could influence the shape and amplitude of the subsequent cellular immune responses. The dual C3F allele effect, promoting viral infections and protecting against graft rejection suggests that this variant could be associated with reduced cellular responses and/or a pro-tolerogenic state. Our data

would be consistent with less efficient cleavage of C3F through C3 convertase or cathepsin L, or generation of lower amounts of C3a and C3b fragments, and consequently, weaker stimulatory signals delivered from the engagement of their respective receptors C3aR and CD46 on T effector cells.

In our cohort, only one patient lost his liver allograft after rejection. Thrombotic or ischemic events were the main cause of graft loss, which was favoured by the presence of C3F in liver recipients. Assuming that C3 intracellular deposits and activation may occur in platelets and endothelial cells, it is possible to speculate that C3F proteins might favour a pro-coagulation state by modulating specifically these cell types.

In contrast we did not identify any association between the C3 allelic variants and patient survival or bacterial infections development.

Finally we analyzed the effect of KIR receptor repertoire and the interaction between these receptors and their HLA ligands in the transplant outcome and infection development.

In the context of transplant outcome, no differences were observed in graft and patient survival in the respective comparisons for HLA-B and HLA-C molecules, the KIR genes repertoire or interactions between KIR receptors and their respective HLA ligands during the 12 months of follow up. However, our data suggested that from the second month post-transplantation, differences in graft rejection rates between serological Bw4 allele carriers and non-carriers were accentuated. Later comparisons excluding patients who rejected graft during the first month post-transplantation, confirmed the emergence of Bw4 serological allele as a protective factor against graft rejection after the second month post-transplantation. Patients' carrying Bw4 serological allele presented lower graft rejection incidence ($p=0.001$) and prolonged free-rejection survival ($p= 0.0004$). Bw4 is ligand for aKIR3DS1 and iKIR3DL1 receptors. Bw4 ligand will interact preferentially with the inhibitory one, because affinity between ligands and KIR receptors is higher for those with inhibitory function. On the other hand iKIR3DL1 receptor has an increased frequency in general population since it can be found in both KIR AA and Bx haplotypes.

Therefore the presence of Bw4 serological allele in transplant recipient, as we observed in our results, is associated with a predominantly NK cell inhibitory response limiting the triggered immune response and protecting against graft rejection.

Patients who rejected the graft after the first month, had more total KIR receptors (9.11 in average) versus those who did not developed graft rejection (7.76) ($p=0.03$). This superiority in KIR receptors number occurs at expense of an increased number of activating receptors (equivalent to haplotypes Bx), since repertoire of iKIR ranges between 2 and 6 for both A and B haplotypes. Thus, a greater number of activating receptors would promote the cytolytic NK cell-mediated response and the subsequent adaptive immune response against graft, and as a consequence higher rejection incidence.

When we focused our study on patients transplanted by HCV all those who showed recurrence of HCV infection were Bx haplotype carriers ($p = 0.004$). This is not surprising since almost all patients transplanted because of HCV infection were Bx. However, since Bx haplotypes are functionally activators of NK cell-mediated cytotoxicity, and they should exercise more effective control over HCV infection, the enrichment of Bx in the VHC-positive cohort may suggest that patients negative for Bx had a worse management of the infection and died before transplantation.

Regarding the KIR-HLA system effect in development of infections, we did not observed any variant to be an independent protective or deleterious factor, maybe due to reduced statistical power. However, several associations suggest a role for this system on the control of infections after transplantation. Presence of AA KIR haplotypes seemed to favour viral infections development. This result is consistent with previous studies in renal transplantation describing the KIR AA haplotype as a risk factor for CMV infection development, widely represented in our cohort, as they reflect inhibitory NK cell profiles.

In the section corresponding to KIR ligands analysis, only HLA-C molecules showed an effect on the development of infections. Heterozygous HLA-C1C2 patients had an increased incidence of infections regardless of etiology compared with the other genotypes ($p=0.04$). In recipients suffering a first infection of viral origin, this appeared earlier in the presence of C1C1 haplotypes and later in C2C2 subjects, whereas the C1C2 genotype

conferred “intermediate” free-of-infection times. These, together with other results in the literature, point out that among HLA-A, Bw4 and HLA-C, KIR ligand molecules, HLA-C antigens play the most important role in control of infections. Designing of specific works will help to get insight on this association.

Finally, patients whose first infection was caused by virus, tended to present higher number of activating interactions compared with those who did not develop this kind of first infection ($p=0.06$). This association was then confirmed in the subsequent analysis of grouped interactions, when the presence of more than one activating interaction involved a significantly higher incidence of first viral infection ($p=0.01$). Similarly, the presence of more than one activating interaction was associated preferentially with the first viral infection and recurrent viral infections development ($p=0.016$). Patients with three or more inhibitory KIR-HLA interactions suffered bacterial infections significantly earlier than patients with less than 3 interactions. The recently described capacity of NK activation mediated by ligation of microbial-derived CpG to KIR3DL2, supports our observed role of NK on the control of bacterial infections after transplantation and in the setting of immunosuppressive therapy specially directed towards the adaptive compartment.

Conclusions

Main conclusions from this work are:

1. TLR4 genetic polymorphisms in the liver transplant recipient do not play a role in liver transplantation outcome and control of infections.
2. C3 polymorphism in the liver transplant recipient has a robust effect on evolution of the graft and susceptibility to viral infections. Consequently, C3 genotyping of recipients may help to stratify risk and personalize care.
3. Among KIR and HLA ligands system, Bw4 antigens in liver recipients emerge as an independent protective factor for rejection. Other associations and tendencies are observed that merit further study to be confirmed.

A

aKIR: Receptor Killer Immunoglobulin-like Activador

ALL: Leucemia Linfoblástica Aguda

AP-1: Proteína Activadora-1

ATP: Adenosina Tri-Fosfato

B

BPB: Azul de Bromofenol

C

CAM: Complejo de Ataque a Membranas

CD: Cluster de Diferenciación

CDC: Citotoxicidad Dependiente de Complemento

CES: Células Endoteliales Sinusoidales

CK: Células de Kuppfer

CMV: Citomegalovirus

COX2: Ciclooxygenasa 2

CPA: Células Presentadoras de Antígenos

CpG: Islas CG

CR1: Receptor del Complemento-1

CsA: Ciclosporina A

CTL: Linfocitos Citóxicos

CTP: Child-Turcotte-Pugh

D

D: Donante de Órgano

DAF: Factor Decelerador de la Activación

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño

DAP: Proteína de Activación de ADN

dNTPs: desoxi-Nucleótidos Tri-Fosfato

dsRNA: ARN de Doble Cadena

E

EDTA: Ácido Etilen-Diamino-Tetra-Acético

EICH: Enfermedad de Injerto Contra Huésped

F

Fc: Fracción constante de Anticuerpos

FCS: Suero Fetal de Ternero

Fc γ R: Receptor para la Fracción Constante de la cadena pesada γ

Fc ϵ R1: Receptor-1 para la Fracción Constante de la cadena pesada ϵ

FPR: Receptor de Péptidos Formil

FPRL1: Receptor de Tipo Péptidos Formil-1

G

gB/C/H/L: Glicoproteína B/C/H/L

GPI: Proteína Glicosilfosfatidilinositol

H

HCl: Ácido Clorhídrico

HGMB-1: Grupo de Alta Movilidad Box-1

HIV: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

HLA: Antígeno Leucocitario de Histocompatibilidad

HRM: High Resolution Melting

HSCT/TPH: Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos

HSP: Proteínas de Choque Térmico

I

iKIR: Receptor Immunoglobulin-like Inhibidor

IKK: Kinasa I κ B

IKK α : Kinasa I κ B α

IKK β : Kinasa I κ B β

IL: Interleucina

IMC: Índice de masa Corporal

INF- γ : Interferón- γ

INR: Tiempo de Protrombina Normalizado

IR: Isquemia-Reperfusión

IRAK: Kinasa Asociadas al Receptor de Interleucina-1

IRF3/7: Factor Regulador de Transcripción de Interferones

ITAM: Inmunoreceptor Activador basado en Motivos Tirosina

ITIM: Inmunoreceptor Inhibidor basado en Motivos Tirosina

J

JNK: kinasa c-Jun N-terminal

K

KIR: Receptor Killer tipo Inmunoglobulina

KLR: Receptor Killer tipo Lectina

L

LBP: Proteína de Unión a Liposacárido

LILR: Receptor Leucocitario tipo Inmunoglobulina

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

LPS: Lipopolisacárido

LRC: Cluster de Receptores Leucocitarios

LRR: Repeticiones Ricas en Leucina

M

Mal: Proteína Adaptadora de MyD-88

MAPK: Kinasa de Activación por Mitógenos

MASP: Serin-proteasa 2 de Unión a Manosa

MBL: Proteína de Unión a Manosa

MCP: Cofactor de Membrana de Proteólisis

MELD: Modelo de Enfermedad Hepática Terminal

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MKK: Kinasas MAP

MMF: Micofenolato Mofetilo

MyD88: Gen 88 de respuesta primaria de Diferenciación Mieloide

N

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido-Fosfato Hidrogenada

NCR: Receptores Naturales de Citotoxicidad

NEMO: Complejo Modificador Esencial de NF-κB

NFAT: Factor Nuclear de Células T activadas

NF-κB: Factor Nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de Células B activadas

NK: Células Natural Killer

NKT: Células Natural Killer T

NLR: Receptores tipo NOD

NOD: Dominio de Oligomerización de Nucleótidos

P

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

pb: Pares de Bases

PBMCs: Células Mononucleares de Sangre Periférica

PCR: Proteína C Reactiva

PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa

PELD: Modelo Pediátrico de Enfermedad Hepática Terminal

PI3-Kinasa: Kinasa Fosfatidil Inositol Tri-Fosfato

PMN: Células Polimorfonucleares

PTX3: Pentraxina-3

R

R: Receptor de Trasplante

RAGE: Receptor para productos Finales de Glicosilación Avanzada

RC: Rechazo Crónico

RCA: Rechazo Celular Agudo

RIG: Gen Inducible del Ácido Retinoico

RIP1: Receptor de Interacción con Proteínas 1

RLR: Receptores tipo RIG

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute

RRP: Receptores de Reconocimiento de Patrón

RT-PCR-HRM: Reacción en Cadena de Polimerasa a Tiempo Real mediante High Resolution Melting

S

SDS: Dodecil Sulfato Sódico

SH: Dominio Homólogo a Scr

SHIP: Dominio Homólogo a Scr con Inositol Fosfato

SLR: Solución de Lisis de Glóbulos Rojos

SNP: Polimorfismo de Único Nucleótido

SSP-PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa de Secuencia de Oligonucleótido Específica

ssRNA: ARN de Cadena Simple

STAT3/6: Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3/6

T

TAK1: Factor Transformador del Crecimiento 1

TANK: Activador de NF- κ B Asociado a la familia de TRAF

tARMS: tetra- Sistema de Amplificación de Mutación Refractaria

TEA: Tampón Acido Acético-EDTA-Tris

THE: Trasplante Hepático Heterotópico

THO: Trasplante Hepático Ortotópico

TIR: Dominio Homólogo del Receptor Toll/IL1

TKB1: Cadena BL21(DE3) pTK de *Escherichia coli*

TLR: Receptor tipo Toll

TNFR: Receptor de la familia del Factor de Necrosis Tumoral

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral- α

TOS: Trasplante de Órgano Sólido

TRAF: Factor Asociado al Receptor del Factor de Necrosis Tumoral

TRAM: Molécula Adaptadora Relacionada con Dominios TIR inductores de Interferon- β

TREG: Linfocitos T reguladores

TRIF: Dominio TIR inductor de Interferón- β

TxH: Trasplante Hepático

U

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UNOS: United Network for Organ Sharing

V

VEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

VHA/B/C/D/E: Virus de la Hepatitis A/B/C/D/E

VHP: Virus del Papiloma Humano

VHS: Virus Herpes Simplex

VVZ: Virus Varicela-Zoster

W

WT: Alelo Salvaje (Wildtype)

Z

ZAP-70: Proteína kinasa 70 Asociada a la cadena Zeta

γGT: Gamma-Glutamil-Transpeptidasa

I. Introducción

1. RELEVANCIA ANATÓMICO-FUNCIONAL DEL HÍGADO

El hígado es la segunda víscera de mayor tamaño con un peso medio aproximado de 1600g. Constituye el punto de entrada de nutrientes y tóxicos a través del sistema circulatorio vía vena portal. Su posición anatómica estratégica le permite desempeñar sus funciones metabólicas esenciales para el organismo.

1.1. Anatomía y sistemas circulatorios

El hígado se localiza en el cuadrante superior derecho del abdomen y anatómicamente se divide en hígado derecho e izquierdo, en base a la distribución de vasos y conductos biliares. Se subdivide en 8 segmentos, cada uno de ellos con irrigación propia de vasos portales, conductos biliares y drenaje por venas suprahepáticas situadas entre los segmentos. Las superficies antero-superior y lateral derecha se disponen contra el diafragma y la parte posterior se encuentra en contacto con el colon, riñón derecho, el duodeno en el lóbulo derecho y el estómago en el izquierdo [1] (Fig.1).

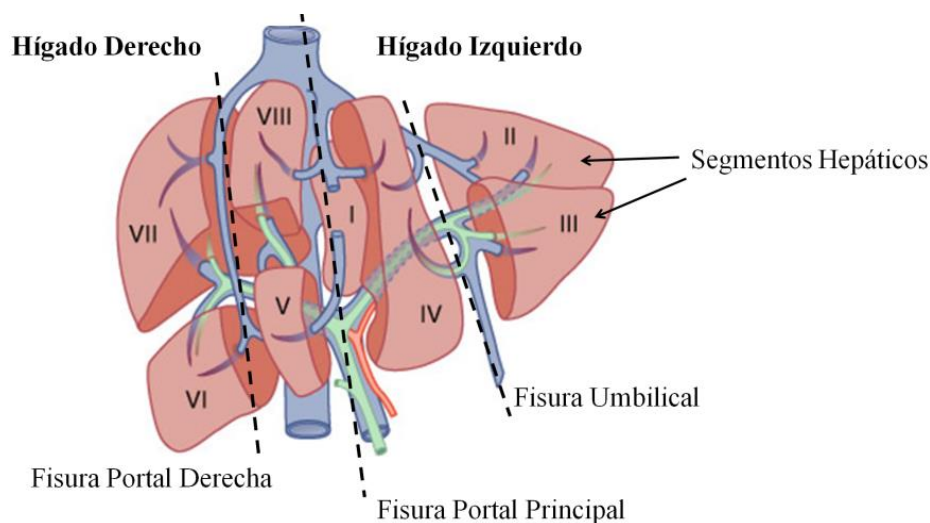


Figura 1. Estructura anatómica hepática. En la figura se muestran las estructuras semi-hepáticas derecha e izquierda así como los 8 segmentos hepáticos resultantes de las fisuras hepáticas (línea discontinua) (Adaptado de Sabiston. Tratado de Cirugía 18 Ed [2]).

La irrigación hepática consiste en arterias hepáticas, vena porta y venas suprahepáticas. La arteria hepática es la responsable de llevar la sangre arterial al hígado

(25-30% del flujo sanguíneo total). Esta surge del tronco celíaco y conforme asciende hacia el hígado, se ramifica para irrigar estómago y duodeno. Posteriormente se denomina arteria hepática común, que al acceder al hígado emite las arterias hepáticas derecha y la izquierda. De la arteria hepática derecha parten las ramificaciones responsables de la irrigación de la vesícula biliar.

Las venas esplénica y mesentérica superior se unen bajo el páncreas para formar la vena porta, que provee el 75% del flujo sanguíneo al parénquima hepático, recibiendo casi la totalidad del flujo del tracto digestivo y vesícula biliar. El tronco de la vena porta se bifurca a la izquierda y derecha para abastecer a las dos mitades hepáticas.

El drenaje hepático se inicia en las venas intralobulillares y sublobulillares que se van fusionando para formar el grupo de venas superior (hepática derecha, izquierda y media que drenan estas localizaciones) que posteriormente se fusionan en la vena cava, y las del grupo inferior que surgen de los segmentos I, VI y VII.

Otra de las redes circulatorias que “recorren” el hígado es el sistema biliar. La bilis se sintetiza en los hepatocitos, se almacena en la vesícula biliar y es secretada vía conducto colédoco desembocando en el duodeno.

Los hepatocitos, poliédricos con un núcleo central esférico, están dispuestos de forma laminar y son recorridos por sinusoides sanguíneos a cada lado. La membrana citoplasmática de los hepatocitos presenta regiones especializadas que abastecen a los canalículos biliares y están vinculadas por uniones estrechas entre hepatocitos adyacentes. Los canalículos interlobulillares surgen de los espacios entre hepatocitos, y se proyectan hacia la periferia del lóbulo formando los conductos biliares. Estos conductos discurren junto a la vena porta y la arteria hepática formando la denominada *triada hepática*. Los conductos biliares de cada lado del hígado conforman los conductos hepáticos derecho e izquierdo, que finalmente se unen formando el conducto hepático. El conducto hepático se une con el conducto cístico proveniente de la vesícula biliar a nivel del hilio hepático, formando así el conducto colédoco que drena finalmente en el duodeno [3] (Fig. 2).

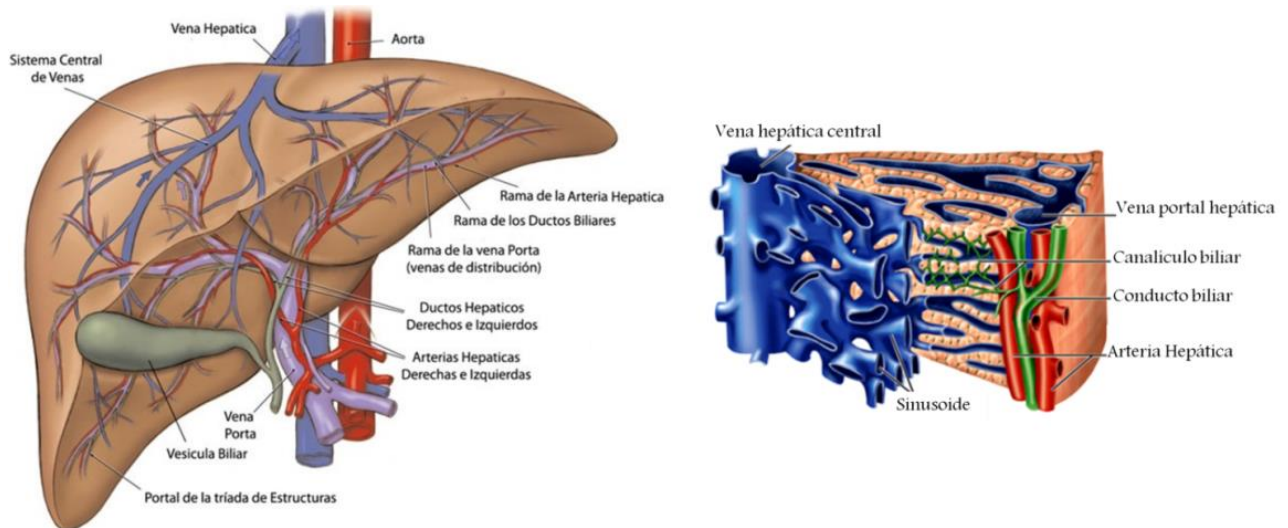


Figura 2. Red vascular y biliar hepática. Sistema arterial y venoso de irrigación hepática y distribución de los conductos biliares hacia la vesícula biliar. (Adaptado de Biblioteca diagnóstica [4]).

1.2. Funciones del hígado

El hígado es el responsable de numerosas funciones esenciales para la vida agrupadas a continuación [1]:

- *Síntesis de proteínas plasmáticas*: es el principal productor de proteínas séricas implicadas en la coagulación, transporte, inhibición de proteasas y factores del sistema del complemento entre otras.

- *Metabolismo de hidratos de carbono*: ejerce un papel clave en el mantenimiento de las reservas de carbohidratos, debido a su capacidad de síntesis de glucosa a partir de sus precursores, piruvato y lactato, y de almacenarla en forma de glucógeno. En el mismo contexto, participa en la glucólisis como vía precursora de ácidos grasos. Regula así los niveles de glucosa circulante, lo cual es esencial para el sistema nervioso central ya que es su principal nutriente. También participa en el catabolismo de las hexosas (galactosa y fructosa) para la obtención de energía o la síntesis de ácidos grasos.

- *Metabolismo lipídico*: la oxidación de los ácidos grasos es la mayor fuente energética en forma de ATP. El hígado tiene una función central en la regulación de la necesidad de ácidos grasos circulantes controlando su síntesis y degradación (β -oxidación). Para el intercambio de los lípidos entre hígado y otros tejidos, el hígado sintetiza y concentra las

lipoproteínas responsables de su transporte. Finalmente también es el responsable de la síntesis y catabolismo del colesterol y con el mismo de la bilis y de la producción de cuerpos cetónicos esenciales para el sistema nervioso central en procesos de ayuno.

-*Metabolismo nitrogenado*: participa en la interconversión de aminoácidos no esenciales, en el catabolismo de las bases nitrogenadas púricas y pirimidínicas y en la producción de urea a partir del nitrógeno de la degradación de aminoácidos.

-*Metabolismo de bilirrubina*: participa en la degradación de la bilirrubina proveniente del grupo hemo a través de la glucuronidación enzimática, que finalmente será excretada vía bilis al intestino, donde será hidrolizada por bacterias intestinales.

-*Síntesis de bilis*: los hepatocitos sintetizan la bilis, constituida por agua, sales, pigmentos biliares, ácidos grasos y colesterol y lectina. Esta se almacenará en la vesícula biliar y se secretará vía conducto colédoco al duodeno para la digestión de las grasas.

-*Metabolismo de xenobióticos*: es el principal detoxificador de sustancias extrañas por dos mecanismos, unión a proteínas (albúmina principalmente) o modificación enzimática en los microsomas hepáticos (hidroxilación o conjugación).

2. EL TRASPLANTE HEPÁTICO

El procedimiento de trasplante de órganos como alternativa clínica surgió entre la década de los 50 y 70 en Europa y Norteamérica. El primer trasplante hepático realizado en humanos data de 1963 y fue realizado por el Dr. Thomas Starlz en Estados Unidos siguiendo los protocolos descritos para trasplante renal. Los resultados de este primer intento, así como de los posteriores, no fueron exitosos, ya que ninguno de los pacientes trasplantados presentó una supervivencia mayor a los 23 días [5, 6]. Los posteriores intentos por otros grupos no obtuvieron mejores resultados, llegando a catalogar el trasplante hepático como un procedimiento “imposible”. Mientras el trasplante hepático quedó relegado al ámbito de la investigación en animales, el programa de trasplante renal del Dr. Starlz se impulsó debido a la introducción de la histocompatibilidad de los antígenos tisulares HLA.

Fue a partir de 1968 cuando se introdujeron en trasplante hepático los nuevos desarrollos quirúrgicos, en la preservación de órganos y avances en la inmunosupresión que permitieron retomar el interés por este procedimiento, incrementando el número de pacientes trasplantados con éxito y optimizando el proceso con el paso del tiempo. Finalmente en 1983, en la conferencia de consenso del National Institute of Health de Estados Unidos, se consolidó el trasplante hepático como procedimiento clínico y terapéutico de eficacia demostrada, con su consiguiente difusión a nivel mundial [7].

Actualmente el trasplante hepático está reconocido como una opción terapéutica efectiva para pacientes con enfermedades hepáticas agudas o terminales que comprometen su supervivencia. Todo ello debido principalmente al potente desarrollo de la farmacología inmunosupresora, efectiva y específica, así como de la terapia antimicrobiana y la tecnología del procedimiento quirúrgico.

En España en 1984 los doctores C. Margarit y E. Jaurrieta realizaron el primer trasplante hepático con éxito en el Hospital de Bellvitge [8]. En los siguientes 16 años se incrementó en torno a 9 veces el número de trasplantes hepáticos realizados en España (Fig. 3).

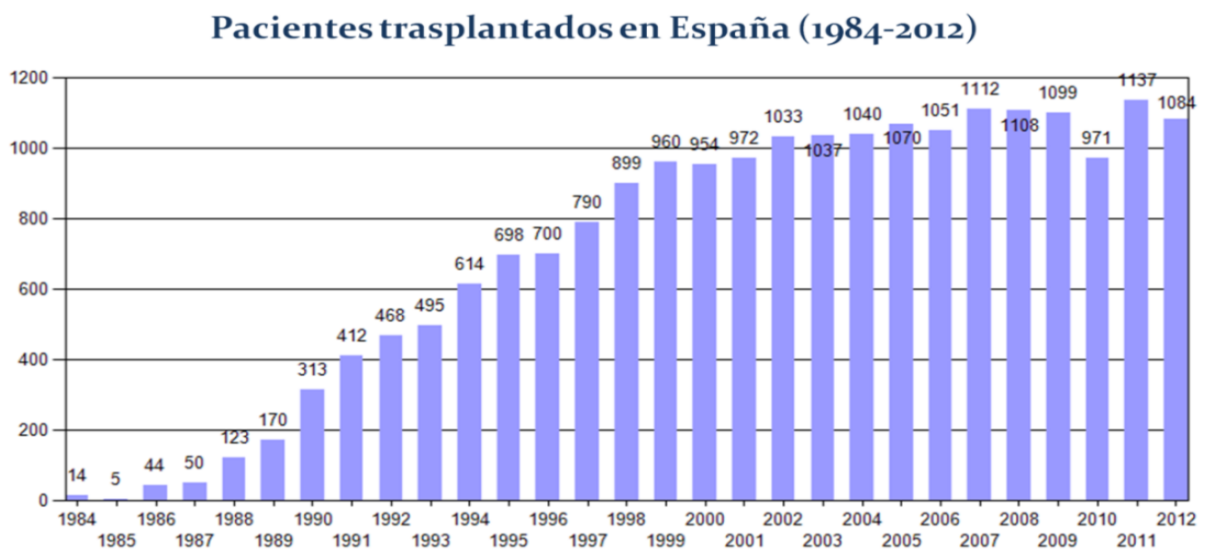


Figura 3. Evolución del trasplante hepático. Pacientes trasplantados en España desde 1984 hasta 2012 según la Organización Nacional de Trasplantes [9].

De esta forma, se ha confirmado la relevancia de este procedimiento en la actualidad y ha posicionado a España como el país con la mayor tasa de trasplante hepático en relación a su población (10% del trasplante hepático mundial) [9].

2.1. Hepatopatía terminal: indicaciones y contraindicaciones del trasplante

Las indicaciones para la realización del trasplante hepático incluyen aquellas que desencadenan un estado funcional terminal irreversible del órgano [10] (Tabla 1).

Estas indicaciones se basan en la severidad de los indicadores del estado funcional hepático, como ictericia o anomalías en la coagulación, y en las complicaciones derivadas de la hipertensión portal.

Tabla 1. Indicaciones del trasplante hepático

Enfermedad hepática avanzada (cirrosis)
<i>No colestásica</i>
Cirrosis viral (VHC, VHD), autoinmune, criptogénica, alcohólica, secundaria a esteatohepatitis
<i>Colestásica</i>
Cirrosis biliar primaria o secundaria, colangitis esclerosante, atresia biliar, síndrome de Alagille, fibrosis quística
Enfermedades metabólicas
<i>Causante de cirrosis</i>
Hemocromatosis, déficit de α 1-antitripsina, enfermedad de Wilson, tirosinemia
<i>Sin enfermedad hepática</i>
Polineuropatía amiloidótica familiar, hiperoxaluria, alteraciones del ciclo de la urea
Tumores hepáticos (hepatocarcinoma, hepatoblastoma, hemangioendotelioma epiteliode, etc.)
Fallo hepático fulminante viral, tóxico, vascular
Miscelánea
Enfermedad hepática poliquística, enfermedad de Carolli, síndrome de Budd-Chiari, amiloidosis, sarcoidosis, trauma, ascitis no refractarias, síndrome hepatopulmonar, encefalopatía hepática

VHC/D: virus hepatitis C / D

En población pediátrica la principal indicación es la atresia biliar seguidos del déficit de α 1-antitripsina y otros trastornos metabólicos [11].

El momento adecuado en el que se debe realizar el trasplante es uno de los puntos clave en el abordaje de las enfermedades hepáticas severas. El trasplante debe realizarse tras agotar las opciones terapéuticas, pero no debe prolongarse en exceso en el tiempo, ya que disminuirían las probabilidades de éxito debido al desarrollo de complicaciones de la misma patología.

A grandes rasgos, la inclusión en la lista de espera de trasplante hepático debe ser considerada cuando la enfermedad hepática de base comienza a limitar la vida cotidiana de los pacientes. Para objetivar el “timing” en el manejo de los pacientes con hepatopatías terminales, en 1997 las asociaciones American Society of Transplant Physicians y American Association for the Study of Liver Diseases crearon unos criterios específicos de inclusión en la lista de espera. Según este consenso se estableció la necesidad de un puntaje de Child-Turcotte-Pugh (CTP) de por lo menos 7, que predice una tasa de supervivencia al año inferior al 90%, como criterio mínimo de severidad para la inclusión de un paciente en la lista de espera de trasplante hepático [12]. Más recientemente, los criterios CTP han sido revisados y sustituidos por los valores MELD (Model for End Liver-Stage Liver disease) y PELD (Pediatric End Liver-Stage Liver disease) que aportan mayor objetividad a la clasificación de pacientes en la lista de espera, ya que eliminan de la ecuación el tiempo de espera en lista, las limitaciones discriminativas y los parámetros subjetivos basados en el examen físico. Este score MELD/PELD permite generar un ranking de prioridad según las siguientes fórmulas matemáticas:

$$\text{MELD: } 10[0.957 \log (\text{sCrea}) + 0.378 \log (\text{Brb}) + 1.12 \log (\text{INR}) + 0.643]$$

sCrea: Creatinina sérica; Brb: Bilirrubina Total ; INR: Tiempo de protrombina normalizado

$$\text{PELD: } [10^* (0.480 \log (\text{Brb}) + 1.857 \log (\text{INR}) - 0.687 * \log (\text{Albumina}) + 0.436^* + 0.667^{**})]$$

Brb: Bilirrubina Total; INR: Tiempo de protrombina normalizado; *si es menor de 1 año; **si existe retraso en el crecimiento.

La combinación del valor MELD/PELD y la clasificación para el estado funcional hepático de la asociación United Network for Organ Sharing (UNOS) [13] (Tabla 2),

permiten determinar la prioridad a la hora de elaborar la lista de espera de trasplante hepático.

Tabla 2. Clasificación del estado hepático funcional (UNOS)

Estado de urgencia	
1 Fallo hepático fulminante con expectativa 7 días de vida	
(i)	Fallo hepático tradicional
(ii)	Disfunción del injerto antes de 7 días post-trasplante
(iii)	Trombosis arterial hepática antes de 7 días post-trasplante
(iv)	Enfermedad de Wilson aguda descompensada
2a Fallo hepático crónico (con estancia en UCI) con expectativa 7 días de vida, CTP ≤ 10 y uno de los siguientes:	
(i)	Varices hemorrágicas activas no respondedoras
(ii)	Síndrome hepato-renal
(iii)	Ascitis refractaria/hidrotórax hepático
(iv)	Encefalopatía hepática tipo 3 o 4
2b Medicación continuada, CTP ≤ 10 o ≥ 7 y uno de los siguientes:	
(i)	Varices hemorrágicas activas no respondedoras
(ii)	Síndrome hepato-renal
(iii)	Peritonitis bacteriana espontánea
(iv)	Ascitis refractaria/hidrotórax hepático/carcinoma hepatocelular
3 Medicación continuada, CTP ≥ 7	
7 Inactividad temporal	

CTP: Child-Turcotte-Plugh score; UCI: Unidad de cuidados intensivos

Del mismo modo que determinadas situaciones clínicas requieren con urgencia el trasplante, se han descrito contraindicaciones absolutas y relativas para llevar a cabo el mismo. El conocimiento e identificación de ambas circunstancias, positivas y negativas son de igual relevancia.

Las contraindicaciones absolutas son aquellas en las que la probabilidad de evolución favorable es tan remota, que no compensaría someter al paciente al proceso de trasplante, mientras que para las relativas, aunque la mejoría represente una baja probabilidad aún

podría considerarse el trasplante como opción terapéutica. Ambos tipos de contraindicaciones se describen en la Tabla 3 [11].

Tabla 3. Contraindicaciones del trasplante hepático

Absolutas	Relativas
Enfermedad cardiopulmonar avanzada	Edad avanzada
Tumor maligno extrahepático	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)
Alcoholismo activo o abuso de sustancias	Colangiocarcinoma
Hepatitis alcohólica aguda	Trombosis venosa portal difusa
Sepsis o infección activa no controlada	
Baja adherencia terapéutica o soporte psicológico	
Muerte cerebral	

2.2. Tipos de trasplante

El trasplante hepático en el que el nuevo órgano ocupa la posición anatómica del hígado se denomina trasplante hepático ortotópico (THO), mientras que si ocupa una localización diferente se denomina heterotópico. El THO es el procedimiento mayoritario y más ampliamente realizado.

Las principales diferencias en el tipo de trasplante residen en el tipo de donante aunque todos deben cumplir una serie de criterios generales [14]:

- Compatibilidad ABO absoluta (la histocompatibilidad HLA no juega un papel crucial en trasplante hepático).
- Edad: desde la infancia hasta los 65 años en función del receptor para el que se destine el hígado. En la actualidad se está promoviendo la utilización de órganos de donantes añosos (más de 65 años) debido a la extensa demanda de órganos.
- Peso corporal: la diferencia entre donante y receptor no debe ser superior al 15%. El IMC del donante no debe ser superior a 30.
- Estancia en UCI menor de 7 días y hemodinámicamente estable.
- Ausencia de patologías hepáticas ni de origen infeccioso.

En el caso de donante fallecido, se diferencian dos grupos en función de la causa de la muerte, donantes por muerte encefálica o a corazón parado (asistolia). La donación por muerte encefálica es de elección frente a asistólica ya que estudios recientes han demostrado que en la donación en asistolia, existe una peor evolución del trasplante [15]. No obstante, en la sociedad actual este grupo de donantes es mayoritario y debido a la escasez de donación órganos, supone un porcentaje importante y creciente de los trasplantes hepáticos realizados.

En cuanto a la donación de vivo, constituye una práctica convencional para niños aunque hoy día debido a la enorme demanda de injertos, se está empleando con mayor frecuencia en adultos. El donante (pariente del receptor) debe estar sano y requiere una evaluación exhaustiva por el equipo de trasplante. Los principales beneficios residen en la disminución del tiempo en la lista de espera de los pacientes, en la teórica reducción del riesgo de rechazo debido al parentesco existente y en la reducción al mínimo del tiempo de isquemia para el injerto. Sin embargo, implica una tasa de morbilidad y mortalidad para los propios donantes (10 y el 0.5% respectivamente) y para el receptor supone un procedimiento más complejo que el trasplante tradicional [16, 17].

El trasplante de hígado tipo "split", requiere la división de un mismo injerto en otros dos funcionantes. En trasplantes de donante cadáver el fragmento lateral derecho (segmentos IV-VIII) se suele emplear para adultos cuando es necesario adecuar el tamaño, mientras que la fracción izquierda (segmentos II y III) se destina a receptores pediátricos. En el caso de un donante vivo, las divisiones pueden variar en función de la edad del receptor, aunque generalmente se realiza separando la mitad hepática derecha de la izquierda [18].

2.3. Terapias inmunosupresoras actuales

Actualmente se han establecido dos tipos de terapia inmunosupresora, la terapia de inducción, administrada al inicio del trasplante y la de mantenimiento y/o tratamiento del rechazo del injerto. Independientemente del tipo, se dirigirá fundamentalmente a evitar el rechazo, quedando en un segundo plano los efectos adversos. No obstante, el tiempo y la

experiencia han ido personalizando la terapia inmunosupresora con el fin de alcanzar el equilibrio entre el control del rechazo/efectos adversos y control de las infecciones, teniendo en cuenta edad, etnia y etiología de la enfermedad hepática [19]. Los agentes inmunosupresores comúnmente empleados quedan resumidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Terapias inmunosupresoras empleadas en el trasplante hepático

Grupo terapéutico		Mecanismo de acción
Esteroides		Inhibición citoquinas
Inhibidores de calcineurina	Tacrólimus	Suprime proliferación de células T vía IL-2
	Ciclosporina	
Antimetabolitos	MMF	Inhibe proliferación de células T y B vía síntesis de purinas
	Azatioprina	
Inhibidores mTOR	Sirólimus	Suprime proliferación de células T vía IL-2
	Everólimus	
Anticuerpos monoclonales	Basiliximab	Anti-CD25
	OKT3	Anti-CD3
	Efalizumab	Anti- LFA1
	Belatacept	Anti-CTLA4

MMF: micofenolato mofetilo.

En función del centro en el que se realice el trasplante y la evolución de injerto y paciente, existen diferencias en las terapias inmunosupresoras, así como en sus combinaciones.

En general el protocolo de inducción común está constituido por doble terapia con esteroides y ciclosporina o tacrólimus. Si el paciente presentara toxicidad por el anticalcineurínico, se complementarían con la adición de micofenolato mofetilo (reduciendo la dosis del fármaco tóxico) o se sustituiría en función del grado de neurotoxicidad o nefrotoxicidad alcanzada. La adición de micofenolato a los esteroides y ciclosporina o tacrólimus constituye la segunda terapia más frecuentemente utilizada, denominada triple terapia inmunosupresora. En el caso de que se requiera la adición de basiliximab o anticuerpos anti-CD3, para evitar el uso de fármacos nefrotóxicos en pacientes con

disfunción renal, se añadirá a cualquiera de las terapias anteriores disminuyendo la dosis de anticalcineurínico.

Para el tratamiento del rechazo agudo se emplea el ajuste de dosis de anticalcineurínico, la adición de micofenolato o inhibidores de mTOR a la doble terapia, el intercambio de anticalcineurínicos o finalmente el rescate con esteroides o anticuerpos monoclonales tipo basiliximab.

En la terapia de mantenimiento (desde el tercer mes) se busca disminuir o retirar los fármacos más tóxicos: retirada de esteroides en la doble o triple terapia (baja dosis de anticalcineurínico con micofenolato o inhibidores de mTOR) o administración de micofenolato, inhibidores de mTOR o ambos.

2.4. Complicaciones del trasplante

2.4.1. Daño por isquemia-reperfusión (IR)

Este es un fenómeno de daño celular exacerbado, causado por la restricción temporal del flujo sanguíneo a los tejidos (con la consiguiente falta de aporte de oxígeno y nutrientes) y el posterior restablecimiento del mismo, que constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes trasplantados. Las lesiones hepáticas derivadas son el resultado de la combinación de daños provocados por la isquemia fría (previa al trasplante durante la preservación del órgano ex-vivo) y la isquemia caliente (previa a la restauración del flujo tras el del trasplante). La isquemia fría se caracteriza por la afectación de las células endoteliales sinusoidales (CES) y la alteración de la microcirculación, mientras que en la isquemia caliente se produce la lesión sobre hepatocitos debida a la citotoxicidad desencadenada por las células de Kupffer (CK) [20].

Existe una etapa temprana y otra tardía en el proceso de daño por IR. La primera ocurre en las primeras 6 horas posteriores a la reperfusión, está mediada por CK, hepatocitos y CES, y se debe a la entrada de las células en anaerobiosis durante la isquemia, reduciéndose la fosforilación oxidativa que altera el equilibrio redox del hígado [21, 22]. La fase tardía ocurre tras las 6 primeras horas, y el daño hepático es consecuencia

de la producción de citoquinas y quimioquinas e infiltración leucocitaria en el tejido hepático [21, 23]. El resultado final de todos los mecanismos moleculares activados será la muerte celular por apoptosis o necrosis.

2.4.1.a. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Como consecuencia de la falta del aporte de oxígeno durante la isquemia, se reduce la producción de ATP, bloqueándose la función de la bomba Na^+/K^+ ATP-dependiente en hepatocitos, CK y CES. Aumenta el Na^+ intracelular y la entrada de agua produciendo el hinchamiento de los hepatocitos y el estrechamiento de la luz de los sinusoides hepáticos. En estas condiciones, tres mecanismos principales desencadenan la producción de ROS: la conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa por el aumento de los productos de degradación del ATP, la activación de NADPH oxidasa de las KC y CES, y el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial [24]. Por esta producción de ROS, disminuye la función de la enzima óxido nítrico sintasa (cNOS) constitutiva en las CES, liberando menos óxido nítrico (NO), que es un potente vasodilatador, agravando el estrechamiento de la luz sinusoidal [25].

Las ROS dañan las membranas lipídicas (plasmáticas e intracelulares), contribuyendo a la entrada de agua en la célula, el hinchamiento de la misma y su muerte por necrosis y apoptosis [26].

Colateralmente, este proceso implica la liberación de potentes vasoconstrictores como endotelina y tromboxano A₂ [27].

2.4.1.b. Factores humorales: sistema del complemento y citoquinas

El sistema del complemento está implicado en la inducción de síntesis de ROS sobre las CK, en la activación de estas células y de los neutrófilos, que retroalimenta la generación de más ROS y en la acumulación continuada de neutrófilos en el hígado durante la reperfusión [28].

Respecto a las citoquinas y quimioquinas, existe una compleja red de interacciones que inician y propagan el daño por IR en el hígado isquémico. La principal citoquina que desencadena la cascada proinflamatoria es el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) producido por las CK activadas. En un estado en el que se promueve la síntesis de ROS, estas especies potencian las síntesis de TNF- α que se unirá a su receptor específico en la superficie de los hepatocitos, y estimula la síntesis de la proteína chemokine epithelial neutrophil activating protein-78 (ENA-78), la síntesis de ROS, la expresión en superficie de CD95 (que conduce a la apoptosis celular y actúa de ligando de las células NKT promoviendo la destrucción directa de los hepatocitos), la activación del factor de transcripción NF- κ B y la activación de la kinasa activada por mitógenos (MAPK) c-Jun N-terminal (JNK). Por otro lado TNF- α estimula la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 y P-selectina. Todo conduce al reclutamiento de neutrófilos en el hígado post-isquémico y al daño directo sobre las células hepáticas [29].

Además de TNF- α , otras múltiples citoquinas se encuentran implicadas en el daño por IR. Las de mayor relevancia quedan resumidas en la Tabla 5 [27].

Tabla 5. Principales citoquinas implicadas en el daño hepático por IR

Citoquina	Fuente celular	Efecto en el hígado
INF- γ	Linfocitos T, células NKT, hepatocitos	Incrementa el daño IR*
IL-1 β	CK	Incrementa el daño IR
IL-18	CK	Incrementa el daño IR
VEGF	CK, linfocitos T, CES, hepatocitos	Incrementa el daño IR

CK: células de Kuppfer; VEGF: factor de crecimiento vascular-endotelial; CES: células endoteliales sinusoidales; NKT: células natural killer T.

*En condiciones de dosis farmacológicas reduce el daño IR.

Todas estas moléculas implicadas finalmente conducirán a la expresión de otras moléculas que promoverán el daño por IR o bien contribuirán a estimular el mismo: factores de transcripción (proteína activadora-1 [AP-1]), factores de choque térmico, factores de transducción de la señal y activación 3 y 6 (STAT-3 y STAT-6), antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión), moléculas de adhesión (ICAM-1, E-selectina), enzimas

inflamatorias inducibles (ciclooxigenasa 2 [COX2], óxido nítrico sintasa inducible [iNOS]), moléculas de señalización intracelular (Akt), proteínas antiapoptóticas (Bcl-2/Bcl-x) y quimioquinas (ENA-78, CINC, IP-10, MCP). En última instancia, se dirigirá la acumulación y reclutamiento de neutrófilos, macrófagos/monocitos y linfocitos T en el hígado bajo IR [27].

2.4.1.c. Señales de daño endógeno

Las células que se encuentran bajo condiciones de estrés o dañadas liberan activamente componentes intracelulares o de la matriz extracelular. Estas moléculas denominadas patrones moleculares asociadas a daño (DAMPs) contienen estructuras comunes reconocidas por receptores específicos que inician y propagan una respuesta inflamatoria.

Los principales receptores de reconocimiento de patrón (RRP) implicados en el daño por IR son los Toll-like receptors (TLR), especialmente TLR4 y el receptor para productos finales de glicosilación avanzada (RAGE).

TLR4 se expresa en múltiples subtipos celulares y su activación por un ligando conducirá a la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y otros mediadores inflamatorios, como factores de transcripción (NF- κ B, AP-1 o STAT), la kinasa JNK y a la generación de ROS [30]. No obstante, recientes publicaciones han mostrado la implicación de TLR9 en la mediación del daño por IR tras su activación por sus ligandos HGMB1 o ADN celular [31].

RAGE se expresa principalmente en células dendríticas y CK. El daño hepático supone la sobreexpresión de RAGE y la liberación de su ligando HGMB1 por los hepatocitos dañados. HGMB1 activará a RAGE y con este, una cascada de señalizaciones que conducen a la expresión de JNK/ERK que incrementan la expresión del factor de transcripción de crecimiento temprano inducible-1 (Erg-1). Erg-1 coordinará la expresión de familias génicas que promueven el reclutamiento de células inmunológicas al hígado post-isquémico [32]. La activación de RAGE, mediante otros ligandos, activa otras vías

intracelulares que finalizan en la estimulación de mediadores proinflamatorios (p-38MAPK) y factores de transcripción (STAT-3, AP1) con la consiguiente expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- α [33].

2.4.1.d. Daño mediado por células

El principal subtipo celular implicado en el daño por IR son las CK, activadas por las ROS y por el sistema del complemento. Las CK activadas generan directamente ROS y producen IL-1 β y TNF- α , que activan la migración de neutrófilos y linfocitos T CD4⁺ al hígado (promovida también por la metaloproteinasa-9 liberada de la matriz extracelular) donde estimulan la síntesis de ROS por los hepatocitos y CES, y de moléculas de adhesión por los hepatocitos alimentando la agregación leucocitaria y plaquetaria.

Los linfocitos T CD4⁺ activados liberan IL-17 e INF- γ , que activan a las CK (activación recíproca entre CK y linfocitos T CD4⁺), a los hepatocitos y a las células NKT. Estas últimas, dañan directamente el tejido hepático y además sintetizan INF- γ que retroalimenta la activación de CK y hepatocitos [34].

Las moléculas de adhesión expresadas en la superficie de hepatocitos y CES (VCAM-1 e ICAM-1), permiten la migración de los neutrófilos a través del endotelio, accediendo al parénquima hepático donde generan ROS y liberan el contenido de sus vesículas citotóxicas con enzimas capaces de degradar los hepatocitos y la matriz extracelular [35].

2.4.2. Rechazo del injerto

Se define el rechazo del injerto como el fallo del mismo debido a la respuesta inmunológica por parte del receptor del trasplante. Mientras las técnicas quirúrgicas, la terapia inmunosupresora y la preservación del órgano han mejorado la supervivencia del paciente y han permitido la expansión del trasplante hepático como opción terapéutica, el rechazo del injerto se ha convertido en uno de los principales problemas asociados al trasplante, representando una importante causa de disfunción del injerto y pérdida del mismo.

En el proceso de rechazo se ven implicados múltiples mecanismos inmunológicos tras el reconocimiento por los linfocitos T de antígenos extraños en el injerto trasplantado. Desde este punto, se desencadenarían respuestas celulares y humorales dirigidas a la destrucción del injerto, potenciadas por las citoquinas y otros factores solubles que inducen la sobreexpresión de moléculas de histocompatibilidad que retroalimentan la activación inmune.

En el trasplante hepático, la respuesta inmune se dirige predominantemente frente al endotelio vascular y al epitelio de los conductos biliares, aunque los mecanismos moleculares exactos no están completamente esclarecidos [36, 37]. Los diversos tipos de rechazo se describen a continuación.

2.4.2.a. Rechazo hiperagudo (RH)

Ocurre entre las primeras horas y la primera semana y está mediado por anticuerpos preformados en el receptor específicos frente al donante. Estos anticuerpos se dirigen frente a la vasculatura causando daño endotelial con activación del sistema del complemento, vasoespasmos, trombosis y necrosis del tejido hepático. El RH no es muy común en trasplante hepático en comparación con renal o cardíaco. No se conoce muy bien el motivo de la resistencia hepática al rechazo hiperagudo, pero podría deberse al secuestro de estos anticuerpos circulantes por las CK o por antígenos de histocompatibilidad solubles en la circulación.

2.4.2.b. Rechazo celular agudo (RCA)

Aparece entre el día 5 y 30 post-trasplante, aunque se desarrolla con mayor frecuencia tras la sexta semana. Su presentación es común en pacientes con terapia inmunosupresora inadecuada, pacientes pediátricos o en pacientes con anticuerpos donante-específicos o pruebas cruzadas positivas. Conforme transcurre el tiempo post-trasplante la incidencia de este tipo de rechazo se reduce.

El RCA se caracteriza por 1) inflamación portal celular mixta, aunque predominantemente de células mononucleares (blastos o linfocitos activados) neutrófilos y eosinófilos, 2) inflamación subendotelial portal y/o de venas hepáticas terminales y 3) inflamación y lesión de los conductos biliares.

Existen tres grados de rechazo celular agudo, leve, moderado y severo, variando entre ellos la gravedad del mismo y los hallazgos clínicos e histopatológicos. En general la extensión y severidad de la inflamación portal permite diferenciar el RCA leve del moderado, mientras que la inflamación perivenular y la presencia de necrosis es distintiva del RCA severo.

2.4.2.c. Rechazo crónico (RC)

Consiste en un daño silente y progresivo del injerto hepático que lleva finalmente al fallo del órgano trasplantado. A diferencia de otros trasplantes de órgano sólido, en el hígado se considera un proceso potencialmente reversible debido a las características inmunobiológicas de este tejido y a la capacidad regenerativa de los conductos biliares (principal diana de este tipo de rechazo).

Normalmente se desencadena en pacientes con episodio terminal de un RCA no resuelto, presencia de múltiples RCA y afectación del endotelio sin previa identificación clínica de RCA. Independientemente del origen suele cursar con colestasis progresiva y aumento importante de las enzimas hepáticas.

2.4.3. Infecciones

Las complicaciones infecciosas representan en la actualidad una de las principales causas de morbilidad en los receptores de trasplante hepático. Hasta un 80% de los mismos desarrollarán al menos un episodio, que en la mayoría de los casos será superado. Pero en estos pacientes, sometidos a importantes condiciones de inmunosupresión, las infecciones oportunistas son una de las principales causas que conducen al fallecimiento en los tres

primeros años tras el trasplante [38, 39]. La figura 4 representa el cronograma de aparición de infecciones.

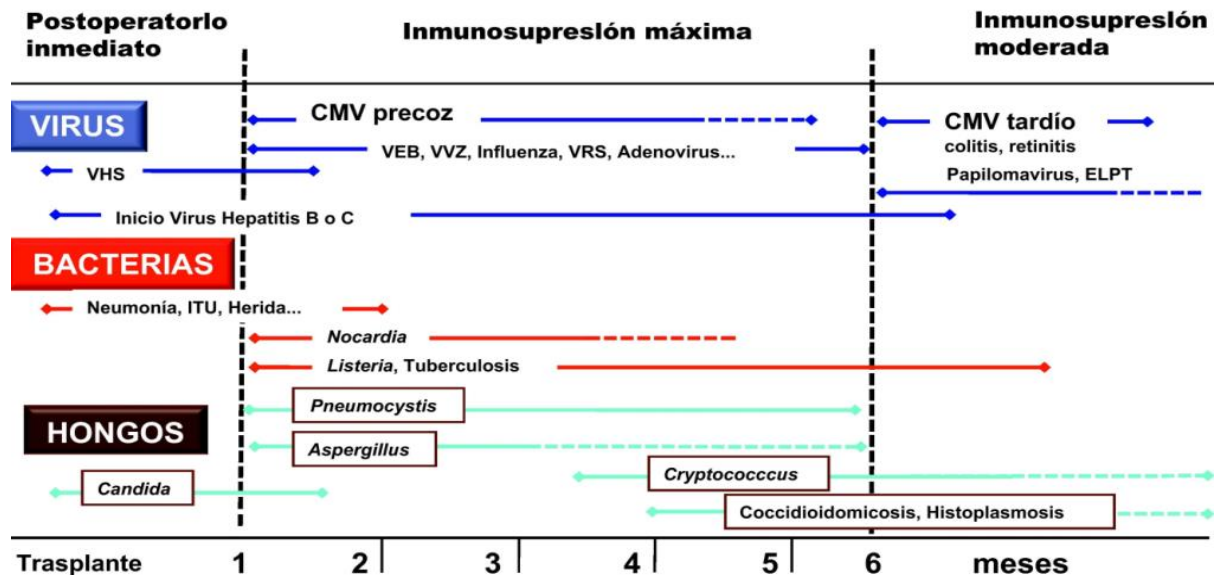


Figura 4. Cronograma de complicaciones infecciosas tras el trasplante hepático. La figura muestra un esquema de la aparición con el tiempo de las diferentes infecciones más frecuentes en el período post-trasplante. (Adaptado de Salavert M. et al. [40]).

Las infecciones más frecuentes son de etiología bacteriana, con la mayor incidencia en el primer mes post-trasplante [41]. Las más comunes son las infecciones en la herida quirúrgica, intra-abdominales, bacteriemias (predominantemente gram positivas), infecciones del tracto urinario e infecciones respiratorias. Los principales factores de riesgo para estos tipos de infecciones son la hospitalización prolongada, la manipulación del sistema biliar y el requerimiento de procesos quirúrgicos, especialmente los invasivos [42].

Las infecciones virales pueden desarrollarse a lo largo de todo el período post-trasplante aunque predominan en el primer semestre, aunque existen influencias estacionales (*virus influenza, parainfluenza...*). Debido a que una de las principales causas de trasplante hepático es la infección por VHB o VHC, estos son los principales virus implicados, junto con los herpesvirus Citomegalovirus (CMV) y en menor proporción Varicela-Zoster y Herpes-Simplex [43].

Las infecciones de origen fúngico predominan durante los primeros meses post-trasplante, sobre todo cuando las condiciones de inmunosupresión son más estrictas. Los hongos más comunes son las diversas especies de *Cándida*, seguidas de *Aspergillus* y en última instancia los responsables de las mucormicosis (*Rhizopus*, *Absidia*...) [44].

2.4.3.a. Citomegalovirus (CMV)

La infección por CMV es frecuente y contribuye de forma significativa a la morbilidad y mortalidad de los pacientes mediante mecanismos directos e indirectos.

CMV es un herpesvirus ubicuo, con el que casi la totalidad de la población ha entrado en contacto en algún momento de la vida. En individuos inmunocompetentes pasa generalmente inadvertido o se manifiesta como síndrome mononucleósico febril, pero es en pacientes inmunodeprimidos (trasplantados) cuando desencadena una elevada morbilidad y mortalidad [45].

Debido a su extraordinaria capacidad de evadir la respuesta inmune, queda latente en las células infectadas, que actúan de reservorio (principalmente en células endoteliales y macrófagos), esperando ser reactivado en situaciones de stress celular o de liberación de citoquinas, o esperando a ser transferidas a través del órgano donado [46].

- ***Inmunidad celular y humoral***

En la infección primaria se generan anticuerpos específicos frente a diferentes proteínas del tegumento (pp65), glicoproteínas de la envoltura del virus (gH, gB, gL...) o proteínas no estructurales (IE1). No está muy clara la función de estos anticuerpos, aunque recientes estudios indican que actúan limitando la diseminación del virus y las manifestaciones clínicas [47].

En cuanto a la respuesta celular, las células T y las células NK son las principales implicadas en el control de la replicación CMV y prevención de la infección. Las partículas virales intracelulares son degradadas por el proteasoma, transportadas al retículo endoplásmico y presentadas por las MHC-I a los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs)

desencadenado su respuesta citotóxica. Además de la liberación de sus gránulos citotóxicos en la célula diana, el CTL libera las citoquinas proinflamatorias $\text{INF-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$, que activarán a los fagocitos e inducirán la inflamación manteniendo la respuesta en el tiempo.

Las células NK reconocen aquellas células que no expresan en superficie MHC y liberan el contenido de sus gránulos citotóxicos en ellas. Además también son fuente importante de $\text{INF-}\gamma$, contribuyendo al mantenimiento de la respuesta hasta la eliminación del virus [48]. Tanto la respuesta humoral como la celular por la mediada por CTLs y células NK, se potenciarán y mantendrán por la acción de los linfocitos T CD4^+ activados vía MHC-II [49].

- ***Evasión de la respuesta inmune***

Entre el 10-20% de los genes de CMV codifican para proteínas homólogas a las del sistema inmune humano, incluyendo moléculas MHC, citoquinas y quimioquinas y receptores solubles e integrales intracelulares y extracelulares [50, 51] (Tabla 6).

Tabla 6. Genes de CMV implicados en la evasión del sistema inmune

Gen CMV	Homólogo humano	Función
UL18	MHC-I	Inhibición de células T y NK con el receptor NKG2D/CD94 (linfocitos $\text{T}\gamma\delta$, células de memoria, CD, células B y monocitos)
UL33, US27, US28	CCR1	Receptor de quimioquinas que actúa secuestrándolas e impidiendo su función
UL78	CCR1	Promueve la inflamación y migración leucocitaria
UL11a	IL-10	Inhibe IL-12, $\text{INF-}\gamma$ y CDs, impide el desarrollo de las células B y PBMCs y reduce la expresión de MHC
UL144	Superfamilia TNFR	Impide la segunda señal de la interacción antígeno-anticuerpo e inhibe vías apoptóticas
UL146, UL147	IL8	Promueve la inflamación y migración leucocitaria
Un	Fc	Aclaramiento de anticuerpos específicos frente a CMV

NK: células NK; CD: células dendríticas; PBMCs: células sanguíneas periféricas mononucleares; TNFR: receptor para factor de necrosis tumoral.

Estos genes permitirán a CMV:

- 1) reclutar más células inmunes para propagar la infección.
- 2) modular la respuesta inmune inhibiendo la expresión en superficie de MHC (tanto la presentación antigénica como la lisis mediada por las células NK).
- 3) regular la lisis celular, inhibiéndola para mantener la infección, o favoreciéndola para propagar partículas virales.

- ***Impacto clínico en el trasplante***

El impacto directo ejercido por CMV sobre el paciente trasplantado es el resultante de la infección que puede manifestarse como síndrome viral leve (fiebre y mielodepresión) o como enfermedad tisular invasiva (colitis, gastroenteritis, esofagitis o hepatitis). La hepatitis por CMV es común en el trasplante hepático, con la complicación añadida de presentar clínica compartida con el rechazo agudo del injerto. Su diferenciación requerirá en la mayoría de los casos biopsia del injerto para demostrar la invasión tisular, con los riesgos añadidos que este procedimiento supone. Estos efectos directos ocurren principalmente durante los 3 primeros meses post-trasplante y presentan una incidencia muy superior en pacientes seronegativos que reciben un órgano seropositivo, considerándose esta población como la de mayor riesgo, que requiere una terapia profiláctica con ganciclovir o valgancilovir [46].

Los efectos indirectos de CMV son debidos a su capacidad inmunomoduladora, ya que es capaz de promover la sobreexpresión de alo-antígenos, incrementando el riesgo de desencadenar rechazo del injerto agudo y crónico. Diversos estudios han relacionado la infección por CMV con el desarrollo de síndrome de destrucción biliar, colestasis crónica y en ocasiones rechazo agudo del injerto. La infección por CMV también ha sido relacionada con procesos de trombosis arterial hepática resultante de la infección de las células endoteliales vasculares, además de la predisposición a otras infecciones oportunistas [52, 53].

2.4.4. Otras complicaciones

2.4.4.a. Enfermedad del injerto contra huésped (EICH)

La enfermedad del injerto contra el huésped es el proceso resultante del “ataque” al paciente inmunosuprimido de las células inmunocompetentes transferidas con el injerto trasplantado. En torno a 10^9 - 10^{10} linfocitos del donante permanecen en el tracto portal y parénquima hepáticos y con el trasplante colonizan al receptor y reconocen sus tejidos como extraños.

Es un proceso ampliamente estudiado en el trasplante de médula ósea, sin embargo en el trasplante de órgano sólido representa una incidencia del 0.2-1%, aunque se estima una mortalidad superior al 75%, presentándose entre la 2 y 6 semanas tras el trasplante [54]. La EICH puede ser clasificada por presentación humoral o celular y en un proceso agudo o crónico según el momento post-trasplante en el que suceda y la actividad inmunitaria desencadenada.

La presentación humoral, se caracteriza por la presencia de hemolisis y fiebre y suele darse en casos de trasplante bajo incompatibilidad ABO. El EICH celular, se produce cuando las células inmunocompetentes del donante se activan y expanden, cargando una respuesta celular normalmente frente a las moléculas MHC, resultando en una enfermedad multisistémica con tasas de mortalidad elevadas [55].

El proceso es agudo cuando ocurre en los 100 primeros días post-trasplante y se caracteriza por la lesión de los conductos biliares intraepiteliales con infiltración ocasional, necrosis intraluminal e inflamación del tracto portal leve [56, 57].

La EICH tipo crónica aparece tras los 100 días post-trasplante y las lesiones histopatológicas son similares a las de EICH agudo, pero difieren en la extensión de las mismas. Los conductos biliares intraepiteliales son reducidos o están ausentes, existe inflamación portal con infiltración de linfocitos y células plasmáticas acompañada de fibrosis y en ocasiones inflamación o hasta necrosis periportal [57, 58].

2.4.4.b. Complicaciones específicas

En el transcurso de las primeras semanas post-trasplante, pueden aparecer otras alteraciones que requieran atención especializada. La Tabla 7 muestra las complicaciones no infecciosas ni inmunológicas más frecuentes [59].

Tabla 7. Otras complicaciones del trasplante hepático

Complicaciones respiratorias	Enfermedad cardiovascular
Neumonía	Hipertensión
Edema pulmonar	Isquemia miocárdica
Síndrome de distrés respiratorio agudo	Valvulopatía
Hipertensión portopulmonar	Miocardopatía
Síndrome hepatopulmonar	Complicaciones neurológicas
Diabetes mellitus	Convulsiones
Coagulopatías	Hemorragia del sistema nervioso central
Insuficiencia renal	Mielinólisis pontina central

3. LA INMUNIDAD INNATA

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del huésped frente a las agresiones externas. Está constituida por componentes celulares (macrófagos, monocitos, células dendríticas, neutrófilos o células Natural Killer “NK” entre otras) y componentes solubles (sistema del complemento, pentraxinas, ficolinas, etc) en un estado basal plenamente funcional, preparados para responder de forma inmediata a las agresiones (“innatos”). Ejerce un control permanente (vigila, controla y elimina) y además de responder a la agresión provocada por patógenos y a los procesos de daño celular, provee un conjunto de señales indispensables para la activación y orientación de la posterior respuesta inmune adaptativa. Estas respuestas se desencadenarán por el reconocimiento de moléculas extrañas o señales de daño celular a través de receptores celulares y solubles, y a través del reconocimiento de células extrañas por las células NK [60].

En el contexto del trasplante, bajo las condiciones de inmunosupresión generalmente dirigidas a tratar de limitar la respuesta inmune adaptativa, la “defensa global” del receptor de trasplante recaerá en mayor proporción sobre la inmunidad innata (Fig. 5):

- responderá frente a las agresiones resultantes del proceso de IR característico del trasplante.
- iniciará y orientará la respuesta adaptativa activando a linfocitos T y B, y generando memoria inmunológica, ambos desencadenantes del desarrollo de rechazo del injerto como complicación post-trasplante.
- se encargará del control de infecciones, que determinan el estado proinflamatorio y la posterior respuesta antígeno-específica mediada por linfocitos T y B, la cual influirá en la supervivencia de injerto y paciente.

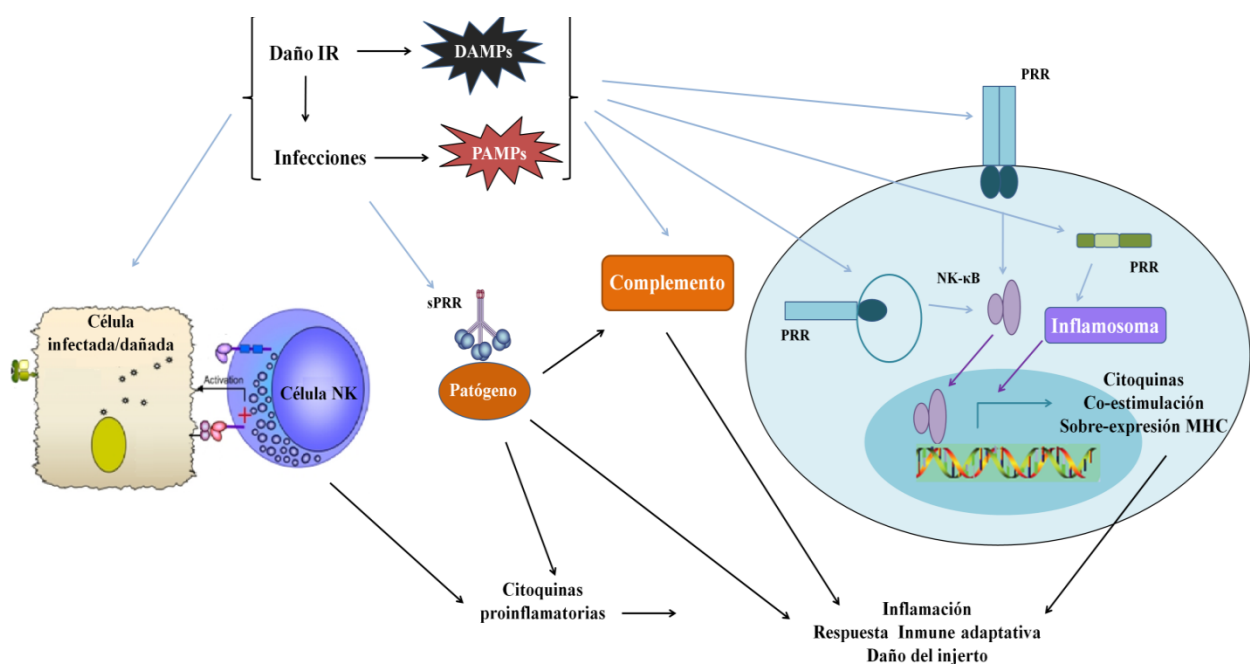


Figura 5. Vías moleculares de la inmunidad innata activadas tras el trasplante hepático. La figura muestra una representación esquemática de los eventos desencadenados por el daño IR y la presencia de infecciones tras el trasplante. (Adaptado de Brennan TV. et al. [61]).

IR: isquemia-reperfusión; PAMPs: patrones moleculares asociados a patógeno; DAMPs: patrones moleculares asociados a daño; PRR: receptores de reconocimiento de patrón; sPRR: receptores solubles de reconocimiento de patrón; MHC: complejo principal de histocompatibilidad.

La evolución del trasplante dependerá del estado del injerto, de la complejidad del procedimiento quirúrgico, de las posibles complicaciones posteriores y de las características intrínsecas del receptor, y de todos estos únicamente el perfil del receptor puede ser evaluado previamente al trasplante. En este sentido el estado funcional de la inmunidad innata propio de cada paciente, ejercerá una relevante influencia en la evolución del trasplante. Éste estado funcional estará definido en parte por el repertorio genético que posean los componentes constituyentes de la misma, de esta forma, el repertorio genético de la inmunidad innata influirá en la evolución del paciente trasplantado.

3.1. Reconocimiento de patrones moleculares mediante receptores

En el contexto de la infección la respuesta inmune innata se desencadena tras el reconocimiento de patógenos a través de estructuras altamente conservadas, características y exclusivas de los microorganismos denominadas patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs) (Tabla 8).

Tabla 8. Patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs)

Estructura molecular		Patógeno
Ácidos nucleicos	ssRNA	Virus
	dsRNA	Virus
	CpG	Virus, bacteria
Proteínas	Filina	Bacteria
	Flagelina	Bacteria
	N-formilmetionina	Bacteria
Lípidos de la Pared celular	LPS	Bacteria Gram -
	Ácido Lipoteicoico	Bacteria Gram +
Carbohidratos	Manano	Hongos, bacterias
	Glucanos tipo Dectina	Hongos

ssRNA: RNA de cadena simple; dsRNA: RNA de doble cadena; CpG: citidina-guanina dinucleótido; LPS: lipopolisacárido bacteriano.

Estos patrones moleculares generalmente son esenciales para la supervivencia de los microorganismos, de esta forma el sistema inmune asegura que los patógenos no desarrollaran mecanismos para evadir la respuesta inmune “modificando o eliminando” estos PAMPs [62-64].

Además, el sistema inmune innato es capaz de reconocer moléculas constituyentes o liberadas por las células dañadas o en proceso de muerte celular denominadas patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Tabla 9). Mediante este reconocimiento el sistema inmune es capaz de reaccionar frente la inflamación estéril (procesos isquémicos o quirúrgicos, traumas, drogas farmacológicas, etc). Incluso en determinadas situaciones las células sanas liberarían estas moléculas para potenciar la respuesta inmune frente a infecciones [62-64].

Tabla 9. Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)

Estructura molecular	
Proteínas inducidas por estrés	HSPs
Cristales	Urato monosódico
Proteínas nucleares	HMGB1

HPS: proteína de choque térmico; HMGB1: grupo de alta movilidad box1.

Tanto PAMPs como DAMPs, serán reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrón (RRP) localizados en fagocitos, células dendríticas y células epiteliales principalmente. Estos receptores están codificados en la línea germinal y presentan un repertorio limitado.

Los RRP se localizan en la superficie celular, membranas endosómicas o en el citoplasma celular, asegurando el reconocimiento extra e intracelular. Además de los receptores propiamente dichos, existe una tercera categoría de moléculas secretadas que reconocen la superficie de los microbios. Estas moléculas solubles activarán el sistema del complemento u opsonizarán el patógeno, permitiendo el aclaramiento de microbios de la sangre u otros fluidos mediante el estímulo de la fagocitosis o activando mecanismos de destrucción.

Todo este sistema de reconocimiento específico frente a estos patrones, evita que el sistema inmune desencadene respuestas frente a las células sanas. Además existe un potente sistema de regulación mediado por proteínas expresadas por células sanas que previene la activación del sistema inmune innato cuando no es necesario.

a) Receptores trans-membrana y citosólicos:

- **Receptores tipo Toll-like (TLRs):** se describen más adelante.
- **Receptores tipo nucleotide oligomerization domain (NOD)-like (NLRs):** Proteínas citosólicas que presentan un dominio c-terminal con repeticiones de Leucina responsable de detectar el ligando, un dominio central NACHT que permite la auto-oligomerización y un dominio N-terminal transductor de la señal al núcleo. Éste último puede ser un dominio de reclutamiento de caspasas, un dominio baculovirus inhibidores de repeticiones, un dominio pirina o un dominio ácido de transactivación determinando la subfamilia a la que pertenece NLRA, NLRB, NLRC y NLRP respectivamente. Reconocen diversas estructuras de bacterias gram negativas y positivas, y además los DAMPS cristales endógenos, pérdida de integridad de la membrana celular y la disminución del K⁺ intracitoplasmático [62, 65].
- **Receptores tipo RIG-like (RLRs):** Actúan como sensores intracelulares de RNA viral mono o bicatenario. Contienen dos dominios N-terminal reclutadores de caspasas que conducirán finalmente a la expresión de los factores de transcripción IRF3 e IRF7 y la expresión de los Interferones tipo I antivirales. Otros RLRs pueden ejercer sus funciones efectoras a través del factor de transducción NF-κB [65, 66].
- **Receptores C-type lectin-like:** Se localizan en diversos tipos celulares (macrófagos, células dendríticas o células tisulares) o como receptores solubles. Reconocen azúcares terminales en la superficie de los microorganismos (receptores de manosa) y carbohidratos de los hongos (receptores dectina 1 y 2) desencadenando la inflamación y la respuesta inmune adaptativa. Además los receptores de manosa poseen una vía propia para la activación del sistema del complemento [62, 63, 67].

- **Receptores scavenger:** Proteínas de la superficie celular que eliminan de la circulación las lípoteínas oxidadas, promueven la fagocitosis de patógenos y actúan como co-receptores de determinados TLR potenciando su respuesta frente a ácido lipoteicoico o lipopéptidos. Reconocen gran diversidad de estructuras moleculares: LPS, ácido lipoteicoico, ácidos nucleicos, β -glucanos o proteínas [62, 63].

- **Receptores N-formil-met-leu-phe (FPR y FPRL1):** Se expresan en neutrófilos y macrófagos y reconocen péptidos bacterianos con el residuo N-formil-met-leu-phe. Éste reconocimiento estimula la migración celular actuando como uno de los primeros y más potentes quimioatrayentes para los leucocitos [62, 63].

b) Receptores solubles:

- **Sistema del complemento:** se describe más adelante.
- **Pentraxinas:** La proteína C reactiva (PCR) y al amiloide P reconocen moléculas fosfolipídicas de la membrana bacteriana y células apoptóticas. PTX3 reconoce moléculas de origen fúngico, bacterias gram positivas y negativas, y virus. Todas actúan recubriendo patógenos o células dañadas y activando el sistema del complemento mediante la vía clásica [62, 68].

- **Colectinas:** Grupo de moléculas con dominio lectina tipo C. El representante es la lectina de unión a manosa (MBL) que une carbohidratos con manosa terminal de patógenos actuando como opsonizante. Además presenta una vía propia de activación del sistema del complemento [62, 63].

- **Ficolinas (P, M y H):** Grupo de moléculas con dominio fibrinógeno. Opsonizan y activan el sistema del complemento de forma similar a MBL, pero sus ligandos son N-acetilglucosaminas y ácido lipoteicoico (pared celular de gram positivas) [62, 68].

Debido a su relevancia en el presente trabajo, los receptores Toll-like receptor 4 como representantes de los receptores transmembrana, y el factor C3 del sistema del

complemento como representante de los receptores solubles, se describen en apartados independientes.

3.1.1. Toll-like receptor 4 (TLR4)

La familia de receptores TLR representa los receptores de reconocimiento de patrón “modelo”. Se encuentran ampliamente conservados y expresados en múltiples subtipos y localizaciones celulares que aseguran el reconocimiento de una gran variedad de productos microbianos y ligandos endógenos indicadores de daño celular (Fig. 6).

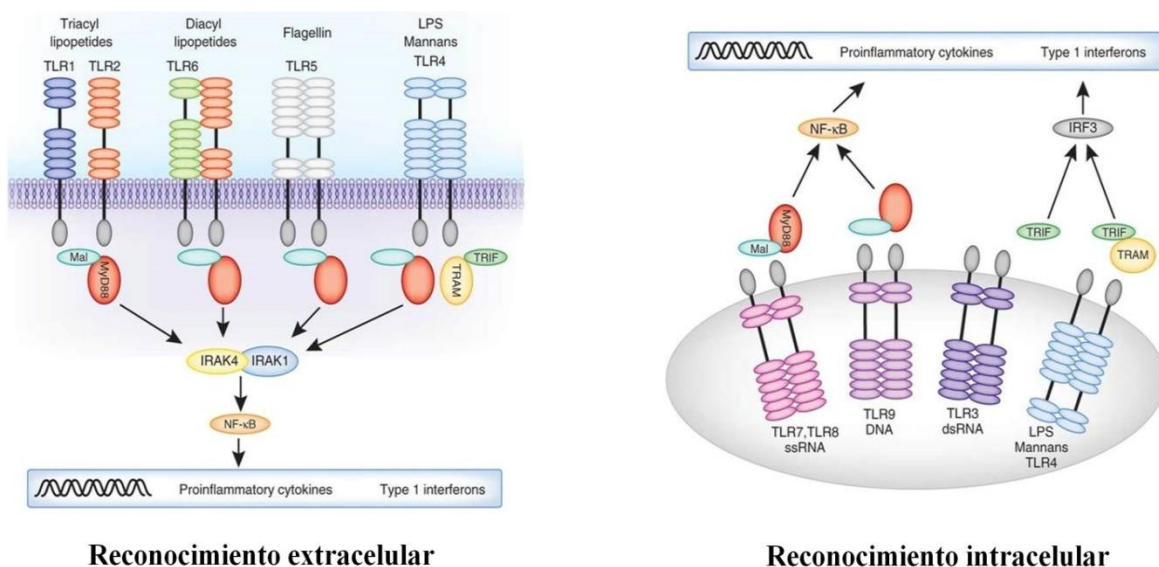


Figura 6. Localización, ligandos y vías de señalización de los receptores TLR. La figura muestra los receptores y su localización en la célula, así como sus ligandos y las moléculas adaptadoras necesarias para que se desencadenen sus correspondientes vías de activación. (Adaptado de Netea MG. et al. [69]).

Toll-like receptor 4 fue descrito en 1997 como el primer receptor homólogo al receptor *Toll* de *Drosophila melanogaster* identificado en mamíferos [70]. Actualmente se han identificado en humanos 11 TLRs diferentes de los que se han caracterizado funcionalmente 9.

TLR4 ha sido uno de los receptores más ampliamente estudiados y caracterizados, y debido a los múltiples y diversos ligandos que han sido identificados para el mismo, en la

actualidad constituye uno de los primeros sensores innatos de la respuesta inmune, no sólo frente a infecciones, sino también frente a procesos de inflamación estéril desencadenados por daño celular [71].

3.1.1.a. Características estructurales, localización y ligandos

Se encuentra codificado por el gen *TLR4* localizado en la región cromosómica 9q33.1. Consta de 10.176 pares de bases distribuidas en 3 exones que codifican para una proteína de 839 aminoácidos [72].

Se expresa principalmente en la superficie en células del sistema inmune (neutrófilos, macrófagos, células presentadoras de antígeno), aunque recientemente se ha identificado en múltiples subtipos celulares expresados constitutivamente o inducidos en el curso de infecciones o daño celular.

Estructuralmente es una glicoproteína integral de membrana tipo I con 18 repeticiones ricas en leucina (LRR) formando motivos LxxLxLxxN (L: leucina; X: aminoácido; N: asparagina) responsables de su especificidad, flanqueadas por residuos ricos en cisteína en la región extracelular. En la cola citoplasmática presentan el dominio homólogo del receptor Toll/IL1 (TIR) esencial para la señalización [71].

TLR4 es capaz de reconocer una importante diversidad de moléculas. Su principal ligando es el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de bacterias gram negativas, aunque también puede detectar DAMPs (HSP60, HSP70, oligosacáridos de heparán sulfato, dominios extracelulares de fibronectina y fibrinógeno o fibrina extravasculares), determinados grupos de proteínas de origen viral (proteína de fusión del virus respiratorio sincitial, virus tumoral mamario murino o el virus de leucemia murino) e incluso moléculas de taxol (fármaco antitumoral) [73]. Esta variabilidad en el reconocimiento de moléculas se cree que pueda deberse al reclutamiento de diversas moléculas accesorias que le permite ampliar el espectro de ligandos [74].

3.1.1.b. Vías de activación

La unión del ligando a TLR4 origina la homodimerización del receptor. A diferencia del resto de receptores de su familia, TLR4 puede emplear 4 proteínas citosólicas adaptadoras que contienen el dominio TIR: MyD-88 (myeloid differentiation primary-response gene 88), TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF), MyD-88 adaptor-like protein (Mal) y TRIF-related adaptor molecule (TRAM), para iniciar dos tipos de vías, dependiente e independiente de MyD-88 [75]. No está completamente esclarecida la secuencia de procesos para que TLR4 emplee ambos mecanismos competitivos. Los estudios apuntan a la existencia de una fase temprana en la que se inicia la vía MyD-88-Mal que finaliza con la internalización del complejo, permitiendo que se inicie la segunda vía tardía mediada por TRIF [76, 77].

- **Vía dependiente de MyD-88 (Fig. 7):**

Tras la dimerización de TLR4, MyD-88 a través del adaptador Mal se asocia con el dominio citoplasmático de TLR4 y se reclutan secuencialmente las quinasas asociadas al receptor de IL-1, IRAK4 e IRAK1/2 [78]. Estas quinasas se fosforilan e IRAK1/IRAK2 se asocian con TRAF6 (TNF-receptor associated factor 6) que actúa como ligasa de ubiquitina E3 y junto con el complejo de ubiquitinación E2, catalizan la poliubiquitinación de la subunidad quinasa I κ B (IKK) y el complejo modificador esencial de NF- κ B (NEMO) de TRAF6 [79, 80]. TRAF6 reclutará a la quinasa TAK1 que podrá iniciar dos vías:

-**Vía dependiente de IKK:** TAK1 fosforila y activa las subunidades IKK α (quinasa I κ B α) e IKK β (quinasa I κ B β) del complejo IKK. Estas subunidades fosforilan y activan a la proteína inhibidora I κ B que forma complejo con NF- κ B. La activación I κ B produce su degradación vía proteasoma, liberando a NF- κ B y permitiendo su traslocación de al núcleo, donde se une a regiones promotoras y enhancer de genes codificantes para proteínas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) [81, 82].

-**Vía de MAPK** (mitogen-activated protein-kinase): TAK1 fosforila varios miembros de quinasas MAP como MKK3, MKK4, MKK6 y MKK7. Las MKK3/6 se fosforilan y

activan a p38, mientras MKK4/7 activan la kinasa c-Jun N-terminal (JNK). Ambas señales activarán el factor de transcripción activador de proteína 1 (AP1) que promoverá la síntesis de múltiples proteínas proinflamatorias [83].

- **Vía independiente de MyD-88, TRIF-dependiente (Fig. 7):**

Tras su dimerización, TLR4 se transporta al endosoma a través de la molécula DYNAMIN, donde formará el complejo con TRAM y TRIF [84] reclutadas en el dominio citoplasmático de TLR4. Posteriormente se desencadena la cascada en la que TRAF3 y TANK unen las kinasas TKB1 e IKKε (kinasa IκBε) [85] que fosforilan a IRF3 (interferon regulatory transcription factor 3) e IRF7 (interferon regulatory transcription factor 7). Estas moléculas forman homo o heterodímeros, se trasladarán al núcleo y se unen a las secuencias diana de ADN codificantes para INFs (INF-α, INF-β entre otros) [86, 87]. NF-κB, AP1 y los IRF, constituyen el denominado enhanceosoma responsable de inducir la expresión de INF-β [88].

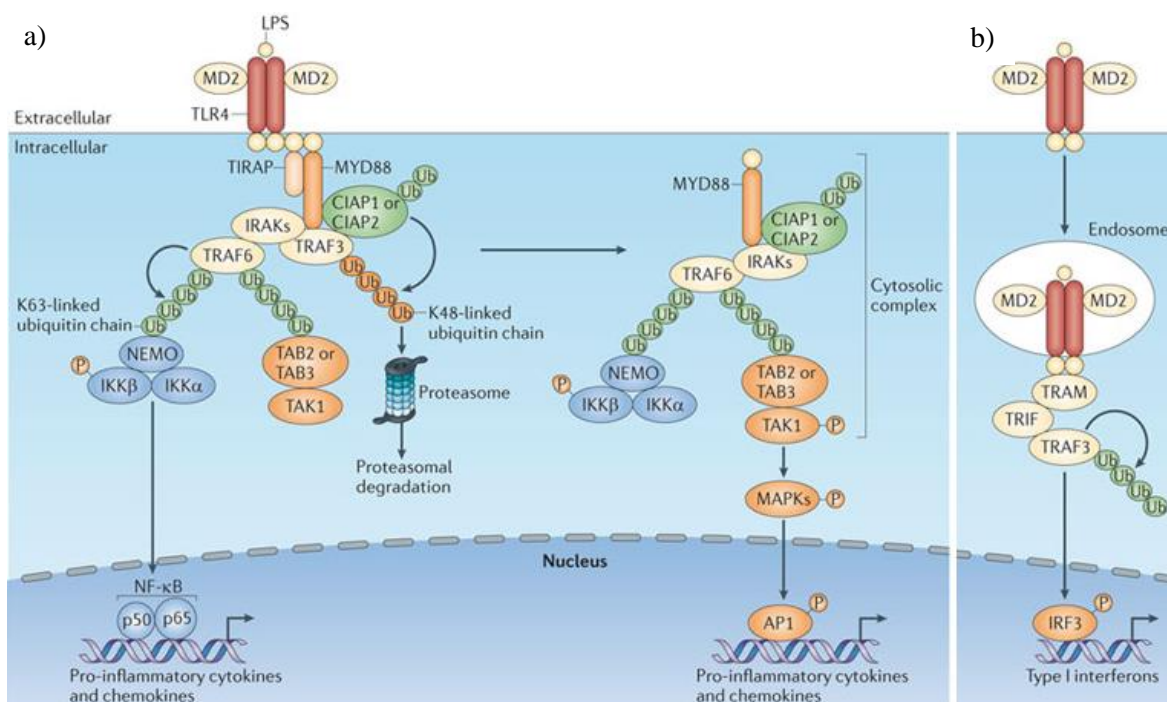


Figura 7. Vías de activación de TLR4 [89]. a) Vía MyD-88 dependiente que desencadena la expresión de citoquinas proinflamatorias a través de los factores de transcripción NF-κB y AP1. b). Vía MyD-88 independiente que permite la expresión de Interferones tipo 1 mediante las moléculas IRF.

3.1.1.c. Polimorfismos de funcionalidad reducida

La mayor variabilidad genética de TLR4 entre diferentes especies de mamíferos se localiza en el dominio LRR involucrado en el reconocimiento de patrones moleculares [90]. En humanos únicamente se han descrito dos polimorfismos tipo SNP (Single nucleotide polymorphism) con una frecuencia superior al 5% en población caucásica, Asp299Gly (*rs4986790*) y Thr399Ile (*rs4986791*) [91]. El polimorfismo Asp299Gly (Ácido Aspártico/Glicina) resulta del cambio nucleotídico c.896A>G y Thr399Ile (Treonina/Isoleucina) se debe a la sustitución c.1196C>T (GenBank Accession: NM_138554.3) [92]. Debido a la cercanía en la secuencia codificante presentan un elevado desequilibrio de ligamiento, lo cual implica que en la mayoría de los casos existe cosegregación de los dos SNPs [93].

El grupo de Arbour fue el primero en observar una respuesta reducida a LPS inhalado en presencia del polimorfismo Asp299Gly. Este grupo describió una activación de NF-κB disminuida en células THP-1 transfectadas con los alelos Asp299Gly/Asp299Gly en comparación con aquellas transfectadas con el alelo wildtype, y esta funcionalidad reducida parecía ser el resultado de la modificación de la estructura de la hendidura de reconocimiento de TLR4 para LPS como consecuencia del cambio de aminoácido [94]. Este trabajo supuso el inicio de estudios genéticos de asociación de estas variantes en diversas patologías o condiciones fisiológicas. Los resultados mostrados por los diversos grupos resultaron contradictorios, ya que mientras que una parte de estos trabajos no identificaron ninguna asociación, otra serie de estudios describió que la presencia de estos polimorfismos parecía correlacionarse con una funcionalidad reducida frente a infecciones (no sólo gram negativas) y patologías autoinmunes, y simultáneamente parecían ejercer un efecto protector frente a procesos inflamatorios (atopia, fiebre del heno) así como frente a procesos ateroscleróticos [95, 96]. Por otro lado, los diversos haplotipos resultantes de la combinación presencia/ausencia de ambos SNPs (wt/wt; wt/Asp299Gly; Asp299Gly/Thr399Ile; wt/Thr399Ile) podrían tener diferentes consecuencias fenotípicas y funcionales para el receptor TLR4 [96].

Los mecanismos moleculares que caracterizan la hiporreactividad de TLR4 como consecuencia fenotípica, no han sido esclarecidos en la actualidad. Diversos estudios han planteado diferentes hipótesis a lo largo del tiempo, como la expresión deficiente de TLR4 mutado, la activación reducida de NF- κ B y citoquinas derivadas en respuesta a diversos ligandos (LPS, Virus Respiratorio Sincitial o la proteína HSP60) o el impedimento de interacción de LPS con TLR4 [94-97]. Recientemente el grupo de Figueroa describió que el polimorfismo Asp299Gly comprometía el reclutamiento de MyD88 y TRIF, y la correcta dimerización de TLR4. Como consecuencia observaron una reducción en la activación de las vías de NF- κ B y p38 y en la expresión de IL-8 y TNF- α , y una fosforilación y activación de IRF3 deficiente reduciendo así la expresión de INF- β [98].

El mayor efecto de reducción de funcionalidad se ha atribuido a Asp299Gly, el cual se ha asociado con mayor predisposición a infecciones y sepsis [99], severidad en infecciones por Virus Respiratorio Sincitial principalmente en niños [100], susceptibilidad a tuberculosis en pacientes VIH [101] y susceptibilidad a enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa [102].

Los datos acerca del efecto funcional de Thr399Ile son escasos debido a su baja frecuencia en la población (4% en población europea) habiéndose asociado con una disminución moderada a la respuesta de LPS [103].

3.1.2. Papel de TLR4 en la inmunidad adaptativa y la respuesta inmune al trasplante

Tras la interacción de los TLRs con sus ligandos se inicia una cascada de señales que conduce a producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas e interferones. De esta forma los TLRs pueden considerarse un “puente” entre la inmunidad innata y la adaptativa, ya que inducen la maduración de células dendríticas, la presentación antigénica y el reclutamiento y activación de linfocitos T y B [104]. Estos procesos juegan un papel de gran importancia en el rechazo y tolerancia de los injertos.

Los TLRs se expresan en las células hepáticas y en las células del sistema inmune periféricas, lo que implica que en el contexto del trasplante hepático tanto los genotipos del

donante como los del receptor pueden jugar un papel funcional relevante. La anatomía del hígado supone además una llegada permanente de ligandos de TLR2 y TLR4 de origen infeccioso. Por otro lado, en el proceso del trasplante se genera gran cantidad de DAMPs agonistas principalmente de TLR4.

En el hígado sano predomina un ambiente de “tolerancia innata” debida a la expresión y señalización reducidas de los TLRs particularmente en las células de Kupffer y los macrófagos residentes en hígado [105, 106]. El paradigma actual sobre el papel de los TLRs en tolerancia y rechazo sostiene que la liberación de PAMPs y DAMPs durante el trasplante estimula la señalización a través de ellos, lo cual activa a las células dendríticas hacia su maduración, y conlleva un aumento de la presentación de aloantígenos y por tanto un aumento de las respuestas a antígenos del donante por parte de los linfocitos T alorreactivos [107]. En modelos murinos de injertos de piel y corazón se ha demostrado que la activación de TLRs puede anular el bloqueo de señales coestimuladoras y activar la inmunidad adaptativa con agonistas de TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9 capaces de impedir la supervivencia de los injertos [108], [109]. Se ha observado también que deleciones en TRIF y MyD88 se asocian con supervivencias prolongadas de los injertos dérmicos en ratones [110], y que TLR4, TLR8 y TLR9 contrarrestan los efectos supresores de las células T reguladoras [111, 112]. Aunque estos resultados no se han confirmado en modelos murinos o humanos de trasplante hepático, colectivamente apoyan que la señalización de TLRs juega un papel importante en la alorespuesta.

Existen evidencias clínicas que sostienen un papel importante de TLR2 y TLR4 en el rechazo celular agudo del trasplante hepático. En pacientes con rechazo celular agudo, en contraste con los pacientes sin rechazo, se ha observado una expresión aumentada de TLR2 y TLR4 en monocitos circulantes tras sufrirlo, y que la expresión disminuye tras el tratamiento del rechazo con esteroides [113]. Otro estudio observó una baja expresión de TLR4 en monocitos del receptor antes del trasplante hepático asociada a un riesgo reducido de sufrir rechazo celular agudo [114]. Estos datos sugieren que el antagonismo de TLR4 podría tener un papel terapéutico o profiláctico en rechazo. Además la

cuantificación de la expresión de TLR4 en monocitos podría ser útil como biomarcador predictivo de rechazo y para guiar una terapia personalizada.

En base a estos resultados, otros estudios han explorado el significado de los polimorfismos de TLR4 en el trasplante. En trasplante renal y pulmonar, se ha observado que los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile de TLR4 en los receptores se asocian con señalización disminuida y una incidencia reducida de rechazo [115, 116], así como superior frecuencia de infecciones bacterianas severas y oportunistas en el caso del trasplante renal. En trasplante hepático, el grupo de Eid y colaboradores [117] no encontró ningún efecto de los polimorfismos de TLR4 en la evolución del trasplante en pacientes trasplantados por infección por VHC. Por el contrario, Dhillon observó que el genotipo de TLR4 del receptor hepático no influía en la función hepática temprana del injerto, pero que en pacientes infectados por VHC el polimorfismo Asp299Gly del receptor favorecía la pérdida del injerto a largo plazo mientras que no tenía ningún efecto en pacientes no infectados [118]. Un último trabajo que ha estudiado la relación entre polimorfismos en TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR7 y rechazo celular agudo hepático, demuestra que el polimorfismo Leu412Phe en TLR3 en homocigosis se asocia con una frecuencia reducida del mismo en pacientes con infección por VHC sin embargo no ha identificado ningún efecto de los genotipos de TLR4 o del resto de los receptores TLR [119].

Por otro lado, datos recientes indican que los inmunosupresores utilizados en pacientes trasplantados pueden tener un importante efecto en la señalización por los TLRs. Se ha observado en particular que los inhibidores de la calcineurina, como ciclosporina o tacrólimus, disminuyen la señalización por TLRs, de modo que su efecto reductor del rechazo celular estaría mediado, además de por mecanismos dependientes de la inmunidad adaptativa, por la inhibición de la inmunidad innata. La consecuencia inmediata de esto sería que los inhibidores de la calcineurina podrían inhibir también la respuesta innata en la defensa frente a infecciones, lo cual podría repercutir de forma importante en la recurrencia de enfermedades después del trasplante hepático tales como la infección por VHC [106].

Por último debe señalarse que en el daño por isquemia reperfusión, que condiciona de forma temprana la evolución del injerto hepático, parece jugar un papel importante sobre todo el TLR4 expresado en las células de Kupffer [119, 120], dependiendo por tanto del genotipo del donante del órgano, y que la expresión de TLRs en el injerto hepático podría ser también importante en los procesos de regeneración hepática [106].

3.1.3. Factor C3 del sistema del complemento

El sistema del complemento fue descubierto en 1894 por Jules Bordet como un componente plasmático termolábil que aumentaba la opsonización y “complementaba” la destrucción bacteriana mediada por anticuerpos [121].

Consta de al menos 30 proteínas plasmáticas solubles (aunque también existen componentes expresados en la superficie celular) que se sintetizan fundamentalmente en el hígado. Una característica esencial, es que parte de estas proteínas se encuentran inactivas como zimógenos que requieren su activación proteolítica. De esta forma, la sucesiva cascada de activación de zimógenos, genera una enorme amplificación de productos proteolíticos responsables de los mecanismos efectores.

El sistema del complemento es uno de los mecanismos efectores más relevantes de la inmunidad innata, en el que el factor C3 (C3) ejerce una función esencial. Las tres vías de activación del sistema del complemento convergen en C3 (Fig. 8) y de todos los componentes de este sistema, es la proteína más abundante en plasma (1,2mg/mL) y la más versátil y multifuncional, ya que ha desarrollado durante el proceso evolutivo la capacidad de interactuar de forma específica con hasta 25 proteínas diferentes [122].

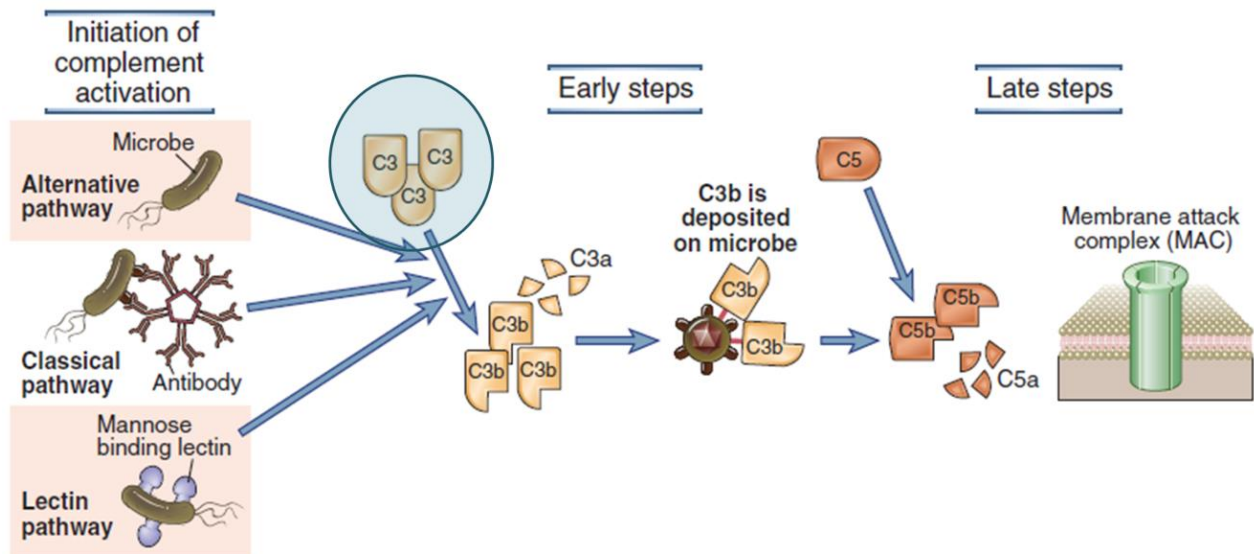


Figura 8. Vías de activación del sistema del complemento. Las tres vías de activación mediante anticuerpos (vía clásica), ausencia de inhibición de C3 (vía alternativa) o reconocimiento de manosas (vía de lectinas) convergen en la escisión de C3 (indicado en círculo azul) para formar la convertasa de C3 [63].

3.1.2.a. Estructura, activación y regulación

El factor C3 se encuentra codificado por el gen *C3*, localizado en la región cromosómica 19p13.3. Está constituido por 42.708 pares de bases distribuidas en 41 exones, que se traducen en una proteína de 1663 aminoácidos en su estructura primaria [72]. Esta estructura primaria incluye el péptido señal, constituido por 22 aminoácidos y las cadenas β y α que conforman propiamente la molécula C3. Tras las modificaciones post-traduccionales, se elimina el péptido señal y quedan únicamente las cadenas β y α unidas por diversos puentes di-sulfuro intra e inter-catenarios. Además se añade un puente tioéster esencial para desencadenar la cascada de activación de C3 y para la interacción con otras moléculas [123]. C3 circula con esta estructura en el plasma como un zimógeno que requerirá su activación proteolítica.

- **Activación de C3 mediante la vía clásica (Fig. 9):**

El primer componente de esta vía, C1q, se activa por anticuerpos formados en la respuesta inmune adaptativa humoral que se encuentran unidos a sus antígenos específicos [124].

C1q es un hexámero con cabezas globulares, que forma un complejo con dos moléculas de C1r y otras dos de C1s. La unión de más de una cabeza de C1q al patógeno, produce un cambio conformacional en C1r, activándose y escindiendo a C1s para darle actividad catalítica [125].

C1s escinde a C4 en C4a y C4b. El fragmento C4b se une a la superficie del patógeno y une una molécula de C2, que se escinde en sus fragmentos C2a y C2b. El fragmento pequeño, C2a, se une a C4b anclado en la superficie del patógeno constituyendo la convertasa de C3 de la vía clásica C4bC2a [126]. Esta convertasa comenzará la cascada de amplificación dividiendo C3 en C3a y C3b [127].

La activación de C3 por la vía clásica se encuentra regulada por un factor llamado inhibidor de C1, que actúa impidiendo la unión de C1r y C1s a C1q. [128].

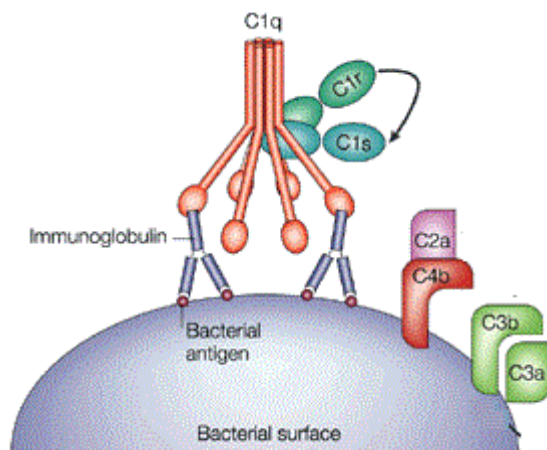


Figura 9. Vía de clásica de activación de C3. La figura muestra la formación de la convertasa de C3 a través de la cual se activa la escisión de la misma molécula.

- **Activación de C3 mediante la vía alternativa (Fig. 10):**

Fisiológicamente la hidrólisis de C3 se produce de forma espontánea a bajas velocidades (0.005%/min) para formar una molécula intermedia denominada C3-H₂O [122]. Esta molécula presenta una configuración que le permite la unión del factor B, que a

su vez recluta la proteasa factor D, que escinde al factor B en Ba y Bb. El fragmento Bb se une a C3- H₂O y conforman una convertasa de C3 en fase líquida que, aunque se genera en pequeñas cantidades, puede escindir C3 en C3a y C3b [129]. La mayoría de C3b generado se inactiva por hidrólisis, pero otra fracción puede unirse a determinados grupos de la superficie de patógenos o de células del hospedador, donde se vuelven a unir los factores B y D con la consiguiente escisión del factor B y la unión del fragmento Bb a C3b, formando la convertasa de C3 de la vía alternativa, C3bBb [130].

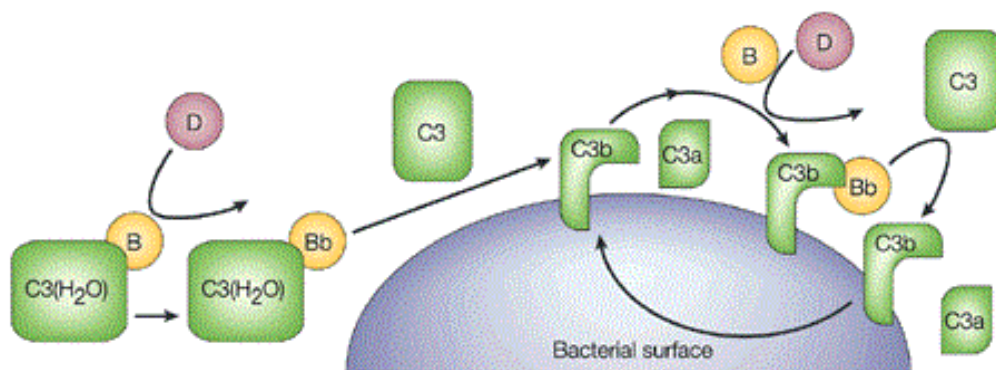


Figura 10. Vía alternativa de activación de C3. La figura muestra las interacciones de C3 que conducen a su activación en la superficie de bacterias como modelo representativo [127].

Debido a que es una activación espontánea, se encuentra estrechamente regulada para evitar su activación cuando no sea requerida. Las células sanas están protegidas en estas circunstancias gracias a la presencia de otros factores inhibidores:

- El factor acelerador de descomposición (DAF) compite con el factor B por su unión a C3b pudiendo desplazar a Bb de una convertasa ya generada [72, 131].
- El factor I escinde C3b hacia un precursor inactivo C3i, junto con la acción del cofactor de membrana de proteólisis (MCP o CD46) presente en la superficie de la célula sana [132, 133].
- El receptor de superficie celular para el sistema del complemento tipo I (CRI) tiene funciones similares a DAF y MCP, pero está restringida a determinados tejidos y células (linfocitos T y B, fagocitos, células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos de la piel) [133, 134].

- El factor H se une a C3b y puede desplazar a Bb, además de actuar como cofactor del factor I [140]. Se unirá preferentemente a las células del hospedador ya que tiene más afinidad por los ácidos siálicos expuestos en estas superficies celulares [134].

Cuando C3b se une a la superficie de patógenos o células del hospedador dañadas (isquemia, infecciones víricas, o cubiertas de anticuerpos), participa el factor P (properdina), que actúa estabilizando la convertasa de C3 [135], permitiendo que se desencadene la cascada posterior de activación del sistema del complemento.

- ***Activación de C3 mediante la vía de las lectinas (Fig. 11):***

Se inicia por la participación de la proteína lectina de unión a manosa (MBL), que en condiciones normales se encuentra en bajas concentraciones plasmáticas, pero en situación de inflamación aumenta su síntesis (reactante de fase aguda).

MBL se une específicamente a residuos de manosa y otros azúcares presentes en la superficie de patógenos (esta manosa queda recubierta por ácidos siálicos en las células hospedadoras) [63]. MBL se encuentra formando un complejo con dos zimógenos proteasas, dos moléculas MASP1 y otras dos MASP2 de forma similar a C1q, C1r y C1s de la vía clásica [136].

Cuando MBL se une a la superficie del patógeno, MASP2 se activa y es capaz de escindir al factor C4, en C4a y C4b. No está claro si MASP1 es capaz de iniciar la vía autónomamente, parece más bien encargada de potenciar la activación por MASP2 [137]. C4b se une de forma covalente a la superficie del patógeno, recluta a C2, y MASP2 la hidroliza en C2a y C2b. El fragmento C2a resultante, se unirá al C4b anclado en la superficie del patógeno, generando la convertasa de C3 de la vía clásica C4bC2a [138].

Tras la formación de la convertasa de C3, se inicia la escisión de C3 en sus fragmentos a y b en la superficie del patógeno y con esta, se desencadena la cascada de amplificación que lleva a la activación del sistema del complemento.

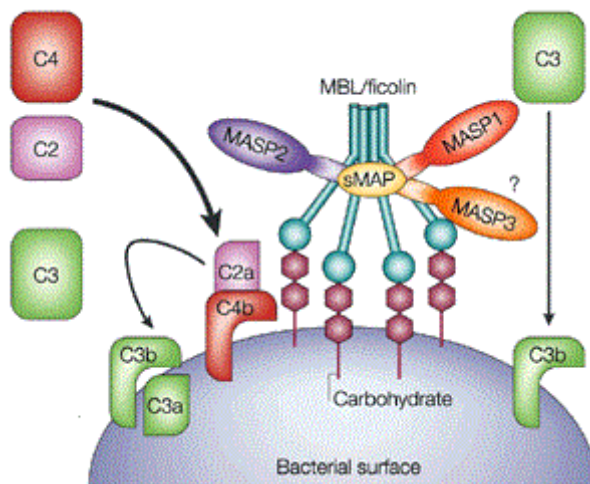


Figura 11. Vía de las Lectinas de activación de C3.

La figura muestra la formación de la convertasa de C3 a través de la cual se activa la escisión de C3.

Las ficolinas L, M y H pueden activar el sistema del complemento de la misma forma que MBL pero con mayor relevancia, ya que se encuentran en mayor concentración plasmática que MBL [127, 139].

El regulador inhibitor de C1 (C1INH) actúa sobre MASP2 activada, desplazándola de su interacción con MBL [131].

- **Fase final de activación del sistema del complemento:**

Tras la formación de la convertasa de C3, se depositan en la superficie circundante hasta 1000 moléculas de C3b amplificando todo el proceso [140]. La unión de C3b a las respectivas convertasas de C3, genera las respectivas convertasas de C5, que escinden a C5 en C5a y C5b.

Al fragmento C5b, se unen C6, C7 y C8, generando en ellas cambios conformacionales para exponer sus sitios hidrófobos que se insertan en la membrana. Por si mismos generan un daño moderado en la célula insertada, pero permiten la unión de hasta 16 unidades de C9 formando el complejo de ataque a membranas (CAM). El CAM genera un poro hidrofóbico en la membrana celular que permite el paso de agua y solutos, con la consiguiente alteración del gradiente de protones, osmolaridad celular, acceso de lisozimas al interior celular y la destrucción de la célula [141, 142].

La proteína CD59 (expresada en la superficie de células del sanas) evita la formación del CAM bloqueando físicamente la incorporación de las unidades de C9 [143].

Además de promover la destrucción de patógenos mediante la formación del CAM como estadio final de su activación, el sistema del complemento promueve la inflamación y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos [144]. Los factores C3a, C4a y C5a (anafilotoxinas) inducen la contracción del músculo liso y aumentan la permeabilidad vascular. Además C3a y C5a potencian la inflamación activando la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-12 e IL-23 en las células presentadoras de antígeno (CPA), estimulando la expresión de moléculas co-estimuladoras en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y estimulando la liberación de histamina y TNF- α sobre mastocitos [63]. Estas mismas moléculas mediante la unión a sus receptores en los linfocitos T, potencian la vía alternativa de activación del sistema del complemento, disminuyendo la expresión de su principal inhibidor, DAF [131].

3.1.4. Polimorfismos del factor C3 determinantes de la respuesta del sistema del complemento

En 1967 los grupos de Wieme y Alpert identificaron la existencia de variantes séricas “raras” de C3, que presentaban una movilidad electroforética rápida en gel de agarosa (C3F, Fast) frente al alelo más común de movilidad reducida C3S (Slow) [145, 146]. Posteriormente, se describió que la base molecular de esta variante alélica consistía en la sustitución polimórfica c.304G>C (*rs2230199*; GenBank Accession: NM_000064.2) [91, 92] presente en una frecuencia del 20% en la población caucásica.

Este cambio nucleotídico supone la sustitución del aminoácido Arginina por Glicina en la posición 102 (80 sin el péptido líder) de la cadena primaria de C3 [147]. Gracias a la obtención de la estructura cristalográfica de la molécula C3 en 2005 [123], se obtuvo la explicación a las diferencias en la migración. El cambio de aminoácido localizado físicamente en la superficie de C3, de Arginina (C3S) cargado positivamente, por Glicina (C3F) neutro, supone la pérdida de la carga positiva y una reducción en el tamaño del aminoácido. La variante C3F presenta un menor número de interacciones con otros

aminoácidos colindantes y un menor impedimento estérico, confiriéndole una movilidad electroforética más “rápida” en un gel de agarosa.

Respecto al efecto funcional de este polimorfismo, debido a que se encuentra lejos de los sitios de interacción con los receptores celulares del sistema del complemento, los efectos de variación en tamaño y carga, afectarían a nivel de interacción con otras proteínas confiriendo una funcionalidad diferencial a ambos alelos. El reciente estudio de Heurich ha arrojado luz sobre esta interacción diferencial, demostrando que los alelos C3F presentan menor afinidad por el factor inhibidor H y por tanto constituyen convertasas de C3 activadas por la vía alternativa con vida media más prolongada. Por este motivo, la presencia del alelo C3F supondría una mayor amplificación de la activación del sistema del complemento por esta vía, con el consiguiente potencial pro-inflamatorio y protector o lesivo (según circunstancias) de este mecanismo efector [148].

La asociación entre las variantes alélicas de C3 con diferentes patologías de origen inmunológico han sido demostradas en un considerable número de estudios. La presencia del alelo C3F se ha relacionado con la predisposición a vasculitis sistémica y con la aparición del factor nefrítico en pacientes con glomerulonefritis mesangiocapilar tipo II [149, 150]. En pacientes con artritis reumatoide el grupo de Brönnestam observó mayor frecuencia del alelo C3F sobre todo en pacientes seropositivos [151]. En aquellos que desarrollaban nefritis membranosa, el alelo significativamente aumentado fue C3S [152]. En otros estudios más recientes se ha confirmado la asociación del alelo C3F con el desarrollo de degeneración macular asociada a la edad [153] y con una mayor probabilidad al desarrollo de disfunción neurocognitiva tras el procedimiento de endarterectomía carotídea [154].

En el contexto del trasplante, la funcionalidad del polimorfismo de C3 aún no ha quedado establecida, debido a la existencia de resultados escasos y contradictorios. En un estudio de trasplante renal, se observó una mayor supervivencia de injerto y pacientes, en los receptores homocigotos para C3S, que recibieron un injerto con el alelo C3F (C3FS o C3FF) [155]. No obstante, estos resultados no fueron confirmados en posteriores estudios

sobre cohortes con mayor número de receptores de trasplante renal [156, 157], y por primera vez, en pacientes de trasplante hepático [158].

3.1.5. Papel de C3 en la inmunidad adaptativa

En la activación del complemento el fragmento C3b continúa su escisión generándose un fragmento menor C3d que permanece unido a la superficie bacteriana o al complejo antígeno-anticuerpo. Los linfocitos B presentan un receptor para C3d llamado CR2 (o CD21) de modo que la interacción C3d-CR2 ocurre al mismo tiempo que el antígeno al que está unido C3d es reconocido por la inmunoglobulina de superficie del linfocito B. Dicha interacción facilita que la activación del linfocito B sea más robusta.

Por otro lado, estudios recientes están demostrando que, además de la producción hepática, existe una importante producción periférica de C3, a cargo sobre todo de las células del sistema inmune [159]. Durante la presentación y reconocimiento antigénicos, tanto las CPA como las células T producen componentes del complemento que se activan localmente [159-161].

Mediante la unión a sus respectivos receptores C3aR y CD46, los fragmentos C3a y C3b derivados de la activación de C3, incrementan la supervivencia, activación y proliferación de los linfocitos T y promueven la producción de INF- γ favoreciendo así una respuesta inmune tipo Th1 [162]. Se ha observado que el complemento producido por las células del sistema inmune activa a los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ y conduce al rechazo cardíaco en modelos murinos y a una respuesta in vitro de los linfocitos T humanos frente a células dendríticas alogénicas [163, 164]. Sin embargo, se han observado efectos antagónicos sobre la respuesta mediada por células T reguladoras (Treg) ya que la activación de los receptores C5aR y C3aR en las células Treg de ratón reduce su capacidad supresora [165], y el bloqueo de estos receptores en linfocitos T CD4⁺ favorece la generación de células T reguladoras inducidas mediada por TGFbeta [166]. Adicionalmente pese a que la interacción entre C3b y CD46 estimula en etapas iniciales de su activación una respuesta efectora tipo Th1, finalmente acaba promoviendo el cambio en

la producción de INF- γ por IL-10 generando células T con propiedades reguladoras [167, 168].

3.2. Componentes celulares

Las células de la inmunidad innata llevan a cabo funciones esenciales para la defensa frente a agresiones externas, bien sea formando barreras físicas para impedir la entrada de patógenos, expresando en superficie RRP con la consiguiente síntesis de citoquinas y activación de la fagocitosis o bien a través de la citolisis directa de células infectadas, dañadas o transformadas mediada por las células NK.

- **Células epiteliales:** Las superficies epiteliales intactas de las mucosas gastrointestinal, respiratoria y genitourinaria junto con la piel, constituyen las barreras físicas que aíslan el medio externo del hospedador. Además de esta separación física las células epiteliales producen péptidos con propiedades antimicrobianas, catelicidinas y defensinas [62, 63, 169].

- **Células fagocíticas: neutrófilos y macrófagos:** Ambos tipos celulares son responsables de la internalización y destrucción de patógenos, y de la producción de citoquinas que estimulan la inflamación y la función antimicrobiana de las células en el sitio de infección. Los neutrófilos se encargan de la destrucción de bacterias piógenas y los macrófagos principalmente de la destrucción de las células del hospedador infectadas y además participan en el proceso de reparación de tejidos dañados [62, 63, 170].

- **Células dendríticas (DC):** Expresan en superficie la mayor densidad de TLRs y RRP citoplasmáticos y las células dendríticas plasmacitoides son la mayor fuente de interferones tipo I. Tras la activación de las DC localizadas en piel, mucosas y parénquima de diversos órganos, adquieren movilidad, migran a los ganglios linfáticos y presentan los patógenos a los linfocitos T desencadenando una respuesta inmune adaptativa [62, 63].

- **Mastocitos:** Se localizan en la piel y epitelios mucosos. Tras su activación por patógenos o mediada por anticuerpos liberan el contenido proinflamatorio de sus gránulos citoplasmáticos, histamina, enzimas proteolíticas, citoquinas o prostaglandinas [62, 63, 171].
- **Células natural killer (NK):** ya que constituyen una parte de importante relevancia en el presente trabajo, se describen a continuación de forma independiente.

3.2.1. Células natural killer (NK)

Las células NK son un subtipo de linfocitos efectores de la inmunidad innata que ejercen una función esencial en la respuesta antiviral y en respuesta a células “transformadas” (tumores, stress). Constituyen entre el 10-15% de los linfocitos circulantes y predominan en tejido hepático y en el útero grávido [172]. Al igual que los linfocitos T y B las células NK desarrollan procesos de expansión clonal cuando son activadas. Esta activación está mediada por múltiples receptores en la superficie celular, que a diferencia de los de las células T y B no se diversifican mediante procesos de reordenamiento, sino que se encuentran codificados en la línea germinal [173].

La células NK son capaces de diferenciar (y destruir) células infectadas por virus o células transformadas (tumores, dañadas o stress) respetando las células sanas del hospedador (teoría *missing-self*). Las células NK expresan en superficie un repertorio de receptores inhibidores y activadores. Los inhibidores impedirán su activación, mientras que los activadores serán los responsables de desencadenarla. Las moléculas MHC-I son los principales (pero no únicos) ligandos para ambos grupos de receptores. En condiciones normales, todas las células nucleadas expresan en superficie MHC-I, que serán reconocidas por los receptores activadores e inhibidores de las células NK [174]. Como las interacciones inhibitoras predominan sobre las activadoras, no se desencadena la citólisis (Fig. 12.a). Cuando las células diana están “transformadas” pierden la expresión de MHC-I, como consecuencia, los receptores inhibidores no reconocen su ligando, la célula NK no recibe señal inhibitora y se desencadena la destrucción celular (Fig. 12.b).

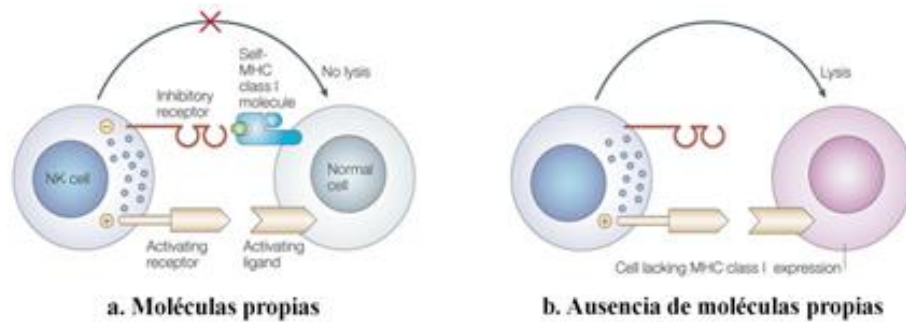


Figura 12. Modelo de reconocimiento de células extrañas por las células NK. a) Reconocimiento de los ligandos de los receptores activadores e inhibidores, primando el efecto inhibitorio de la citolisis. Las señales inhibitorias no se transmiten debido a la ausencia de expresión de MHC-I (b) (*Adaptado de Kumar V. et al. [174]*).

Además de ejercer citotoxicidad directa, tras su activación las células NK liberan citoquinas ($\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$) que actuarán sobre las CPAs y linfocitos T y B modulando y orientando la posterior respuesta inmune adaptativa, actuando de nexo de unión entre ésta y la inmunidad innata [175, 176].

3.2.1.a. Receptores Killer Immunoglobulin-like receptors (KIR)

En la superficie de las células NK se expresan 4 familias de receptores activadores e inhibidores: killer immunoglobuline-like receptors (KIR), killer cell lectin-like receptors (KLR), leukocyte immunoglobuline-like receptors (LILR) y natural cytotoxicity receptors (NCR) [176-178]. Debido a las múltiples señales que reciben las células NK a través de sus receptores, su función final dependerá de los ligandos presentes en la célula diana y del balance neto entre señales activadoras e inhibitorias.

Los receptores KIR se identificaron en 1986 por Harel-Bellan [179] y se describieron inicialmente como receptores únicamente inhibidores. Han sido los más estudiados de los receptores de las células NK, probablemente debido a que no están presentes en todas las especies cercanas al hombre [173] y a que son los receptores que presentan la mayor variabilidad y diversidad genética de las células NK.

3.2.1.a.1. Estructura de los receptores KIR

Los genes que codifican para los receptores KIR se encuentran agrupados en una región denominada leukocyte receptor complex (LRC) en la región cromosómica 19q13.4 ocupando aproximadamente 150 Kb [180]. Se encuentran dispuestos en forma de tándem, en la misma orientación y espaciados por 2 Kb entre ellos (excepto el gen *KIR2DS4* separado por 14 Kb) [181]. Se han identificado hasta 15 loci codificantes para receptores KIR activadores (aKIR: *KIR3DS1*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS2*, *KIR2DS4* y *KIR2DS5*), KIR inhibidores (iKIR: *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3* y *KIR2DL5*), receptores KIR con ambas funciones como *KIR2DL4* y dos pseudogenes (*KIR3DP1*, *KIR2DP1*) no traducidos [182].

La nomenclatura asignada a genes y receptores hace referencia a la estructura de las proteínas para las que codifican [183]. Estructuralmente los receptores KIR pueden presentar 2 o 3 dominios extracelulares (denominados D₀, D₁ y D₂), de tipo inmunoglobulina (2D o 3D), responsables de la interacción con sus ligandos. En el espacio intracelular, el dominio determinante de la función del receptor, será largo (L) de tipo inhibidor o corto (S) con función activadora (Fig. 13).

Los receptores inhibidores presentan en su tallo citoplasmático uno o dos motivos inhibidores de tirosina (ITIM; [I/VxYxxL/V]; I: Isoleucina; V: Valina; Y: Tirosina; x: aminoácido; L: Leucina) que bloquearán las vías de señalización de los receptores activadores. Los receptores activadores presentan el motivo activador de tirosina (ITAM; Yxx[L/I/V]_{x-8}Yxx[L/I/V]; I: Isoleucina; V: Valina; Y: Tirosina; x: aminoácido; L: Leucina) que activa las vías de citotoxicidad celular y liberación de citoquinas [63, 173] (Fig. 13).

Esta función activadora se llevará a cabo mediante la participación de otras moléculas adaptadoras, como homo o heterodímeros de CD3 ξ y/o Fc ϵ RI- γ u homodímeros de DAP-12 o DAP-10 (proteínas de activación de DNA de 12 y 10 kDa respectivamente) a través de su interacción con un residuo de Lisina en los ITAM. *KIR2DL4* constituye una excepción a estas estructuras, ya que presenta un tallo citoplasmático largo con un residuo

mediante el que interacciona con FcεRI-γ. A través de esta interacción desencadena una función activadora como potente productor de citoquinas, más que citolítica, (por esto predomina en las células NK CD56^{bright}). Además posee un motivo ITIM inhibitor [184].

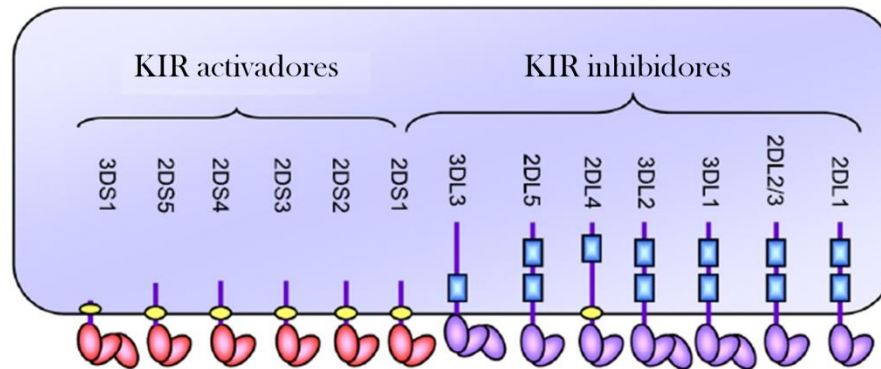


Figura 13. Estructura de los receptores KIR de las células NK. La figura muestra los dominios extracelulares tipo inmunoglobulina e intracelulares estructurales de los receptores KIR. Los rectángulos azules representan los motivos ITIM, y los círculos amarillos los ITAM. El único receptor KIR que presenta ambos tipos de motivos es 2DL4, el cual presenta una función dual [173].

3.2.1.a.2. Variabilidad en los receptores KIR

- **Variabilidad en el contenido genético: Haplotipos**

El primer nivel en la variabilidad genética de los KIR reside en el diferente número de genes y copias de los mismos que pueden expresarse en cada individuo. Esta variabilidad es consecuencia de la estructura del LRC y está relacionada con la elevada homología de los genes *KIR* en gran parte de sus secuencias nucleotídicas (80-90%) [181, 185]. Esta circunstancia convierte a esta región en una zona muy susceptible de presentar recombinaciones no homólogas durante la meiosis que genera fenómenos de duplicación, delección y conversión génica [181, 186].

El conjunto de genes codificados en la línea germinal, en cada individuo, en cada uno de los cromosomas homólogos conforma el haplotipo KIR. Hoy día se han identificado al menos 30 haplotipos diferentes [183]. Todos estos se han clasificado en dos grandes grupos, haplotipos A y B con una distribución similar en población caucásica [182, 183].

Los haplotipos A constan de 9 genes (*KIR3DL3-2DL3-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-2DS4-3DL2*) presentando un perfil claramente inhibidor, ya que de estos sólo *KIR2DS4* es potencialmente activador, pero en el 75% de los haplotipos A este gen presenta una pérdida de 22 pares de bases con cambio en el marco de lectura, que implica su conversión en el gen *KIR1D* afuncional, existiendo únicamente 2 haplotipos A diferentes. Los restantes haplotipos constituyen el grupo B, que mantienen una distribución similar de receptores inhibidores a los haplotipos A, sin embargo presentan gran variabilidad en la de los receptores activadores. Todas las posibles combinaciones de receptores aKIR e iKIR, son los responsables de la multitud de diferentes haplotipos B identificados [187].

Los individuos con haplotipos homocigotos AA, únicamente poseerán 6 receptores inhibidores y uno o dos aKIR, mientras los que presenten haplotipos homocigotos para B o heterocigotos AB, denominados Bx, dispondrán de entre 2 y 6 receptores iKIR (*KIR2DL2-2DL3-2DL5-2DL1-3DL1-3DL2*) y entre 2 y 6 aKIR (*KIR2DS2-2DS3-2DS5-3DS1-2DS1-2DS4/1D*) [188], por este motivo los haplotipos Bx presentan perfiles más activadores.

Existen 4 genes constituyentes del “esqueleto” de los haplotipos KIR, denominados *framework*, presentes en todos los haplotipos al principio y final de la región centromérica y telomérica: *KIR3DL3*, *3DP1*, *2DL4* y *3DL2*. Estos 4 genes constituyen el almacén estructural de los genes KIR en el LRC, contribuyendo a mantener su estricta organización. Mientras cada uno de los genes se localiza únicamente en la región centromérica o telomérica según corresponda, *KIR2DL5*, *2DS3* y *2DS5* son los únicos que pueden localizarse en ambas regiones [189].

La figura 14 muestra un esquema visual de los diferentes haplotipos KIR y de su organización.

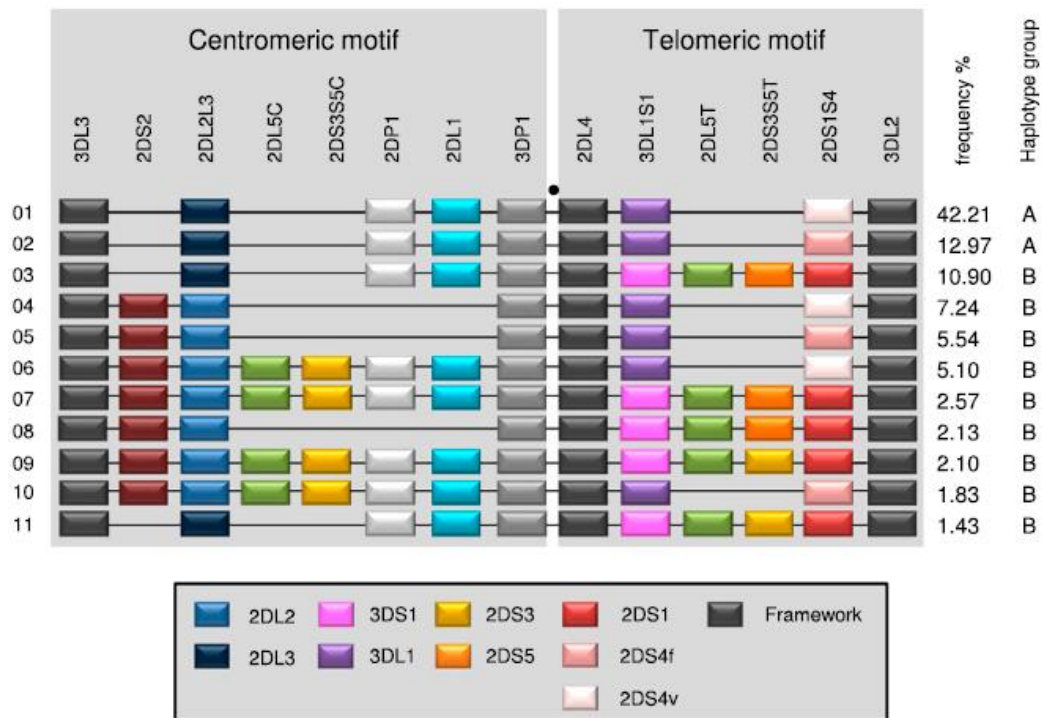


Figura 14. Contenido y estructura de los haplotipos KIR. En la figura se muestra la estructura de los únicos 2 haplotipos A existentes y de 9 haplotipos B. El código de colores es indicativo de los genes presentes en cada haplotipo. La nomenclatura de *KIR2SD4f* y *KIR2DS4v* referencia la presencia de la delección de 22 pb que lo transforma en KIR1D (2DS4v) no funcional [190].

- **Variabilidad alélica: Polimorfismos**

Esta familia de receptores presenta una extensa variabilidad polimórfica que da lugar a la aparición de múltiples variantes alélicas para cada gen [182, 191]. En la actualidad se han identificado hasta 614 variantes nucleotídicas de las secuencias codificantes que originan hasta 312 alelos diferentes. Estas variantes polimórficas pueden influir en la expresión de los receptores KIR, en su unión a sus respectivos ligandos y en su funcionalidad [191, 192]. La mayoría de estas variaciones nucleotídicas se dan en los genes inhibidores y afectan a dominios que no participan en la interacción con los ligandos HLA [189, 193, 194].

- ***Expresión en la superficie de las células NK***

La expresión de los receptores KIR en cada clon de células NK es aleatoria. El repertorio final de receptores dependerá inicialmente del contenido de genes heredado en la línea germinal. Partiendo de este contenido genético, la expresión de los mismos está influenciada principalmente por procesos epigenómicos estocásticos a nivel de los respectivos promotores y por la existencia de polimorfismos que determinan la eficiencia de su expresión [189, 191].

No obstante, existen restricciones a esta aleatoriedad para que las células NK sean operativas, siendo la más importante el requerimiento de la expresión de al menos un receptor inhibitor *i*KIR y de la interacción del mismo con su ligando HLA [195]. En base a la identificación de esta restricción, se describió que la expresión de los receptores KIR, estaba influenciada por la presencia de su respectivo ligando en un proceso conocido como educación de las células NK. Cuando un mismo individuo presenta un determinado receptor KIR y su correspondiente ligando, la expresión de este gen KIR se ve aumentada en esa población de células NK, desarrollando frente al mismo ligando, una potente función inhibitora o activadora según sea el receptor. En ausencia de este ligando, la funcionalidad de la célula NK disminuye, facilitando así que se desencadenen respuestas contrarias a las “educadas” [196]. No obstante los mecanismos que controlan toda esta expresión diferencial de receptores KIR no han sido descritos con exactitud.

Finalmente contribuyendo a la expresión diferencial, se ha descrito que parte de los receptores de las células NK se expresan de forma constitutiva y la activación de estos, desencadena las señales necesarias para estimular la expresión de otros receptores KIR. Por este motivo, el compartimento celular y las condiciones ambientales en las que se encuentre cada clon de células NK participarán en la selección de la expresión de estos genes [197].

3.2.1.a.3. Ligandos, activación de receptores y transducción de la señal

Los receptores KIR a través de sus dominios inmunoglobulina extracelulares reconocen específicamente como ligandos a las moléculas HLA de clase I preferencialmente HLA-C, seguidos de HLA-B y por último HLA-A [198]. Estas moléculas se encuentran codificadas por genes muy polimórficos del MHC localizados en el cromosoma 6.

Las moléculas HLA-C presentan un dimorfismo en el aminoácido 80 de la proteína, que las distribuye en HLA-C1, en los que el aminoácido es Asparagina (HLA-Cw*01/*03/*07/*08/*12/*13/*14/*1507/*1601/*1604) y en HLA-C2 cuando es Lisina (HLA-Cw*02/*04/*05/*06/*0707/*1204/*15/*1602/*17) [199, 200].

Para HLA-B también existe una agrupación similar en función del aminoácido en posición 80. Si este es Isoleucina o Treonina se clasifican como Bw4, mientras que si presentan Asparagina se identifican como Bw6 [199, 200].

Cada uno de estos grupos son ligandos preferenciales de los diferentes receptores KIR [173]. La Tabla 10 resume los ligandos de los receptores KIR que han sido caracterizados, junto con aquellos receptores cuyo ligando no es conocido hasta la fecha.

Tabla 10. Interacciones KIR-ligandos

Receptor iKIR	Ligando	Receptor aKIR	Ligando
2DL1	HLA-C2	2DL4	HLA-G
2DL2 ^a	HLA-C1, C2, B*46, B*73	2DS1	HLA-C2
2DL3 ^a	HLA-C1, C2, B*46, B*73	2DS2	¿HLA-C1?
3DL1	Bw4	2DS3	¿?
3DL2	A*3, A*11	2DS4	HLA-C1, HLA-C2, A*11
3DL3	¿?	2DS5	¿?
2DL5	¿?	3DS1	Bw4

^a Los ligandos de 2DL3 y 2DL2 tienen mayor afinidad por HLA-C2; ¿?: ligando desconocido.

Tras la unión del ligando, los residuos tirosina de los ITIM son fosforilados por la familia de kinasas Src, creando los sitios de unión para las fosfatasa SHIP (fosfatasa de

inositol portadora de SH2), SHP1 y SHP2 (proteína con dominio tirosina fosfatasa). El reclutamiento de estas fosfatasa inhibe la activación de las células NK, desfosforilando en última instancia, entre otras fosfoproteínas a Vav1, responsable de la polimerización de actina necesaria en la reordenación del citoesqueleto de las células NK para la degranulación citotóxica y de la traslocación al núcleo de los factores de transcripción NFAT y NF- κ B para la expresión de citoquinas y quimioquinas [184]. Para mediar la función inhibidora es necesario que se produzca la fosforilación en ambos motivos ITIM, excepto para KIR3DL3 que sólo posee un ITIM.

En el caso de los receptores activadores, el tallo corto no permite la presencia de los motivos ITIM, de esta forma se elimina la función inhibidora. Tras la unión del ligando al receptor aKIR, se reclutan y activan las quinasas Syk y ZAP70 a través de los adaptadores (DAP-12, DAP-10, etc). Desde este punto los eventos moleculares no se han esclarecido, pero se piensa que son similares a los que ocurre con el receptor CD16 (Fc γ R) [201]. Tras la activación de Syk y ZAP70, se desencadena una cascada de fosforilaciones sobre Vav, PI3-kinasa o Fosfolipasa C entre otras, que conducen al aumento de calcio intracelular y la degranulación citotóxica, y a la traslocación al núcleo de factores transcripción NFAT o NF- κ B con la producción de citoquinas y quimioquinas correspondiente [202].

La afinidad de los receptores iKIR por sus ligandos es muy superior a la de los receptores activadores. Debido a esta afinidad diferencial, y a que la presencia de receptores inhibidores, como se describe en este apartado, implica un bloqueo de las señales activadoras, la presencia de un número mayor de receptores inhibidores, requerirá la existencia de más receptores aKIR para sobrepasar este umbral de inhibición [203, 204].

3.2.1.a.4. Efecto del perfil activador/inhibidor sobre la respuesta inmune

Los virus disminuyen la expresión de moléculas HLA en las células infectadas para evadir la respuesta celular de CTLs, lo cual las convierte en el blanco perfecto para las células NK. Una de las relaciones identificadas más potentes entre KIR-HLA e infecciones, es el efecto protector de la presencia simultánea del receptor aKIR3DS1 y su

ligando Bw4 con una progresión ralentizada de SIDA debido a una activación de la respuesta citolítica de la célula NK mediada por este receptor activador [205, 206]. Además esta interacción se correlaciona con menor carga viral y protección frente a otras infecciones oportunistas como CMV [207]. También la interacción entre el receptor inhibidor KIR3DL1 y su ligando Bw4 ha sido relacionada con una menor carga viral de VIH [208]. La activación de los receptores inhibidores en las células NK impediría la citolisis por parte de las células NK, sin embargo, este efecto aparentemente contradictorio de la pareja iKIR3DL1-Bw4 podría responder al proceso de educación de las células NK. Este proceso “madurativo” implica que se desencadenaría un efecto lítico más potente de las células NK cuando la misma exprese el receptor inhibidor KIR3DL1 (siempre que no se encuentre unido al mismo su ligando), en comparación con aquellas células que no sean portadoras de este receptor KIR3DL1 [208].

Otra importante asociación relaciona un efecto protector de la interacción iKIR2DL3-HLA-C1 en homocigosis frente a VHC, aunque únicamente cuando el inóculo infeccioso es bajo [209, 210], debido a la baja afinidad entre ligando y receptor en esta pareja, motivo por el cual la inhibición de la célula NK es menor.

Respecto a la relevancia de las células NK en tumores, estudios experimentales han demostrado que la estimulación de las células NK supone un mayor aclaramiento de células tumorales y un mayor tiempo de remisión. Los receptores KIR parecen tener relevancia esencial en estos procesos cuando están originados por virus. aKIR3DS1 en ausencia de su ligando Bw4, se ha asociado con mayor progresión a cáncer cervical asociado al virus del papiloma VHP [211]. Igualmente, la pareja iKIR2DL2/2DL3-HLA-C1 se ha asociado con mayor progresión de melanoma maligno debido a un incremento en la inhibición de las células NK [212].

Otros estudios han relacionado diversos receptores aKIR con la patogénesis de enfermedades autoinmunes, con respuestas activadoras predominantes. La psoriasis se ha relacionado con la presencia de aKIR2DS1 o aKIR2DS2 con o sin ligandos HLA-C2 y C1 respectivamente [213], al igual que el desarrollo de diabetes mellitus en presencia de aKIR2DS2-HLA-C1 (aunque esta interacción no está claramente definida) [214]. En

cuanto a la frecuencia de KIR, iKIR2DL2 se identificó en mayor proporción en pacientes con escleroderma [215], uveítis y espondiloartropatía y un repertorio genético de receptores predominantemente aKIR, en la enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada [216-218].

3.2.2. Significado de las interacciones KIR-HLA en el trasplante

La capacidad de los KIR para mediar alorreactividad tiene un impacto fundamental en el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Es en este contexto donde por primera vez se estudió el significado de los KIR en el receptor y/o el donante, y de las posibles interacciones KIR/HLA bidireccionales, en aspectos importantes del resultado de estos trasplantes, como el rechazo, la recurrencia de la enfermedad de base (leucemia o linfoma sobre todo), enfermedad injerto contra huésped o incidencia de infecciones frecuentes como la causada por CMV [219, 220]. Menos se conoce acerca del significado de la alorreactividad NK en el trasplante de órganos sólidos.

Los regímenes de inmunosupresión actuales no están dirigidos hacia las células NK, y se sabe que estas células infiltran los injertos poco tiempo después del trasplante. Su papel por tanto es con toda probabilidad relevante para el resultado del trasplante, aunque se han observado efectos duales de estas células, tanto en sentido de promoción de la tolerancia como del rechazo.

Las células NK del receptor pueden reconocer y responder frente al aloinjerto por tres posibles mecanismos: (1) el reconocimiento por ausencia de ligandos inhibitorios HLA de clase I en el aloinjerto para los iKIR propios (missing-self recognition), (2) el reconocimiento de moléculas inducidas por el estrés en el aloinjerto ligandos de receptores activadores (induced-self killing), y (3) citotoxicidad mediada por anticuerpos anti-HLA específicos del donante que son reconocidos por receptores CD16 (Fc- γ R III) en las células NK (antibody-dependent cell cytotoxicity, ADCC) [221]. Las células NK alorreactivas pueden sintetizar y liberar IFN- γ y TNF- α . La primera de estas citoquinas aumenta la expresión de moléculas HLA y MICA facilitando una respuesta mixta,

adaptativa (mediada por células T CD4+ y CD8+) e innata (mediada por los receptores activadores NKG2D de las células NK) frente al aloinjerto. Por otro lado, la expresión de HLA-G parece beneficiar a los trasplantes renales, hepáticos y cardíacos, probablemente por su interacción con el receptor KIR2DL4 entre otros mecanismos. Las células NK del receptor pueden eliminar las células dendríticas del donante como resultado de la falta de reconocimiento (missing-self) o de la reacción ADCC, inhibiendo el reconocimiento alogénico directo y promoviendo así la tolerancia del injerto. Además, el órgano injertado puede llevar cierta dosis de células NK del donante, como ocurre en el trasplante hepático, en cuyo caso la alorreactividad en dirección donante-receptor podría causar EICH.

En teoría, el resultado del trasplante de un órgano sólido puede depender de la variabilidad de los genes KIR codificados en el receptor y de los ligandos HLA de clase I del receptor o de los que exprese el injerto, que dependerán del genoma del donante. Algunos estudios han demostrado una correlación entre la presencia de interacciones específicas entre KIR y sus ligandos y la supervivencia de injertos renales o hepáticos. En una cohorte de 224 pares donante-receptor de trasplante renal en el Hospital Charité de Berlín, se demostró, en un análisis multivariable, que la compatibilidad en la interacción KIR2DL2/DS2-HLA-C1 entre donante y receptor, y la incompatibilidad en la interacción KIR2DL3-HLA-C1 favorecían la estabilidad del injerto y estaban menos representados en trasplantes con rechazo agudo [222]. El grupo de Briggs y colaboradores, en Birmingham, describió en trasplante hepático que la presencia de al menos un alelo inhibidor HLA-C2 en el aloinjerto se asociaba significativamente a una menor tasa de rechazo crónico y fibrosis, menor pérdida del injerto y una supervivencia mayor del receptor a 10 años del trasplante [223]. Sin embargo, otros estudios no han demostrado ningún papel de la compatibilidad en los ligandos de KIR, HLA-C y HLA-Bw4, entre donante y receptor en la evolución de trasplantados renales [224], o de la compatibilidad en HLA-C1 y HLA-C2 entre donante y receptor en la evolución de trasplantados hepáticos [225]. El grupo de Doxiadis en Leiden sugirió que los estudios previos en trasplante renal se habían llevado a cabo en trasplantes incompatibles para HLA-A, -B y -DR, en los que la alorreactividad habría estado dominada por respuestas de células T obscureciendo el posible papel de los

efectos mediados por las células NK. En confirmación de esta hipótesis, este grupo observó en 137 trasplantes renales con identidad HLA donante-receptor completa, que la incompatibilidad en ligandos para KIR (HLA-C1, -C2, Bw4, -A3, -A11) reducía en un 25% la supervivencia del injerto a 10 años, y en el estudio multivariable se observó que esta incompatibilidad era un factor de riesgo independiente para la supervivencia del injerto [226]. Sin embargo, el análisis de la cohorte europea del Collaborative Transplant Study de Opelz, con 608 parejas compatibles para HLA-A, -B y -DR, no pudo confirmar estos resultados [227]. Este mismo estudio tampoco encontró ningún impacto del número de receptores KIR inhibidores o activadores en el receptor del injerto, de la presencia del receptor activador 2DS5, previamente detectado como protector frente al rechazo [228], o de los haplotipos KIR A o B sobre la supervivencia del injerto a 10 años.

Los estudios recientes en trasplante hepático son más escasos y de resultados controvertidos. En uno de ellos se encontró en una cohorte de pacientes trasplantados por infección VHC, que la disparidad KIR-ligandos HLA-C entre donante y receptor se asociaba con la recurrencia de hepatitis y que la presencia de KIR2DL3 en el receptor favorecía la progresión a fibrosis hepática [229]. En otro estudio no se encontró ninguna asociación entre el genotipo HLA-C del donante y rechazo agudo o la supervivencia de receptor o de injerto, ni de los distintos modelos descriptivos de alorreactividad NK (missing-self, missing-ligand, haplotipos KIR activadores e inhibidores) y el resultado del trasplante [230]. Por último en un estudio español del grupo de Murcia, se demostró que las incompatibilidades en genes KIR entre donante y receptor, sobre todo en genes activadores, así como la presencia de KIR2DL3 y KIR2DS1 en receptores junto a ligandos HLA-C2 en donantes, aumentaban la incidencia de rechazo agudo precoz. Los receptores KIR2DL3 con donantes HLA-C1 mostraban mayor supervivencia del injerto, mientras que los receptores KIR2DS1 y KIR2DS4 con donantes sin ese haplotipo C, es decir, con ligandos C2/C2, mostraban peor supervivencia del injerto [231].

Debe mencionarse además que en el ámbito del trasplante hepático los análisis han sido más complejos. Debido a que con el injerto viaja una importante cantidad de células NK, además de la posibilidad de respuesta alogénica clásica en dirección “receptor frente a

donante”, existe la posibilidad de una respuesta “donante frente a receptor” por la cual las células NK del donante podrían tener un efecto en la evolución del injerto de manera indirecta, al modular la respuesta inmune del receptor frente al mismo.

Por otro lado son los propios genes del receptor que codifican para los receptores KIR y sus ligandos HLA los que determinan de partida la competencia funcional de las células NK que encontrará el aloinjerto, ya que, de acuerdo a la hipótesis de la “educación” de las células NK, la interacción de éstas con moléculas MHC propias determina su capacidad para responder ante estímulos subsiguientes. En este sentido, se ha observado, por ejemplo, que las células NK positivas para KIR3DL1 sintetizan significativamente más IFN- γ en respuesta a células tumorales negativas para MHC cuando dichas NK proceden de donantes homocigotos para Bw4 que cuando proceden de células homocigotas para Bw6 [232]. Los modelos vigentes apoyan una expresión estocástica de los receptores individuales KIR durante la maduración de la célula NK, hasta que uno de ellos reconoce un MHC propio, transduce una señal negativa y restringe la expresión de receptores inhibidores adicionales. La expresión de un receptor inhibidor reconocedor de lo propio, durante el desarrollo de la célula NK, promueve así la maduración de células funcionalmente respondedoras mediante este proceso de educación. En un principio se pensó que todas las células NK maduras contaban con al menos uno de estos receptores inhibidores para asegurar la tolerancia a lo propio. Sin embargo estudios más recientes han identificado un grupo de células NK maduras sin este tipo de receptor inhibidor. Estas células poseen receptores inhibidores que no reconocen MHC-I endógenos, es decir, no tienen ligandos y poseen receptores activadores hiporespondedores para la producción de citoquinas o para mediar citotoxicidad. La interacción de esos receptores inhibidores con MHC-I propio resulta por tanto imprescindible para la competencia funcional de las células NK y para la tolerancia. Se han propuesto cuatro posibles mecanismos que explicarían la “educación” NK durante el desarrollo [233]. El modelo de “licenciamiento” propone que la interacción de MHC propio con el receptor inhibidor promueve de forma directa la competencia funcional mediante señalización mediada por ITIM [234]. El modelo de “desarme” propone que las células NK sin esos receptores inhibidores para MHC propio

son anérgicas (o están “desarmadas”) a causa de la activación crónica, mientras que “armar” a las células NK supondría la interacción mencionada para evitar la activación crónica [235]. El tercer modelo, del “reóstato”, sostiene que más interacciones de receptores inhibidores y moléculas MHC propias conducirían a respuestas más potentes de las células NK [236]. Finalmente, Chalifour y colaboradores proponen el modelo de “interacción cis” entre KIR y MHC-I en la superficie de la misma célula NK, que secuestraría a los receptores inhibidores de su participación en la sinapsis inmunitaria haciendo a la célula NK más respondedora en su funcionalidad [237].

II. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

En pacientes sometidos a trasplante hepático la inmunosupresión administrada se dirige principalmente a controlar o limitar la activación de la inmunidad adquirida frente al injerto trasplantado. En estas circunstancias, la inmunidad innata puede adquirir un protagonismo importante en la defensa frente a agresiones externas, como son el daño por isquemia-reperfusión, el reconocimiento del injerto como un tejido no propio o la invasión de agentes patógenos.

La capacidad funcional de la inmunidad innata estará determinada por factores tanto externos como propios del receptor de trasplante. Para el control de los factores externos, como el tipo de órgano y su calidad, o el tipo de trasplante se cuenta con protocolos establecidos que persiguen una buena evolución del injerto y del paciente trasplantado. En relación a los factores intrínsecos del paciente, los perfiles genéticos de los mecanismos efectores de la inmunidad innata del receptor de trasplante, pueden determinar la potencia de la respuesta inmune desencadenada. De esta forma contribuirán a generar respuestas diferenciales de la misma, influyendo en el desarrollo de posteriores complicaciones y en la evolución global del trasplante hepático.

Los receptores tipo Toll TLR4, el factor C3 del complemento y los receptores KIR de las células NK, son componentes de la inmunidad innata con potencial importancia en la evolución del trasplante hepático. La presencia de variantes activadoras podría favorecer el desarrollo de eventos lesivos contra el injerto pese a que ejercerían un control más efectivo sobre las complicaciones de tipo infeccioso. Igualmente, variantes potencialmente inhibitoras de la inmunidad innata, desencadenarían respuestas inmunológicas contra el injerto más limitadas o de menor intensidad, a costa de una menor eficiencia frente a las infecciones. De confirmarse estas asociaciones, el conocimiento de estos perfiles genéticos previo al trasplante, permitiría clasificar a los pacientes en función del riesgo o predisposición a las complicaciones post-trasplante y adecuar el tratamiento terapéutico estableciendo una atención personalizada para cada uno de ellos.

Objetivos

En este trabajo nos propusimos analizar el papel de los polimorfismos genéticos de tres componentes de la inmunidad innata, TLR4, C3 y KIR/HLA de los receptores de injerto hepático, en la evolución del trasplante durante el primer año, en una serie de pacientes consecutivos trasplantados en el Hospital 12 de Octubre entre Enero de 1997 y Diciembre de 2011.

Específicamente los objetivos fueron:

1. Puesta a punto de la determinación del polimorfismo c.304C>G del factor C3 del complemento por Real-Time-PCR-High-Resolution-Melting (RT-PCR-HRM).

2. Analizar si existe alguna relación entre los polimorfismos de TLR4 c.896A>G (TLR4-299) y c.1196C>T (TLR4-399) del receptor hepático y la supervivencia del paciente, la supervivencia del injerto, los eventos de rechazo y la aparición de infecciones.

3. Analizar si existe alguna relación entre el polimorfismo c.304C>G del factor C3 del complemento del receptor hepático y la supervivencia del paciente, la supervivencia del injerto, los eventos de rechazo y las infecciones.

4. Analizar el papel de los polimorfismos de TLR4 y C3 del complemento en la cohorte de pacientes trasplantados por infección por VHC, y en particular, sobre su recidiva en el primer año, supervivencia del paciente y del injerto y tasa de rechazo.

5. Analizar si existe alguna relación entre los haplotipos KIR y sus ligandos HLA-Bw4 y HLA-C del receptor hepático en la supervivencia del paciente y del injerto, en los eventos de rechazo y en las infecciones.

6. Analizar si existe alguna relación entre el número de receptores KIR (y su carácter activador o inhibidor) y el número de las correspondientes interacciones con sus ligandos HLA sobre la supervivencia, el rechazo y las infecciones.

III. Materiales y Métodos

El rechazo agudo se documentó mediante histología de una biopsia hepática y se clasificó en función de la gravedad según las directrices del grupo de Banff [238, 239]. En el rechazo agudo tipo I (leve) los pacientes permanecieron asintomáticos. Histológicamente se observó infiltrado inflamatorio leve confinado a los espacios portales, particularmente en la vena porta, arteria hepática y conducto biliar intralobulillares (triada hepática). En el tipo II (moderado) los pacientes presentaron síntomas de disfunción del injerto (transaminasas y bilirrubina elevadas, abdomen blando, fiebre o leucocitosis). Histológicamente el infiltrado inflamatorio apareció en la mayor parte de las triadas hepáticas pudiendo expandirse al parénquima hepático periportal. El daño en el ducto biliar fue variable. En el grado tipo III (severo) la sintomatología se agravó. Histopatológicamente apareció inflamación portal en la mayoría de las triadas hepáticas y frecuentemente en el parénquima hepático periportal. Se observó disrupción de la membrana basal del conducto biliar y destrucción ductal.

El rechazo crónico se presentó como arteriopatía obliterante con daños severos y pérdida de pequeños conductos biliares, frecuentemente acompañado de colestasis, atrofia centrolobulillar de hepatocitos y esclerosis perivenular. La sintomatología se caracterizó por colestasis progresiva con importante aumento de enzimas hepáticas (γ -GT y fosfatasa alcalina) y bilirrubina, fiebre y leucocitosis.

Se recogieron datos sobre el desarrollo de recidiva VHC post-trasplante en los pacientes cuya causa del trasplante fue cirrosis hepática por infección VHC. La existencia de recidiva por VHC se definió por la elevación de la enzima ALT, la detección de RNA viral en muestras de sangre periférica y una biopsia compatible con hallazgos histopatológicos en fases iniciales de inflamación lobulillar (desorganización del lobulillo, hipertrofia de células de Kupffer e infiltración leucocitaria) y en fases más tardías de inflamación predominantemente portal y de los conductos biliares.

2.2. Infecciones

Se evaluó la aparición de infecciones, la fecha, número y etiología de las mismas. Se incluyeron las infecciones consideradas como las más frecuentes en pacientes sometidos a trasplante hepático en el Hospital 12 de Octubre [240].

Los eventos de etiología bacteriana consistieron en bacteriemia por gram positivas y/o negativas (hemocultivo positivo excepto un único cultivo aislado de *Bacillus* o *Staphylococcus* considerado como contaminante), neumonía (tos con esputo purulento, dolor torácico y alteraciones pulmonares radiográficas), infección respiratoria del tracto inferior (cuando la infección respiratoria de vías bajas no cumplía los requisitos de neumonía), infección intraabdominal, colitis y/o gastroenteritis, infección de la herida quirúrgica (en los 30 días tras el trasplante), infecciones del tracto urinario, cistitis (bacteriuria de más de 10^5 UFC/mL y manifestaciones de disuria y urgencia urinaria) y pielonefritis (bacteriuria de más de 10^5 UFC/mL y/o bacteriemia y fiebre acompañadas de dolor lumbar y escalofríos).

Respecto a las infecciones víricas se incluyeron síndrome viral por CMV (T^a mayor de 38°C con antigenemia positiva y bien leucocitosis de más de 4000 células/ mm^3 o concentración atípica de 3% de linfocitos o menos de 100.000 plaquetas/ mm^3), infecciones por CMV tisulares (hepatitis, esofagitis, y enteritis con evidencia histopatológica de CMV) y otras infecciones por Herpes simplex y Varicela-Zoster. Paralelamente para el estudio del sistema KIR-HLA se incluyó además la presencia viremia silente por CMV considerada como antigenemia positiva para CMV de carácter asintomático.

Por último las infecciones fúngicas incluidas fueron aspergilosis pulmonar invasiva y zigomicosis cutánea por *Rhizopus microsporus*.

3. REAL TIME-PCR HybProbe (LIGHT CYCLER®2.0 CAPILAR)

La tecnología Real Time-PCR en el equipo Light Cycler®2.0 se empleó para la determinación de los polimorfismos de TLR4 c.896A>G (TLR4-299) y c.1196C>T (TLR4-399) en 258 del total de 503 pacientes genotipados.

En el momento de inclusión del paciente en la lista de espera de trasplante hepático se obtuvieron 20 mL de sangre anticoagulada con EDTA procedente de venopunción. Se lisaron los glóbulos rojos con solución SLR 1X. Se dispensaron sangre y SLR 1X a partes iguales en un tubo y se centrifugó 10 minutos a 2000 rpm. Se resuspendió el pellet y se lavó dos veces con SLR 1X centrifugando a 2000 rpm 10 minutos. Se traspasó la suspensión celular a un tubo Eppendorff y se procedió a la extracción de ADN añadiendo 1ml de la solución DNAzol (Molecular Research Center, Inc., Kansas City, MO, USA). Se agitó enérgicamente y tras reposar 5 minutos se añadió etanol absoluto y se mezcló hasta obtener un pellet blanquecino que se transfirió un tubo Eppendorff . Se lavó el pellet 2 veces con etanol al 75% por aspiración con bomba de vacío y se resuspendió con etanol al 95%. Se dejó secar 10 minutos en baño seco a 37°C, se resuspendió en agua destilada y finalmente se incubó 1 hora en un baño seco a 37°C para la homogeneización del ADN.

El ADN se almacenó a -20°C hasta su utilización. La concentración de ADN se evaluó mediante la medida de la absorbancia a 260nm con el equipo NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). La calidad se consideró adecuada cuando la relación de absorbancias 260/280nm fue de 1.7-1.9.

La preparación de la PCR de las muestras para su análisis por el equipo Light Cycler®2.0 Capilar se realizó empleando el kit LightCycler®FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche, Mannheim, Alemania) [241].

Los primers y sondas se diseñaron por la empresa distribuidora del equipo (Roche) tras indicarles la posición genómica y sustitución nucleotídica de los polimorfismos de interés. Se recibieron liofilizados, se resuspendieron a 200ng/μL y se alícuotaron a 20ng/μL. Las soluciones madre y alícuotas se almacenaron a -20°C (las sondas en oscuridad).

Las secuencias de las sondas y primers utilizadas para esta determinación se describen a continuación:

Sonda TLR4-299 Dadora: 5'-AATTGTTTGACAAATGTTTCTTCATTTTCC-3'

Sonda TLR4-299 Aceptora: 5'-CTACTACCTCGATGATATTATTGACTTATT-3'

Sonda TLR4-399 Dadora: 5-ATTTTGGGACAACCAGCCTAAAGTAT-3'

Sonda TLR4-399 Aceptora: 5-CTTGAGTTTCAAAGGTTGCTGTTCTCAAAGT-3'

Primer Directo (TLR4-299/-399): 5'-ATTTAAAGAAATTAGGCTTCATAAGCT-3'

Primer Reverso (TLR4-299/-399): 5'-CCAAGAAGTTTGAAGTCATGGTAA-3'

La amplificación mediante PCR se realizó según las instrucciones del fabricante. Se preparó la mezcla de PCR constituida por el reactivo Master Mix (incorpora la enzima Taq Polimerasa), primers (20ng/μL) y las sondas. Se descongelaron los componentes a temperatura ambiente, manteniendo las sondas en oscuridad y se mezclaron los reactivos en un tubo Eppendorff de 1,5mL. Se repartieron 15μL de mezcla en cada capilar del instrumento. Se añadió el ADN (50-100ng/μL) o agua en el control negativo, se colocó el carrusel con los capilares en el equipo y se inició el programa de amplificación. Las condiciones de amplificación optimizadas para la detección de ambos polimorfismos de TLR4 se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de Real Time-PCR HybProbe (LightCycler®2.0 Capilar) para la identificación de los polimorfismos TLR4-299 y TLR4-399

Programa	Ratio ascenso °C/s	Adquisición	Análisis
Desnaturalización: 1 ciclo			
- 95°C 10 minutos	20	NONE	NONE
Amplificación: 60 ciclos.			
- 95°C 10 segundos	20	NONE	NONE
- 54°C 10 segundos	20	SINGLE	
- 72°C 25 segundos	20	NONE	
Curva de Fusión: 1 ciclo			
- 95°C 5 segundos	1	NONE	NONE
- 52°C 40 segundos	20	NONE	
- 80°C 1 segundos	0,05	CONTINUOUS	
- 95°C	0,02	CONTINUOUS	
Enfriamiento: 1ciclo			
- 37°C 20 segundos	20	NONE	NONE

El análisis de los polimorfismos se realizó mediante las curvas de fusión del propio programa de amplificación. El diseño de las sondas se realizó para que la presencia del

polimorfismo implicara complementariedad incompleta de las sondas y por tanto menor temperatura de fusión (T_m) de la doble cadena de ADN.

Los genotipos resultantes se asignaron en función de las temperaturas de fusión y el número de curvas observadas en las muestras. Los pacientes homocigotos wildtype presentaron una única curva a 60°C para TLR4-299 y 65°C para TLR4-399 y para heterocigotos se observaron dos curvas a 60°C y 56°C para TLR4-299 y otras dos a 65°C y 58°C para TLR4-399 (Fig. 15).

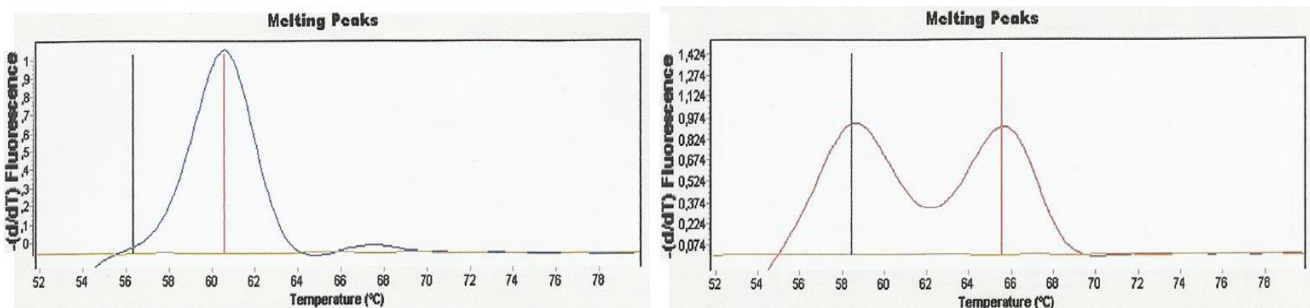


Figura 15. Esquema de curvas de fusión generadas por Light Cycler®2.0 Capilar. La curva de la izquierda corresponde al genotipo homocigoto wildtype para TLR4-299. A la derecha se representa el genotipo heterocigoto para TLR4-399.

4. REAL TIME-PCR-HIGH RESOLUTION MELTING (LIGHT CYCLER®480)

Mediante la metodología Real Time-PCR-High Resolution Melting (RT-PCR-HRM) se identificaron los genotipos de los polimorfismos c.896A>G (TLR4-299) y c.1196C>T (TLR4-399) de TLR4 y del polimorfismo c.304C>G del factor C3 del sistema del complemento. En el caso de TLR4 se optimizó esta metodología para la detección de los restantes 245 pacientes del total de los 503 incluidos en esta cohorte y en el caso de C3 se empleó para la totalidad de los 483 pacientes incluidos en el estudio.

La amplificación por PCR se llevó a cabo en el equipo LightCycler®480 siguiendo el protocolo del fabricante LightCycler®480 High Resolution Melting Master (Roche, Mannheim, Alemania) [242, 243].

Se diseñaron los primers para la detección de los polimorfismos de interés y se sintetizaron por Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA). Se recibió el producto

lío-filizado, se resuspendió a 200 nmoles/ μ L y se alicuotaron a 20 nmoles/ μ L. Todas las disoluciones se almacenaron a -20°C .

Para los polimorfismos de TLR4 se diseñaron primers para la amplificación de un fragmento de 167 pb que contenía el polimorfismo TLR4-299 y para otro fragmento de 160 pb que contenía el polimorfismo TLR4-399. La secuencia de estos primers se describe a continuación:

Primer Directo TLR4-299: 5'-CCTGTGCAATTTGACCATTG-3'

Primer Reverso TLR4-299: 5'-AATGTTGCCATCCGAAATTA-3'

Primer Directo TLR4-399: 5'-TGATCTACCAAGCCTTGAGTTTC-3'

Primer Reverso TLR4-399: 5'-TTGTTCTAAGCCCAAGAAGTTTG-3'

En el caso del polimorfismo del factor C3 del sistema del complemento se diseñó la siguiente pareja de primers para amplificar un fragmento de 93 pb que lo contenía:

Primer Directo: 5'- TGGAACAGACCCCTGACAAT -3'

Primer Reverso: 5'- CACCACCTTCTCCACCACTT -3'

Se preparó una mezcla de amplificación diferente para cada uno de los polimorfismos de interés formada por Master Mix 2X (contiene los dNTPs y el fluoróforo ResoLight® de unión saturante al ADN), los primers (20 ng/ μ L) y Cloruro de Magnesio 25 mM (optimizado en diferentes pruebas de reacción). Para esto se descongelaron los componentes a temperatura ambiente manteniendo el reactivo Master Mix 2X en oscuridad para evitar la descomposición del fluoróforo. Se preparó la mezcla en un tubo Eppendorff de 1,5 mL añadiendo en último lugar el reactivo fluorescente. Se dispensaron 15 μ L de la mezcla de PCR en cada pocillo de las placas de reacción suministradas por el fabricante y se añadieron los 5 μ L de ADN (3 ng/ μ L) o agua para el control negativo. Se selló la placa y se colocó en el equipo LightCycler®480 y se inició el programa de amplificación.

Tras la amplificación, el análisis de los resultados se realizó mediante la aplicación Gene Scanning del equipo LightCycler®480. El software generó las curvas de fusión en función de la fluorescencia detectada. Finalmente la misma aplicación GeneScanning asignó

los genotipos según las cinéticas de amplificación detectadas. Para esto se incorporó en cada tanda de análisis, las correspondientes muestras control cuyos genotipos fueron previamente identificados por diferentes metodologías de referencia.

Las condiciones de amplificación y generación de curvas de fusión optimizadas para la detección de todos los polimorfismos (TLR4 y C3) por RT-PCR-HRM fueron similares. Sólo presentaron diferencias en la temperatura de hibridación de los primers en las fases de amplificación y de curvas de fusión, siendo superior para el fragmento del factor C3 del sistema del complemento debido a la presencia de un mayor contenido en GC de esta región genómica (Tabla 12).

Tabla 12. Condiciones de Real Time-PCR High-Resolution Melting para la identificación de ambos polimorfismos de TLR4 y del factor C3 del sistema del complemento

Programa	Ratio Ascenso °C/s	Adquisición	Análisis
Preincubación: 1 ciclo			
- 95°C 10 minutos	4,40	NONE	NONE
Amplificación: 45 ciclos			
- 95°C 10 segundos	4,40	NONE	QUANTIFICATION
- 60°C/62°C* 10 segundos	2,20	NONE	
- 72°C 10 segundos	4,40	SINGLE	
Curva de Fusión: 1 ciclo			
- 95°C 1 minuto	4,40	NONE	MELTING CURVE
- 40°C/50°C* 1 minuto	2,20	NONE	
- 65°C/68°C* 1 segundo	4,40	NONE	
- 95°C	0,02	CONTINUOUS ¹	
Enfriamiento: 1 ciclo			
- 40°C 30 segundos	2,20	NONE	NONE

* Temperaturas diferentes para TLR4 (izquierda) y C3 (derecha)

¹ 25 adquisiciones por °C

La identificación final de genotipos para los polimorfismos de TLR4 se realizó añadiendo 5 muestras previamente genotipadas mediante LightCycler®2.0 Capilar. Con estas muestras control se correlacionaron los genotipos con sus correspondientes cinéticas y curvas, permitiendo la posterior asignación del genotipo en las restantes muestras. Para

ambos polimorfismos de TLR4, el grupo de homocigotos wildtype presentó la mayor diferencia de intensidad de fluorescencia respecto al blanco y los heterocigotos la menor diferencia de intensidades (Fig. 16).

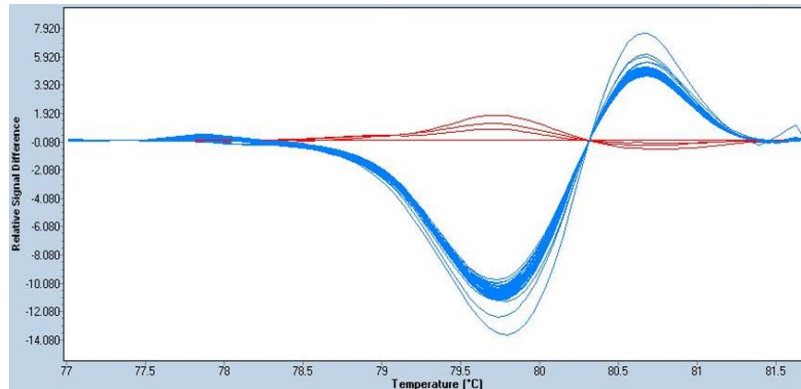


Figura 16. Gráfico normalizado y ajustado por temperatura de RT-PCR-HRM correspondiente al análisis de TLR4 mediante el equipo Light Cycler®480. Imagen correspondiente al polimorfismo de TLR4-299. El grupo de curvas azules corresponde al genotipo homocigoto wildtype y las rojas a heterocigotos.

Para la identificación del polimorfismo del factor C3 del sistema del complemento se emplearon 6 muestras control, 2 para cada genotipo (C3S, C3F y C3FS) previamente tipadas mediante secuenciación Sanger como técnica de referencia tal y como se describe en el apartado 6. Una vez identificada la cinética y la correspondiente curva resultante para cada genotipo, se procedió a la asignación del mismo en cada una de las muestras incluidas en la cohorte.

Se observaron 3 grupos, el de mayor diferencia de intensidad de fluorescencia con respecto al blanco que correspondía a los homocigotos C3S, seguidos por homocigotos C3F y finalmente heterocigotos C3FS (Fig. 17).

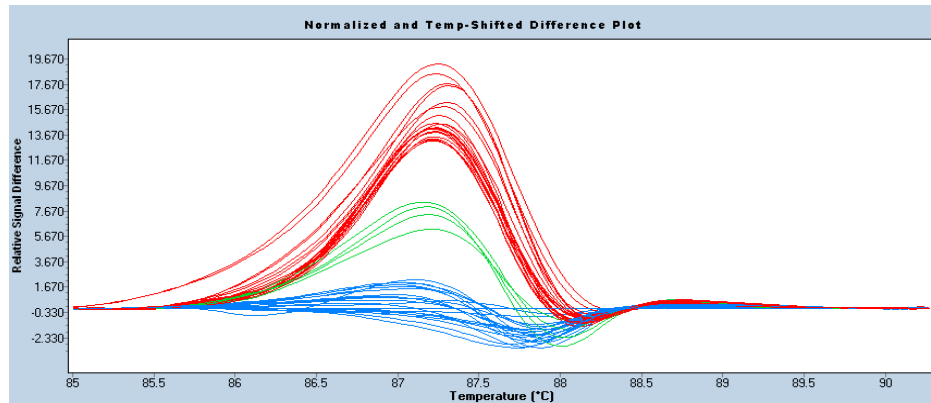


Figura 17. Gráfico normalizado y ajustado por temperatura de RT-PCR-HRM correspondientes al análisis de factor C3 del sistema del complemento mediante el equipo Light Cycler®480. Las curvas de color rojo corresponden al genotipo homocigoto C3S, las de color verde a homocigotos C3F y las curvas azules representan el genotipo heterocigoto C3FS.

5. TETRA-AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM (T-ARMS)

Esta metodología se empleó como referencia para el genotipado de C3 por Real Time-PCR High Resolution Melting. Con este fin, se realizó simultáneamente el tipaje mediante tetra-Amplification Refractory Mutation System (t-ARMS) y RT-PCR-HRM de 49 pacientes de la cohorte.

Se utilizó la técnica t-ARMS según ha sido previamente descrita en la literatura [244]. Esta metodología permitió la amplificación simultánea en un mismo tubo de reacción de un fragmento control y la amplificación alelo-específica de C3S y C3F tal y como se describe en la Figura 18.

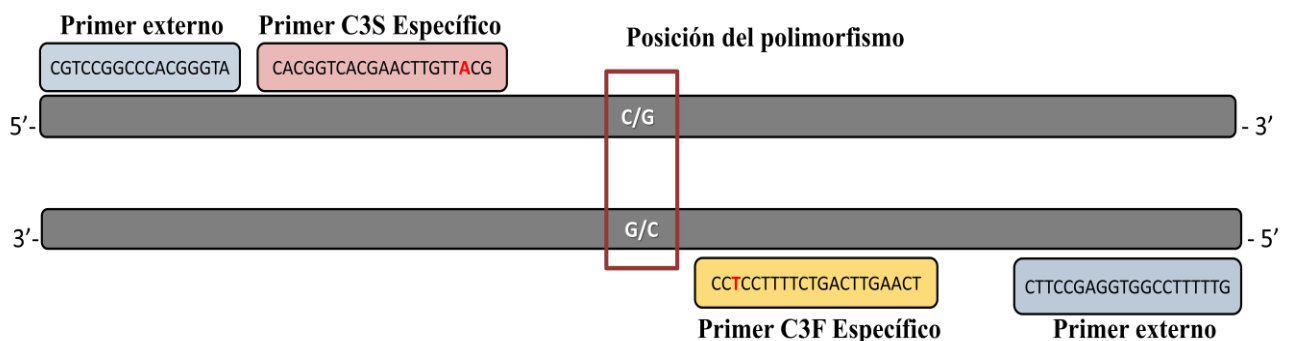


Figura 18. Esquema representativo de t-ARMS. La pareja de primers externos amplifica el fragmento control mientras que otra pareja de primers internos con orientación opuesta es la

responsable de la amplificación alelo específica. Esta se ve incrementada ya que los primers internos presentan una incompatibilidad en el extremo 3'. Además esta técnica permite diferenciar los alelos C3S de C3F ya que se amplifican como fragmentos de diferentes tamaños debido a que existe asimetría entre ellos con respecto a la variación nucleotídica.

Los primers para t-ARMS descritos en la bibliografía, se detallan a continuación identificando en rojo la posición de la incompatibilidad seleccionada [244]:

Primer Externo Directo: 5'-CGTCCGGCCCACGGGTA-3'

Primer Externo Reverso: 5'-CAAAAAGGCCACCTCGGAAG-3'

Primer Interno Directo C3S Específico: 5'-CACGGTCACGAACTTGTTACG-3'

Primer Interno Reverso C3F Específico: 5'-AGTTCAAGTCAGAAAAGGTGG3'

Los primers se sintetizaron por Thermo Fisher Scientific Inc. Se recibió el producto liofilizado, se resuspendieron a 200 nmoles/ μ L y se realizaron alícuotas a 20 nmoles/ μ L. Todas las disoluciones se almacenaron a -20°C.

La amplificación mediante PCR se realizó utilizando la enzima Taq Polimerasa AmpliTaqGold (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) junto con sus respectivo Buffer y Cloruro de Magnesio. La mezcla para la PCR consistió en dNTPs 1,25 μ M, AmpliTaqGold PCR Buffer 10X, MgCl₂ 25mM, AmpliTaqGold (5U/ μ L) y los primers externos e internos (20 nmoles/ μ L). Se descongelaron a temperatura ambiente los componentes de la reacción excepto la AmpliTaqGold. En un tubo Eppendorf se realizó la mezcla incorporando en último lugar la AmpliTaqGold mantenida en hielo. Se repartieron 15 μ L esta mezcla en los tubos de PCR y se añadió a cada uno de ellos 10 μ L del ADN o agua en el pocillo control negativo.

Se sellaron los tubos de PCR y se colocaron en el termociclador GeneAmp PCRSystem 9600 (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA) siguiendo el siguiente programa:

1. Desnaturalización de 10 minutos a 95°C.
2. 35 ciclos:
 - Desnaturalización 30 segundos a 94°C.
 - Anillamiento 30 segundos a 61°C.
 - Elongación 30 segundos a 72°C.

3. Extensión final de 7 minutos a 72°C.

Para la identificación del polimorfismo se preparó un gel de agarosa al 1,5% y las muestras para la electroforesis mezclando el tampón de carga BPB con 10 µL del producto de PCR. Se colocó el gel en la fuente electroforética de 250V/ 2.5A (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) y se cargaron en los pocillos las muestras y el marcador de pesos moleculares DNA Molecular Weight Marker V (Roche, Mannheim, Alemania). Se dejó correr la electroforesis 30 minutos a 120V. Transcurrido el tiempo se observó el gel en el equipo Trasiluminador UV (Uvitec, Cambridge, UK) y se recogió la información mediante la captura fotográfica.

La amplificación se consideró válida cuando se observó el fragmento control a 429 pb. La banda alelo específica de C3S se observó a 185pb y la de C3F a 278pb. Los pacientes homocigotos para el alelo S presentaron 2 bandas, la del control y la del alelo C3S, los homocigotos para C3F presentaron las bandas del control y la del alelo C3F, y los heterocigotos C3FS las presentaron las tres bandas (Fig. 19).

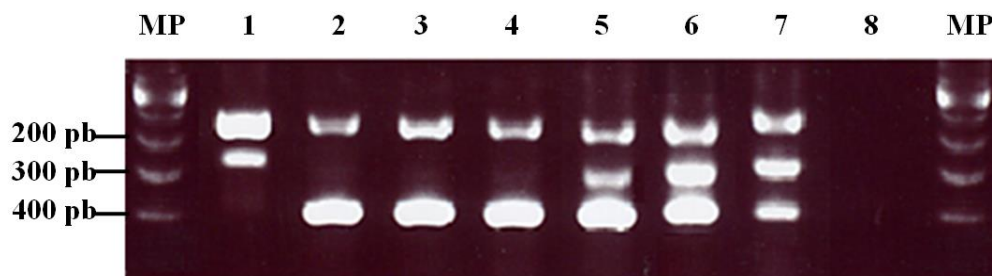


Figura 19. Imagen de electroforesis representativa de t-ARMS. El pocillo número 1 representa el genotipo homocigoto para C3F, los pocillos 2, 3 y 4 representan los genotipos homocigotos C3S y los pocillos 5, 6 y 7 el genotipo C3F. En el pocillo 8 corrió el control negativo. (MP: marcador de pesos moleculares).

6. SECUENCIACIÓN SANGER

La secuenciación Sanger se utilizó para la identificación del genotipo del polimorfismo c.304C>G del factor C3 del sistema del complemento empleando el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA). Se secuenciaron 6 muestras de la cohorte de pacientes cuyo genotipo fue previamente identificado por t-ARMS, 2 pacientes homocigotos C3S, 2 heterocigotos y dos pacientes homocigotos para el alelo C3F. Estas muestras se emplearon como controles para guiar la posterior asignación de genotipos y posteriormente para la resolución de ambigüedades en la comparativa entre las metodologías t-ARMS y RT-PCR-HRM.

Se diseñaron los correspondientes primers necesarios para la amplificación de un fragmento de 263 pb que contenía este polimorfismo. Las correspondientes secuencias de la pareja de primers son las siguientes:

Primer Directo: 5'-AAGAATAATGGGCAGGCAAG-3'

Primer Reverso: 5'-CCAGGGGTGTAGATGCTCTT-3'

Estos primers se sintetizaron por Thermo Fisher Scientific Inc. Se recibió el producto liofilizado, se resuspendió a 200 nmoles/ μ L y se alicuotaron a 20 nmoles/ μ L. Todas las disoluciones se almacenaron a -20°C .

La mezcla de PCR constaba de enzima Taq Polimerasa FastStart (5U/ μ L) (Roche, Mannheim, Alemania), Buffer 10X de PCR FasnStart, Cloruro de Magnesio 25 mM, primers (20 nmoles/ μ L) y dNTPs (1,25 mM). Se descongelaron los componentes a temperatura ambiente excepto la Taq Polimerasa que se mantuvo en hielo. Se mezclaron los reactivos un tubo Eppendorf de 1,5mL, se dispensaron 47,3 μ L en los pocillos de PCR y se añadieron 2,7 μ L del ADN (25-100 ng/ μ L) correspondiente y agua en el control negativo.

Se sellaron los tubos y se colocaron en el termociclador GeneAmp PCRSystem 9600 bajo el programa descrito a continuación:

1. Desnaturalización de 5 minutos a 95°C .
2. 40 ciclos:
 - Desnaturalización 15 segundos a 95°C .
 - Anillamiento 15 segundos a 57°C .
 - Elongación 30 segundos a 72°C .
3. Extensión final de 10 minutos a 72°C .

Se comprobó que la amplificación fue específica y se descartó la contaminación mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó un gel de agarosa al 1,5% y se dispuso

en la fuente de electroforesis. Se prepararon las muestras mezclando tampón de carga BPB con 10 μ L del producto de PCR. Se cargaron la mezcla y el marcador de pesos moleculares 100pb DNA Ladder Marker (Invitrogen, Paisley PA, UK). Transcurrido el tiempo de electroforesis (30 minutos a 120 V) se observó el gel en el equipo trasiluminador UV y se recogió la información mediante la captura fotográfica.

Posteriormente se procedió a la purificación del restante producto de PCR. Se preparó un gel de agarosa al 1,5% y se colocó en la fuente electroforética. Se prepararon las muestras mezclando tampón de carga BPB y el restante producto de PCR y se cargaron en el gel dos pocillos de 25 μ L por muestra y el marcador de pesos moleculares Molecular Weight Marker V. Se dejó correr 45 minutos a 100 V permitiendo la separación adecuada de la banda específica. Se colocó el gel sobre una fuente transiluminadora UV (CYLEX, Branchenbuch, Alemania) y se recortaron las bandas de amplificación específicas. Los fragmentos se purificaron mediante el kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Sobre los Eppendorf que contenían los fragmentos recortados se añadió Buffer QG y Acetato Sódico 2M. Se homogeneizó en el vortex y se incubó 30 minutos a 37°C. Se transfirió el contenido a las columnas de precipitación del kit y se centrifugaron a 14000 rpm 1 minuto. Se decantó el contenido y se repitió el lavado con Buffer QG. Se añadió Buffer PE y se incubó a temperatura ambiente 5 minutos. Volvió a centrifugarse a 14000 rpm 1 minuto, se decantó el contenido del tubo y se repitió el proceso de lavado con del Buffer PE. Se transfirieron las columnas (donde quedó retenido el producto de PCR) a un nuevo tubo Eppendorff y se eluyó el producto de PCR con Buffer de elución EB tras centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto.

Se preparó la mezcla del reactivo BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit para la reacción de secuenciación según las indicaciones del fabricante. Se descongelaron a temperatura ambiente los componentes del kit y los primers usados en la amplificación inicial del fragmento. Se realizó una mezcla para la secuencia directa y otra para la reversa constituida por el reactivo Ready Reaction Mix (incorpora los di-desoxi-nucleótidos), Buffer 5X y primer (20 ng/ μ L). Se repartió la mezcla en los respectivos tubos de PCR (uno para la

secuencia directa y otro para la reversa) y se añadió en cada pocillo 1,5 μ L del producto de PCR.

Se sellaron los pocillos y se colocaron en el termociclador GeneAmp PCRSystem 9600 para proceder a la reacción de secuenciación:

1. Desnaturalización de 2 minutos a 96°C.
2. 32 ciclos:
 - Desnaturalización 15 segundos a 96°C.
 - Anillamiento 20 segundos a 50°C.
 - Elongación 4 minutos a 60°C.
3. Enfriamiento a 4° Indefinido.

Se precipitó el producto de secuenciación para eliminar los restos de reactivos no incorporados durante el proceso. En un tubo Eppendorff se añadieron 8 μ L del producto de reacción, 1/10 del volumen del producto de secuenciación de Acetato Sódico 2M y el doble de etanol absoluto y se dejó a -20°C overnight. Se centrifugaron los tubos 30 minutos a 4°C a 14000 rpm y se retiró el sobrenadante con bomba de vacío. Se realizó un lavado con etanol al 70% a -20°C, centrifugando a 14000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante por aspiración con bomba de vacío y se dejó secar el ADN para eliminar los restos de reactivos en un baño seco a 37°C durante 20 minutos.

Por último se analizaron las secuencias en el equipo de electroforesis capilar Avant AbiPrism-3100 Avant Genetic Analyzer. (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se resuspendieron las muestras en 30 μ L de Formamida (GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, USA) y se incubaron 30 minutos a 37°C. Se colocaron en la carcasa del secuenciador y se desnaturalizaron 3 minutos a 96°C en el termociclador GeneAmp PCRSystem 9600. Finalmente se introdujeron en el secuenciador. Los parámetros empleados, fueron los determinados por el fabricante siguiendo el protocolo de secuenciación estándar, el polímero POP6 y el capilar de 50 cm de longitud. Transcurrida la carrera se analizaron los resultados con el software 3100 Avant Data Collection y Sequencing Analysis del equipo, obteniendo los correspondientes electroferogramas. Un único pico correspondiente al nucleótido C se identificó como homocigoto C3S, un pico del

nucleótido G se asignó como homocigoto C3F y el doble pico G/C se asignó como genotipo heterocigoto para C3SF.

7. CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DE COMPLEMENTO (CDC) PARA LA TIPIFICACIÓN DE MOLÉCULAS HLA-A Y -B

La tipificación de HLA-A y -B por CDC se basa en el reconocimiento de las moléculas HLA expresadas en la superficie de los linfocitos por una batería de anticuerpos monoclonales inmovilizados en el fondo de los pocillos de una placa comercial [245-247]. Cuando se produce el reconocimiento específico, el complemento incorporado en la placa activa la lisis de las células por la vía clásica (reacción positiva) mientras que si no existe reconocimiento no se producirá la muerte celular (reacción negativa).

Se aislaron los linfocitos de sangre periférica anticoagulada con heparina obtenida por venopunción en el momento de inclusión en la lista de espera. La muestra se diluyó en volúmenes iguales con medio RPMI 1640 (Lonza Group, Basilea, Suiza) y se distribuyó en tubos de 12 mL aproximadamente 3 ml de Ficoll (Lymphoprep™; AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Noruega). Se centrifugó a 2400 rpm 20 minutos quedando los linfocitos en la interfase plasma-Ficoll. Se recogió la nube de linfocitos con una pipeta Pasteur y se lavó por duplicado con medio RPMI-FCS centrifugando a 1400 rpm 7 minutos y decantando el sobrenadante. Se ajustaron las células a $2,5 \times 10^6$ células/mL con medio RPMI-FCS empleando una cámara de Neubauer y el microscopio de contraste de fases (Nikon, Japón).

Se dispensó 1 μ L de la suspensión celular con una microjeringa de repetición automática (Hamilton, Nevada, USA) en cada de las placas monoclonales para tipificación tisular de HLA clase I –A (LM144A) y –B (LM144B) (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA). Se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Para la identificación del tipaje se fijó la placa con el reactivo FluoroQuench (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA) que contiene Naranja de Acridina que teñirá de color naranja las células muertas y Bromuro de Etidio que teñirá de color verde las vivas al observar la placa en el microscopio de fluorescencia (Nikon, Japón) (Fig. 20). La cuantificación de las reacciones se realizó

siguiendo la nomenclatura internacional: 8 (100-80% de linfocitos muertos), 6 (60-80% de linfocitos muertos), 4 (40-60% de linfocitos muertos), 2 (20-40% de linfocitos muertos), 1 (100% de linfocitos vivos) y 0 (no valorable). Se consideró positiva con asignaciones de más de 6, dudosas con valores de 4 y negativas con valores de 2 ó 1.

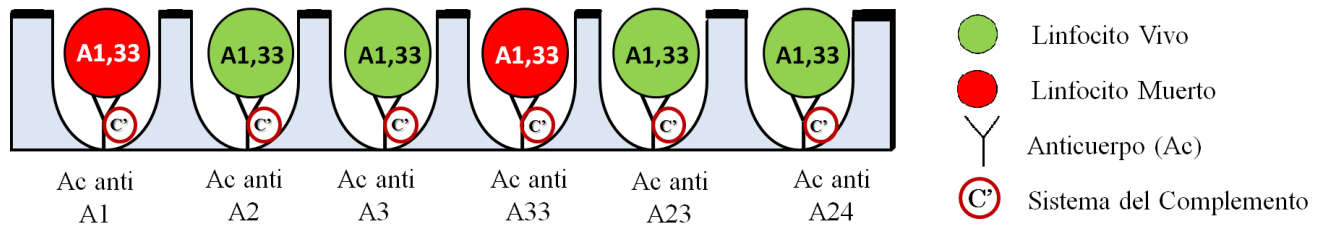


Figura 20. Tipaje por CDC. La molécula HLA-A o HLA-B de la superficie del linfocito es reconocida por los anticuerpos específicos inmovilizados en el fondo del pocillo. El sistema de complemento incorporado en la placa, lisa por la vía clásica la célula en la que se haya producido la unión anticuerpo-molécula HLA, mientras que en las que no se produce esta unión, la célula permanecerá viva.

7.1. Clasificación de las moléculas HLA-B

Los pacientes se clasificaron en dos grupos según el aminoácido que presentaron en posición 80 de la molécula serológica HLA-B. Cuando se trató de Isoleucina o Treonina pertenecían al grupo Bw4 mientras que cuando fuera Asparagina al grupo Bw6 [248].

8. SEQUENCE SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE-PCR (SSO-PCR) PARA EL GENOTIPADO DE MOLÉCULAS HLA-C

Para la tipificación del alelo HLA-C de clase I se empleó el kit SSO-PCR INNO-LiPA HLA-C (INNOGENETICS, Gante, Bélgica). La amplificación por PCR emplea primers biotinilados que incorporan esta molécula al producto de PCR (Fig. 21).

En un tubo Eppendorf de 1,5 mL se preparó la mezcla de reacción constituida por Amplification Buffer, HLA-C Primer Solution y LiPA-Taq. Se alicuotaron 32 μ L en sus respectivos tubos de PCR y se añadió 4 μ L ADN (0,10-1,25 μ g/ μ L) o agua destilada en el pocillo control negativo.

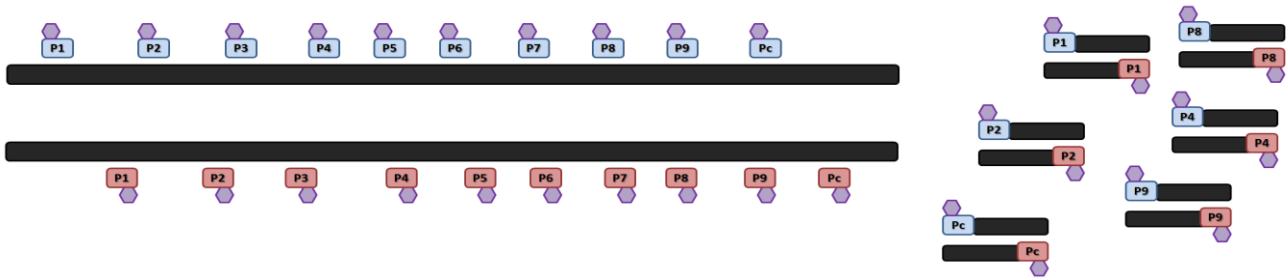


Figura 21. Amplificación por PCR con primers biotinilados. El kit permite la amplificación de diversos fragmentos de los exones 2 y 3 del gen HLA-C. Estos productos de PCR quedarán marcados con biotina, permitiendo la posterior identificación de los alelos.

Se sellaron los tubos, se colocaron en el termociclador GeneAmp PCRSystem 9600 y se inició el programa siguiente:

1. Desnaturalización 5 minutos a 96°C
2. 5 ciclos - Desnaturalización 30 segundos a 96°C
 - Anillamiento 50 segundos a 64°C
 - Extensión 50 segundos a 72°C
3. 5 ciclos - Desnaturalización 30 segundos a 96°C
 - Anillamiento 50 segundos a 62°C
 - Extensión 50 segundos a 72°C
4. 10 ciclos - Desnaturalización 30 segundos a 96°C
 - Anillamiento 50 segundos a 60°C
 - Extensión 50 segundos a 72°C
5. 15 ciclos -Desnaturalización 30 segundos a 96°C
 - Anillamiento 50 segundos a 55°C
 - Extensión 50 segundos a 72°C
6. Elongación 10 minutos a 72°C.

Una vez finalizado el proceso se comprobó la amplificación y la ausencia de contaminación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. El producto de amplificación válido aparecería con un peso molecular correspondiente a 904 pb.

Para la identificación de los alelos, se realizó la hibridación reversa siguiendo las instrucciones del fabricante del equipo AUTO-LiPA. Se colocó en el equipo la solución de hibridación y el tampón de lavado astringente del kit, que requieren previo calentamiento a

56°C, y se prepararon el resto de reactivos según el manual. El kit incluye una bandeja de 42 ranuras (una por muestra). En cada ranura se dispensaron 10µL del producto de PCR, la solución desnaturalizante y una tira de nitrocelulosa con sondas específicas para los distintos alelos de HLA-C. Cuando el equipo alcanzó la temperatura adecuada, se incorporaron el resto de reactivos y la bandeja con las muestras. Desde este momento la desnaturalización, hibridación, lavados y revelado se realizó automáticamente. Una vez terminó el equipo, las membranas presentaron un patrón de bandas de color morado (Fig. 22).

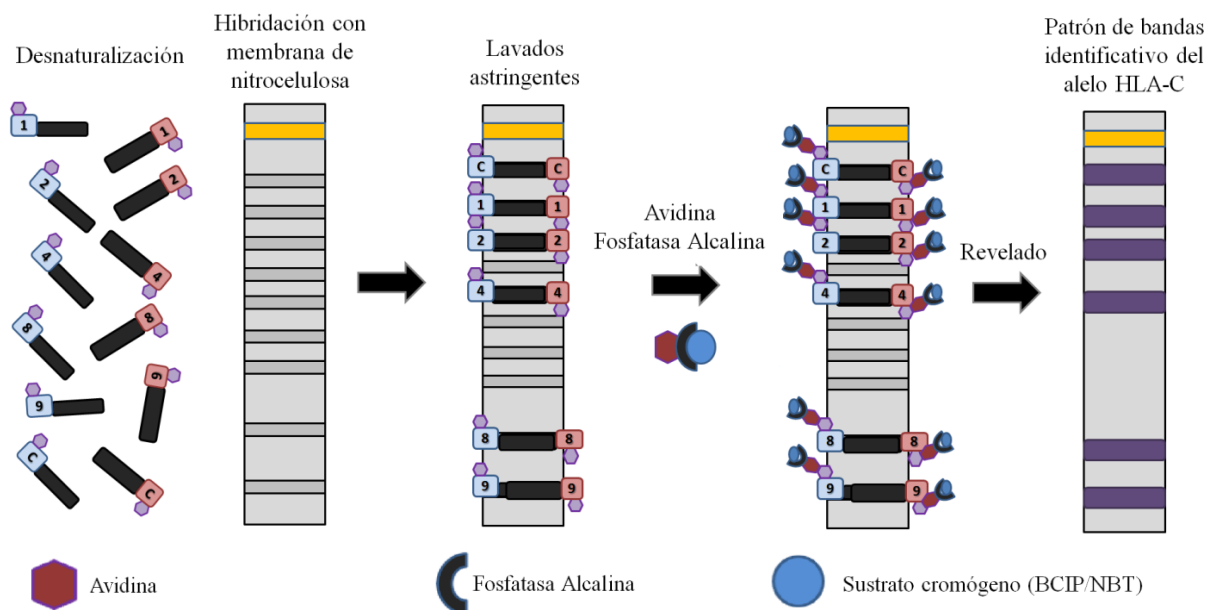


Figura 22. Hibridación inversa. El producto de PCR hibrida con una serie de sondas inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa complementarias a cada uno de los posibles fragmentos amplificados en el primer paso. Tras una serie de lavados astringentes se eliminan las uniones inespecíficas y se revelan las bandas adicionando avidina marcada con la enzima fosfatasa alcalina. Al añadir un sustrato cromógeno para la enzima se generará un precipitado púrpura y un patrón de bandas característico que permitirá identificar las moléculas HLA-C.

El patrón de bandas se analizó mediante el software LIRAS for LiPA HLA-C (INNOGENETICS, Gante, Bélgica) que identificó el alelo asociado generando un informe con el tipaje HLA-C de cada muestra.

8.1. Clasificación de las moléculas HLA-C

Cuando en posición 80 del alelo serológico HLA-C estuvo el aminoácido Asparagina (HLA-Cw*01/*03/*07/*08/*12/*13/*14/*1507/*1601/*1604) se clasificó en el grupo C1, mientras que pertenecería al grupo C2 cuando fuese Lisina (HLA-Cw*02/*04/*05/*06/*0707/*1204/*15/*1602/*17). En caso de presentar cada alelo un aminoácido se clasificaría como C1 C2 [249].

9. SEQUENCE SPECIFIC PRIMER-PCR (SSP-PCR) PARA EL GENOTIPADO DE GENES KILLER IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS (KIR)

Se llevó a cabo la identificación de los genes KIR mediante Sequence Specific Primer-PCR (SSP-PCR) (Invitrogen, Paisley, PA, UK) previamente descrita en la literatura [250, 251]. Este método se basa en la amplificación específica de cada uno de los genes detectables, con parejas de primers específicos para cada uno de ellos. En cada pocillo además de la pareja de primers alelo-específicos, se incorpora otra pareja de primers para la amplificación de un fragmento control de un gen ampliamente conservado. Además el kit incorpora un pocillo control negativo. Se preparó la mezcla de reacción constituida por Buffer de PCR y Taq Polymerase FastStart (5U/ μ L) (Roche, Mannheim, Alemania). Se dispensaron 8 μ L al pocillo control negativo. A continuación se añadió el ADN (75-125ng/ μ L) a la mezcla inicial y se repartieron 8 μ L de la mezcla final en los pocillos restantes.

Se sellaron las placas y se inició la amplificación en el termociclador GeneAmp PCRSystem 9600:

1. Desnaturalización inicial de 1 minuto a 95°C.
2. 30 ciclos: -94°C 20 segundos
-63°C 20 segundos
-72°C 90 segundos
3. Elongación final de 10 minutos a 72°C.

La identificación del repertorio génico se realizó mediante separación electroforética del producto de PCR y posterior documentación fotográfica. Se preparó el gel de agarosa al 2% y se colocó en la fuente de electroforesis. Se cargaron los 8 μ L del producto de PCR de cada pocillo y el marcador de pesos moleculares Marcador VI (Roche, Mannheim, Alemania). Se dejó correr la electroforesis 25 minutos a 125 V. Una vez finalizada, se expuso el gel en el equipo trasiluminador UV y se fotografió la imagen. Se adjuntó la fotografía a la hoja de resultados y se identificaron los genes KIR que correspondían a las bandas de amplificación obtenidas (Fig. 23).



Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa de SSP-PCR-KIR. Los pocillos desde 2 a 22 permiten la identificación de los diferentes genes KIR y el pocillo número 1 corresponde al control negativo. La banda de menor peso corresponde al fragmento control de amplificación (β -globina). (MP: marcador de pesos moleculares).

El kit permitió la identificación de las siguientes especificidades alélicas: 2DL1*001-006, 2DL2*001-005, 2DL3*001-006, 2DL4*00101/00102/00201/00202/003-011, 2DL5A*001/005, 2DL5B*002/004, 2DL5B*003, 2DS1*001-004, 2DS2*0010100102/00103/004-005, 2DS3*00101-00103, 2DS4*00101/00102/002, 2DS4*003-005, 2DS5*001/002/004/005, 3DL1*00101/00102/002/003/00401/00402/005-008/01501/01502/016-019, 3DL1*009, 3DL2*001-012, 3DL3*001/00201/00202/003/004, 3DS1*010-013, 2DP1*001/002, 3DP1*001/002/004 y 3DP1*00301/00302.

9.1. Haplotipos y genes KIR e interacciones KIR-HLA

Los pacientes se clasificaron en homocigotos para el haplotipo A (AA) y en homocigotos o heterocigotos para haplotipos B (Bx). Los haplotipos A se caracterizan por

presentar 1 ó ningún receptor activador y 4 inhibidores, mientras que los haplotipos B pueden presentar entre 2 y 6 receptores inhibidores y entre 2 y 6 activadores [181].

Los genes KIR identificados se clasificaron en función del número total de receptores que estuvieran presentes (KIR Totales) y según su funcionalidad en activadores (aKIR) o inhibidores (iKIR). Se incluyeron en el análisis aquellos receptores que han sido caracterizados hasta la actualidad: KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1. Para la clasificación de receptores totales se tuvo en cuenta la presencia o ausencia de los mismos independientemente de las duplicidades. Se clasificaron como inhibidores (iKIR) los receptores KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3 y como activadores (aKIR) los receptores KIR2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1. El receptor inhibidor 2DL5 puede presentarse dos veces como alelos diferentes (2DL5.1 ó 2DL5.B) pudiendo incluirse por duplicado en el conteo de receptores iKIR. El receptor activador 2DS4 también puede presentarse simultáneamente como dos alelos diferentes (2DS4*001/*002 ó 2DS4*003-*007) por lo que también podría aparecer por duplicado en el conteo de receptores aKIR [173].

Para determinar el estado de activación de las células NK se cuantificaron las interacciones KIR-HLA de carácter activador e inhibidor en los receptores. Se determinó el número de interacciones presentes en cada paciente entre los receptores aKIR e iKIR y sus ligandos HLA putativos de acuerdo a los datos recogidos en la Tabla 13 [252-256]

Tabla 13. Interacciones entre receptores aKIR e iKIR con sus ligandos HLA

	iKIR				aKIR	
Receptor KIR	2DL1	2DL2/3	3DL1	3DL2	2DS1	2DS4
Ligando HLA	HLA C2	HLA C2	Bw4	A3/A11	HLA C2	HLA C1/C2, A11

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El test no paramétrico de homogeneidad marginal de McNemar, se empleó para determinar la concordancia entre la nueva metodología RT-PCR-HRM y la tradicionalmente utilizada t-ARMS para el tipaje del factor C3 del sistema del complemento. Para comparar la influencia de las variables a contrastar sobre el desarrollo de los diferentes eventos estudiados, se empleó el test de Fisher (incorporando la corrección de Yates cuando la frecuencia esperada fue inferior a 5). Para la comparación del tiempo medio de supervivencia de pacientes, del injerto y de tiempos libres de infección, se empleó el análisis de supervivencia de Kaplan-Meyer junto con el test de significación Logrank. Finalmente el estudio de asociación Univariable y Multivariable se realizó mediante el test de Regresión Logística Binaria. Se consideró la existencia de significación estadística para un valor $p \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando los programas estadísticos SPSSv18 (IBM, Armonk, NY, USA) y GraphPad Prismv5.0 (La Jolla, CA, USA).

REACTIVOS UTILIZADOS

-SLR 1X: Se prepararon 50 mL añadiendo 0.5 ml de Tris-HCl pH 7.5, 2.5 ml de $MgCl_2$ 1M, 5.4 g Sacarosa y 0.5 mL de detergente Tritón. Se completó el volumen con agua destilada.

-Etanol 75%: Se prepararon 50 mL de etanol al 75% mezclando 12,5 mL de etanol absoluto y 37,5 mL de agua destilada.

-Etanol 95%: Se prepararon 50 mL de etanol al 95% mezclando 2,5 mL de etanol absoluto y 47,5 mL de agua destilada.

-Buffer TEA 50%: Para 1L de TEA 50X se mezcló en un matraz aforado, 242.29 g de TRIS, 37.22 g de EDTA y 57.4 mL de Ácido Acético pH8. Se completó el volumen con agua destilada.

-BPB: 50 mL la disolución se contenían 0.5 mL de TRIS 50 mM pH 7.6, 5 mL de EDTA 0.5 mM pH8, 0.25 g de SDS 0.5%, 20 g de Sacarosa 40% y 0.05 g de Azul de Bromofenol 0.1%. El volumen restante se completó con agua destilada.

-dNTPs 1,25 μ M: se mezclaron en un tubo Eppendorff 25 μ L de cada dNTP 10 mM y agua destilada estéril hasta alcanzar los 200 μ L.

-Gel de agarosa: 4,5g (1.5%) o 6g (2%) de Agarosa D1 Low EEO (CONDA, Madrid, España) y 1 mL de solución TEA 50X se disolvieron en 300 mL de agua destilada estéril calentando la mezcla en microondas (6 y 10 minutos respectivamente) a 700W. Se dejó atemperar en un agitador magnético incorporando un imán y se añadieron 15 μ L de Bromuro de Etidio 10 mg/mL (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania). Se montó una carcasa molde para el gel de agarosa (BRL GibCo, Paisley, UK) con 4 peines. Se vertió la mezcla y se dejó solidificar.

-Medio RPMI-FCS: El medio RPMI 1640 se suplementó con 2% de mezcla de antibióticos Ampi-Strep (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y un 20% de Suero Bovino Fetal (FCS) (Lonza Group, Basilea, Suiza).

IV. Resultados

1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA POBLACIÓN

1.1. Frecuencia de polimorfismos de TLR4 y del factor C3 del complemento. Eventos clínicos e infecciones

Para el estudio de los polimorfismos de TLR4 c.896A>G (TLR4-299) y c.1196C>T (TLR4-399) y del polimorfismo g.304C>G del factor C3 del complemento se incluyeron 522 pacientes receptores de Tx. De todos estos, la calidad del material genético sólo permitió la identificación de los polimorfismos de TLR4 en 503 pacientes y del polimorfismo de C3 en 483 receptores de trasplante. Las características de estos pacientes se describen en la Tabla 14. Las principales causas del trasplante hepático fueron infecciones por virus hepatotropos (VHC A, B, C ó D) en 42.9% de los casos, seguidos de enolismo crónico en el 19.3% de los pacientes, hepatocarcinoma celular en el 18.8% y hepatopatía primaria en el 13%. En el restante 6% de los casos se debió a causas minoritarias como metabolopatías congénitas, neoplasias y hepatopatías no filiadas.

Tabla 14. Descripción de la población incluida en el estudio de polimorfismos de TLR4 y C3

Sexo	Hombre	372 (71.3%)
	Mujer	150 (28.7%)
Edad		52.03±15.28 (0-75)
Tipo de Trasplante	Cadáver	452 (86.6%)
	Split	46 (8.8%)
	Vivo	24 (4.6%)
Re-Trasplante		14 (2.7%)
Tipo de Donante	Encefálica	458 (87.7%)
	Asistolia	40 (7.7%)
	Vivo	24 (4.6%)
Seroestatus CMV	R+D+	477 (91.4%)
	R- D-	27 (5.2%)
	R- D+	18 (3.4%)
Inmunosupresión	Tacrolimus+Esteroides	365 (69.9%)
	Tacrolimus+Esteroides+MMF	74 (14.2%)
	CiclosporinaA+Esteroides+MMF	42 (8%)
	CicloporinaA+Esteroides	6 (1.1%)
	Otros	35 (6.7%)

Los datos se expresaron en frecuencia y porcentaje excepto la edad que se describió como media ± SD (rango).

1.1.1. Distribución de polimorfismos de TLR4 y C3 en la cohorte de receptores hepáticos

1.1.1.a. Receptores TLR4

La identificación de los polimorfismos de TLR4 se realizó en 503 de los pacientes incluidos y en 100 controles sanos (Tabla 15). La causa de exclusión de pacientes del análisis fue la baja calidad del ADN tras la extracción.

Tabla 15. Frecuencia de los polimorfismos TLR4 en la población estudiada

		Pacientes	Controles
TLR4-299	TLR4-299 AA	447 (88.9%)	90 (90%)
	TLR4-299 AG	56 (11.1%)	10 (10%)
TLR4-399	TLR4-399 CC	443 (88.1%)	91 (91%)
	TLR4-399 CT	60 (11.9%)	9 (9%)
		n= 503	n=100

Ambos polimorfismos de TLR4 tanto en pacientes como en controles se ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg (TLR4-299 pacientes $p= 0.46$ y controles $p= 0.69$; TLR4-399 pacientes $p= 0.33$ y controles $p= 0.58$). La comparación de las frecuencias alélicas entre pacientes y el grupo control determinó que no existían diferencias entre ambas poblaciones (TLR4-299 $p= 0.18$; TLR4-399 $p= 0.29$).

1.1.1.b. Factor C3 del sistema del complemento

Uno de los objetivos del presente trabajo de tesis doctoral fue desarrollar la técnica RT-PCR-HRM para el genotipado del polimorfismo c.304C>G de C3. Con este fin se analizaron previamente 49 pacientes de la cohorte mediante t-ARMS, utilizada en la actualidad como técnica de referencia. Para guiar la posterior asignación de genotipos en la técnica RT-PCR-HRM y resolver posibles ambigüedades, se secuenciaron 6 muestras de ADN de estos 49 pacientes cuyo genotipo fue previamente identificado por t-ARMS. Por último estos 49 pacientes se genotiparon mediante RT-PCR-HRM, empleando las 6 muestras control secuenciadas para la identificación de las cinéticas y las curvas de cada uno de los genotipos.

La técnica t-ARMS resolvió el 96% de los genotipos, mientras que la resolución de la técnica RT-PCR-HRM fue del 98% (Tabla 16). Tras secuenciar las tres únicas muestras discordantes se observó que 2 genotipos coincidieron con el identificado por RT-PCR-HRM, y el restante coincidió con el determinado por t-ARMS. En la comparación de ambas técnicas mediante el test McNemar (análisis de simetría), la concordancia de ambas técnicas resultó del 93.8% y no se observaron diferencias estadísticas entre ambas metodologías ($p=0.89$), por lo que se seleccionó la técnica RT-PCR-HRM para el genotipado de la restante cohorte [243].

Tabla 16. Frecuencias de C3 observadas por t-ARMS y RT-PCR-HRM

	t-ARMS	RT-PCR-HRM	p
C3SS	(27/49) 55.1%	(26/49) 53.1%	0.89
C3FS	(18/49) 36.7%	(18/49) 36.7%	
C3FF	(4/49) 8.2%	(5/49) 10.2%	
Alelo C3S	(72/98) 73%	(69/98) 70%	0.51
Alelo C3F	(26/98) 27%	(29/98) 30%	

El polimorfismo del factor C3 se determinó en 483 pacientes (Tabla 17). La causa de exclusión de pacientes del análisis fue la baja calidad del ADN tras la extracción. En cuanto a la distribución del polimorfismo de C3, también se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p= 0.24$). La comparación de las frecuencias alélicas obtenidas, 0.76 para el alelo C3S y 0.24 para C3F, con las descritas previamente en la literatura publicada en población española [257], indicó que no existían diferencias entre ambas ($p= 0.32$). Además para el estudio del factor C3, se realizó una segunda distribución en función de la presencia o ausencia del alelo C3F.

Tabla 17. Frecuencia de los polimorfismos del factor C3 en la población estudiada

		Pacientes
C3	C3SS	284 (58.8%)
	C3FS	164 (34%)
	C3FF	35 (7.2%)
		n= 483

1.1.2. Eventos clínicos: éxitus, pérdida de injerto y rechazo

De los receptores hepáticos incluidos en el estudio se recogieron datos clínicos y de evolución del trasplante durante el primer año tras el mismo. Sobre la totalidad de la cohorte identificamos 161 pacientes (30.8%) con eventos de rechazo del injerto, 39 (7.5%) casos de pérdida del injerto, se diagnosticaron 2 (0.3%) casos de EICH y fallecieron 88 (16.8%) receptores de trasplante.

El número de rechazos osciló entre 1 y 4 por paciente, presentando la mayoría (128 pacientes 24.5%) un único rechazo, 26 pacientes (5%) 2 rechazos, 5 pacientes (1%) 3 rechazos y 2 pacientes (0.4%) presentaron 4 rechazos.

1.1.3. Eventos infecciosos

Se recogieron los datos de las infecciones desarrolladas en 515 pacientes de la cohorte (Tabla 18).

Tabla 18. Infecciones observadas en los pacientes del estudio de los polimorfismos TLR4 y C3

Tipo Infección	Nº infecciones	Tipo Infección	Nº infecciones
Bacteriemia G+	98 (19,4%)	Cistitis	111 (22%)
Bacteriemia G-	53 (10,5%)	Síndrome viral CMV	15 (3%)
Neumonía	16 (3.2%)	Hepatitis CMV	11 (2.2%)
Infección tracto respiratorio	10 (2%)	Esofagitis CMV	4 (0.8%)
Intraabdominal	82 (16.2%)	Enteritis CMV	4 (0.8%)
Colitis / Gastroenteritis	4 (0.8%)	Otros virus (VHS, VHZ)	49 (9.7%)
Infección herida quirúrgica	38 (7.5%)	Aspergilosis pulmonar invasiva	3 (0.6%)
Pielonefritis	6 (1.2%)	Micosis cutánea	1 (0.2%)

Infecciones más frecuentes en pacientes de trasplante hepático en el Hospital 12 de Octubre [240]

Se recogieron datos de 505 eventos infecciosos en un total de 267 (51.8%) pacientes que si desarrollaron algún tipo de infección. En 418 (82.8%) casos, las infecciones fueron de etiología bacteriana, en 83 (16.4%) víricas y sólo 4 (0.8%) fúngicas. Cada paciente pudo presentar más de una única infección, de esta forma, se observaron por cada paciente entre 1 y 7 infecciones bacterianas y 1 ó 2 víricas.

1.2. Distribución de killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). Eventos clínicos e infecciones

El análisis de los receptores KIR e interacciones KIR-HLA se realizó sobre 95 pacientes receptores de trasplante hepático. Las características de este grupo de pacientes se describen en la Tabla 19.

Tabla 19. Características generales de los pacientes incluidos en el análisis de KIR

Sexo	Hombre	68 (71.6%)
	Mujer	27 (28.4%)
Edad		52.79±12.11 (1-70)
Tipo de Trasplante	Cadáver	76(80%)
	Split	11 (11.6%)
	Vivo	8 (8.4%)
Re-Trasplante		2 (2.1%)
Tipo de Donante	Encefálica	85 (89.5%)
	Asistolia	2 (2.1%)
	Vivo	8 (8.4%)
Seroestatus CMV	R+D+	86 (90.5%)
	R- D-	6 (6.3%)
	R- D+	3 (3.2%)
Inmunosupresión	Tacrolimus+Esteroides	55 (57.9%)
	Tacrolimus+Esteroides+MMF	16 (16.8%)
	CiclosporinaA+Esteroides+MMF	21 (22.1%)
	CicloporinaA+Esteroides	1 (1.1%)
	Otros	2 (2.1%)

Los datos se expresaron en frecuencia y porcentaje excepto la edad que se expresó como media \pm SD (rango).

Al igual que para la cohorte de pacientes de los polimorfismos de TLR4 y C3, las principales causas de trasplante fueron las infecciones por virus hepatotropos (VHC A, B, C ó D) en 51.5% de los casos seguidos de enolismo crónico en 22.1% de los pacientes, hepatocarcinoma celular en 12.6% de los pacientes, hepatopatía primaria en 10.5% y el restante 3.3% por causas minoritarias como neoplasias y otras hepatopatías no filiadas.

Cinco pacientes (5.3%) recibieron profilaxis con valganciclovir o ganciclovir (receptor CMV-/donante + ó - y en trasplante pediátrico).

1.2.1. Frecuencia de moléculas HLA-B, HLA-C y receptores KIR

Se identificó el alelo serológico Bw4 en 62 pacientes (65.3%), los 33 restantes (34.7%) se clasificaron como Bw4-. Respecto a HLA-C, se asignaron al grupo C1C1 35 pacientes (36.8%), al C2C2 20 pacientes (21.1%) y 40 pacientes (42.1%) en el grupo heterocigoto C1C2. En la distribución por haplotipos KIR 10 pacientes (10.5%) presentaron los haplotipos AA y 85 (89.5%) los haplotipos Bx. Además se agruparon los pacientes en función de la distribución del número de receptores KIR (KIR totales, aKIR, iKIR) y de las interacciones aKIR/iKIR-HLA (descritas en la Tabla 13) presentes en los mismos. Los resultados de estas agrupaciones se muestran en la figura 24.

1.2.2. Eventos clínicos: éxitus, pérdida de injerto y rechazo

En el periodo de observación (un año post-trasplante), 6 pacientes (6,3%) fallecieron, 8 (8,4%) perdieron el injerto trasplantado y 27 (28,4%) rechazaron el injerto. Del total de los 55 eventos observados (éxitus, pérdida o rechazo del injerto), 27 pacientes (65.8%) presentaron únicamente 1 evento y 14 (34.2%) hasta 2.

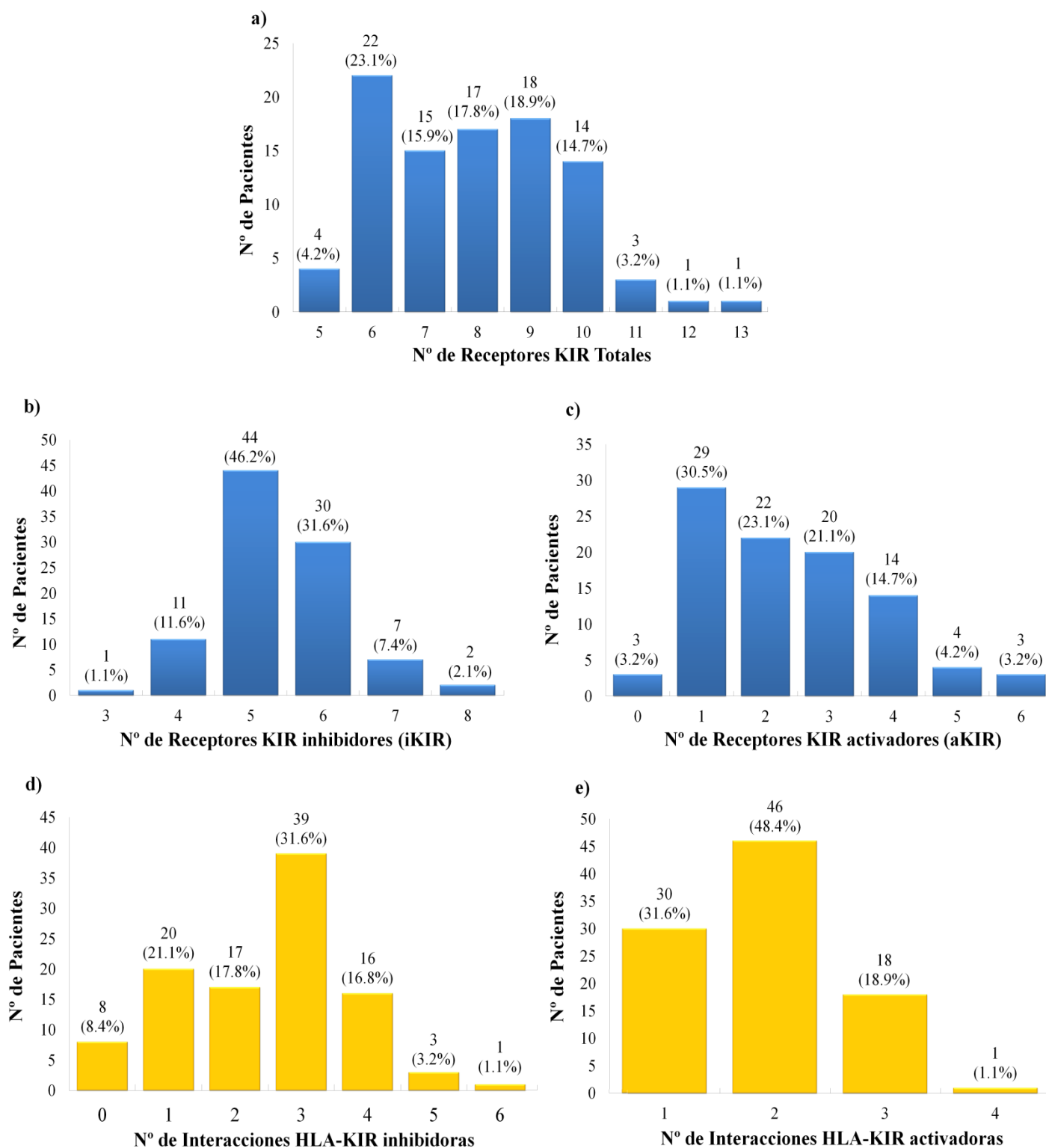


Figura 24. Clasificación de pacientes en función del repertorio de genes KIR e interacciones KIR-HLA. Fig. a-c) Frecuencias y porcentajes de pacientes en función del número de receptores KIR totales (a), receptores KIR inhibidores (b) y receptores KIR activadores (c). Fig. d-e) Frecuencias y porcentajes de pacientes en función del número de de interacciones entre los receptores KIR inhibidores (d) y KIR activadores (e) y sus ligandos HLA presentes simultáneamente en cada paciente.

1.2.3. Desarrollo de infecciones

Se desarrolló algún tipo de infección en 51 (53.7%) de los 95 pacientes incluidos en el estudio, lo que supuso un total de 85 eventos infecciosos. De estos, 59 (69.4%) fueron bacterianos, 23 (27.1%) víricos y sólo 3 (3.5%) fueron fúngicos. Sobre los 51 pacientes con infección se presentaron entre 1 y 5 infecciones repetidas en cada uno, entre 1 y 4 de tipo bacteriana y entre 1 y 2 infecciones las de origen vírico. La Tabla 20 describe los tipos de infección observados en el estudio.

De forma paralela 43 pacientes (45.3%) presentaron viremia silente por CMV. En estos se contabilizaron hasta 96 episodios de viremia, repitiéndose en cada uno de ellos entre 1 y 8 episodios (1 episodio: 51.3%; 2 episodios: 23.1%; 3 episodios: 7%; 4 episodios: 2.3%; 5 episodios: 7%; 6 episodios: 7%; 8 episodios: 2.3%).

Tabla 20. Tipos de infección observados en el estudio de pacientes incluidos en el estudio de receptores KIR

Tipo Infección	Nº Infecciones	Tipo Infección	Nº Infecciones
Bacteriemia G+	11 (12,9%)	Síndrome viral CMV	6 (7.1%)
Bacteriemia G-	13 (15,3%)	Hepatitis CMV	1 (1.2%)
Neumonía	3 (3.5%)	Esofagitis CMV	1 (1.2%)
Infección tracto respiratorio	1 (1.2%)	Neumonitis CMV	1 (1.2%)
Intraabdominal	13 (15.3%)	Otros virus (VHS, VHZ)	14 (16.5%)
Infección herida quirúrgica	5 (5.9%)	Aspergilosis pulmonar invasiva	2 (2.4%)
Cistitis	13 (15.3%)	Micosis Cutánea	1 (1.2%)

Infecciones más frecuentes en pacientes de trasplante hepático en el Hospital 12 de [240]

2. RELACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE TLR4, C3 Y EL REPERTORIO KIR Y SUPERVIVENCIA, RECHAZO Y RECIDIVA DE VHC

2.1. Análisis de los polimorfismos de TLR4 c.896A>G (TLR4-299) y c.1196C>T (TLR4-399) y del polimorfismo c.304G>C del factor C3 del complemento

2.1.1. Supervivencia de pacientes e injerto

Se obtuvieron datos relativos a los eventos clínicos en 499 pacientes para el estudio en TLR4 y de 476 para el factor C3 del complemento. Inicialmente analizamos la asociación

entre cada uno de los polimorfismos de TLR4 y C3 en la incidencia de éxitus así como en la pérdida del injerto (Tabla 21).

Tabla 21. Porcentaje de pacientes que desarrollaron el evento clínico considerado en función de los polimorfismos de TLR4 y C3

		Éxitus		Pérdida de injerto	
		%	p	%	p
TLR4-299	AA	7.5	0.75	6.8	0.88
	AG	5.5		7.3	
TLR4-399	CC	7.5	0.9	6.8	0.79
	CT	6.8		6.8	
Genotipo C3	C3SS	8.2	0.51	4.6	0.014
	C3FS	7.5		8.8	
	C3FF	2.7		16.7	
Presencia alelo C3F	No	8.2	0.55	4.6	0.026
	Si	6.6		10.3	

La tabla muestra los porcentajes de aquellos pacientes que fallecieron o perdieron el injerto para cada una de las comparaciones realizadas. La casilla sombreada en azul indica una mayor tasa significativa de pérdida del injerto en pacientes con el genotipo C3FF y portadores del alelo C3F ($p= 0.014$ y $p= 0.026$ respectivamente).

El análisis de supervivencia de receptores hepáticos en el primer año post-trasplante no reveló diferencias entre los pacientes AA y AG en TLR4-299 o entre los pacientes CC y CT en TLR4-399. Tampoco hubo diferencias entre la supervivencia de pacientes clasificados de acuerdo al genotipo de C3 (SS, FS o FF) o a la presencia del alelo C3F del factor C3 del complemento (Fig. 25).

No se observaron diferencias de supervivencia del injerto en relación a los polimorfismos de TLR4. Sin embargo en el caso de C3, los injertos de los pacientes homocigotos para C3FF y de los portadores del alelo C3F presentaron una supervivencia estadísticamente inferior al resto de los genotipos (Fig. 26).

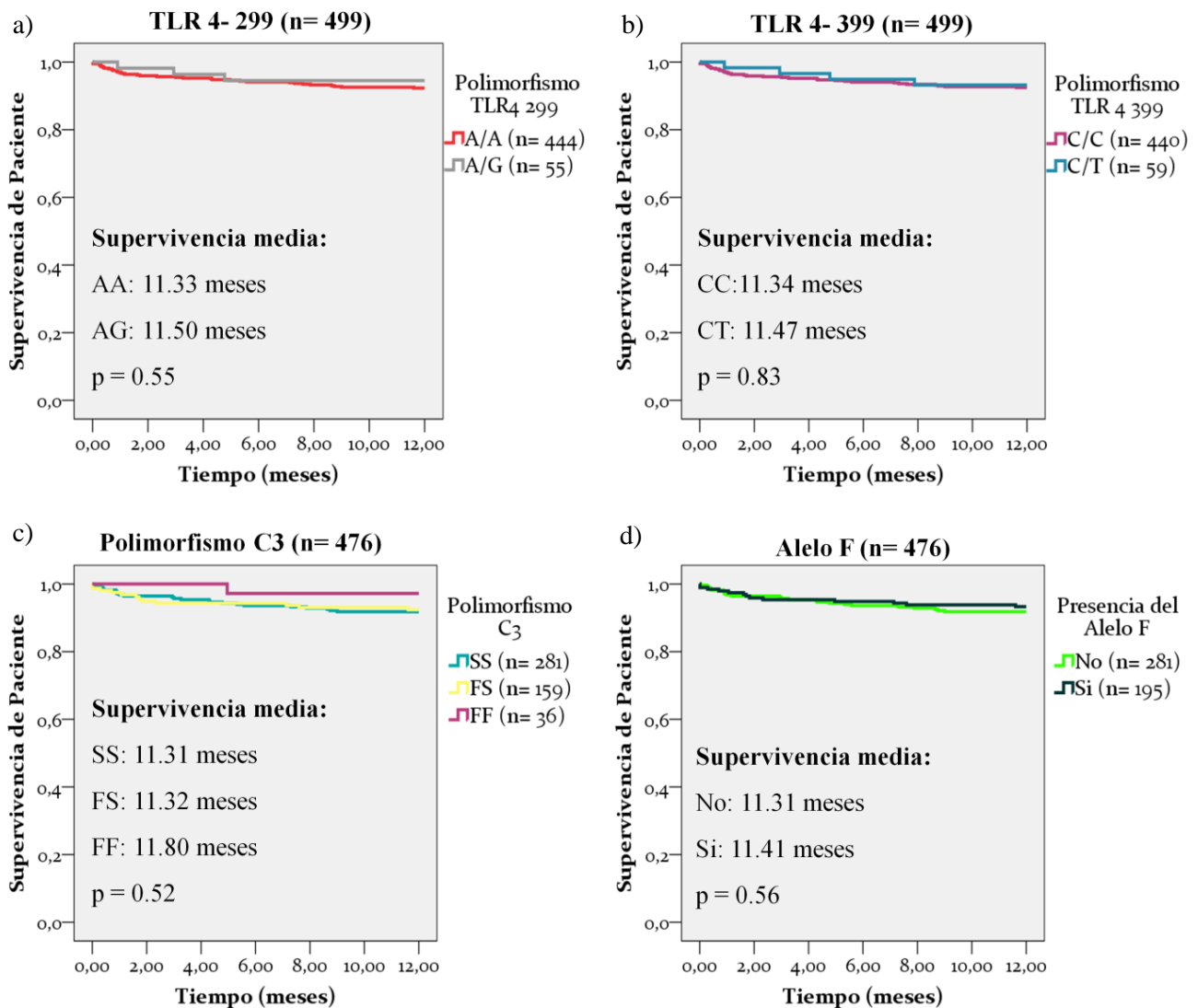


Figura 25. Supervivencia del paciente en función de los polimorfismos TLR4 y C3. El gráfico muestra los tiempos de supervivencia del paciente y el valor p obtenido del test logrank, para los polimorfismos TLR4-299 (a), TLR4-399 (b), la comparación por genotipos del factor C3 (c) y la comparación por ausencia/presencia del alelo C3F (d).

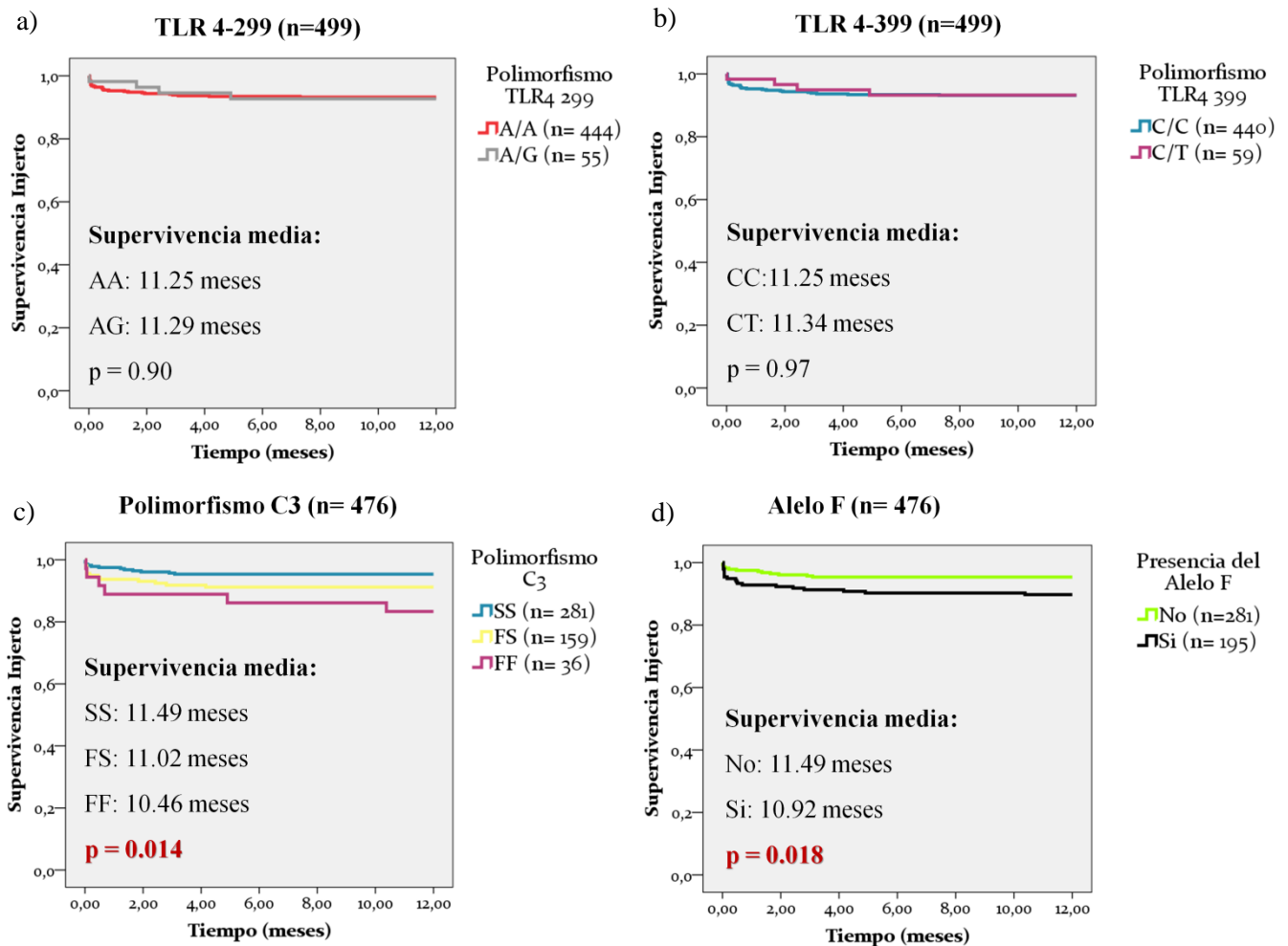


Figura 26. Supervivencia del injerto en función de los polimorfismos TLR4 y C3. El gráfico muestra los tiempos de supervivencia del injerto y el valor p obtenido del test logrank, para los polimorfismos TLR4-299 (a), TLR4-399 (b), la comparación por genotipos del factor C3 (c) y la comparación por ausencia/presencia del alelo C3F (d). La supervivencia del injerto fue estadísticamente inferior en pacientes homocigotos para C3FF ($p = 0.014$) y portadores del alelo C3F ($p = 0.018$).

2.1.2. Rechazo del injerto

Inicialmente se estudió si la presencia de alguno de los polimorfismos actuaba como factor de predisposición para el rechazo del injerto durante el año de seguimiento. No se observó relación alguna entre la presencia de los polimorfismos de TLR4 ($n=484$) y el desarrollo de rechazo del injerto (TLR4-299 $p = 0.25$; TLR4-399 $p = 0.78$). No obstante, para el factor C3 del complemento ($n=462$) tanto los pacientes homocigotos C3FF como los

pacientes portadores del alelo C3F desarrollaron significativamente menor rechazo (genotipos C3 p= 0.0037; alelo C3F p= 0.033) (Fig. 27).

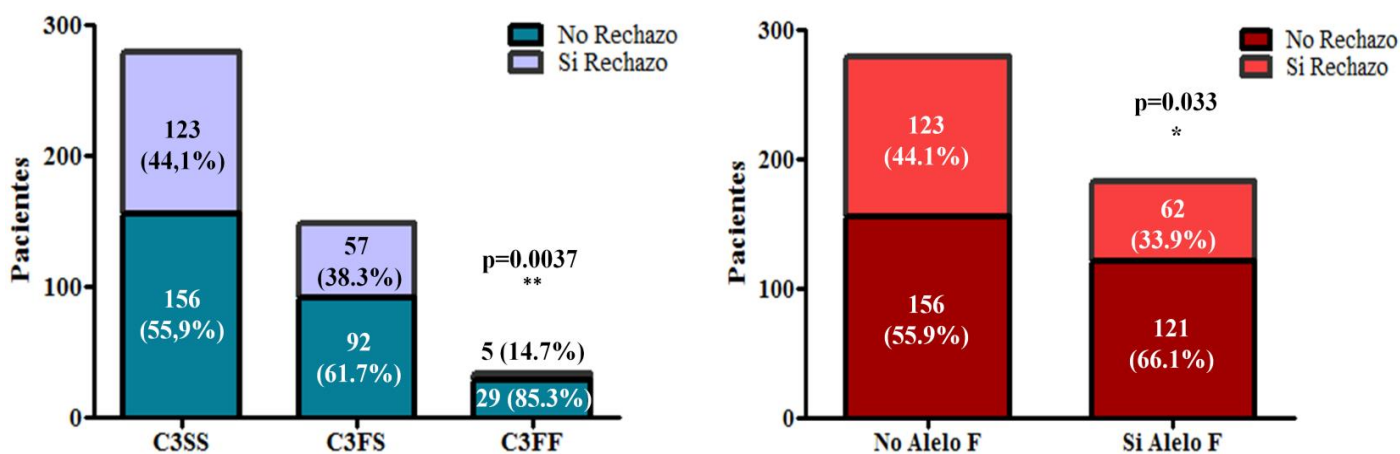


Figura 27. Incidencia del rechazo del injerto para los genotipos de C3. (*p<0.05; **p<0.005). El gráfico a) muestra para cada uno de los genotipos posibles de C3, la comparación entre el número de pacientes que desarrollaron rechazo del injerto frente a los que no lo presentaron. El gráfico b) muestra la misma comparación para la presencia/ausencia del alelo C3F. Tanto el genotipo C3FF (p= 0.0037) como la presencia del alelo C3F (p= 0.033) ejercieron un efecto protector frente al rechazo del injerto.

El análisis del tiempo medio libre transcurrido hasta el desarrollo de rechazo del injerto, confirmó los resultados previos obtenidos en la comparación de la incidencia de rechazo en función de los polimorfismos. Ambas variantes de TLR4 no observamos diferencias en el tiempo medio libre de rechazo del injerto (TLR4-299 p=0.22; TLR4-399 p=0.80) (Fig. 28 a) y b)). Sin embargo para la comparación por genotipos de C3, de nuevo identificamos el efecto protector de la homocigosis para C3F frente al rechazo del injerto, ya que los pacientes con este genotipo presentaron significativamente el mayor tiempo libre de rechazo del injerto en comparación con los restantes grupos (p=0.005). Estos resultados se mantuvieron significativos en el correspondiente análisis de la presencia/ausencia del alelo C3F (p=0.019) (Fig. 28 c) y d)).

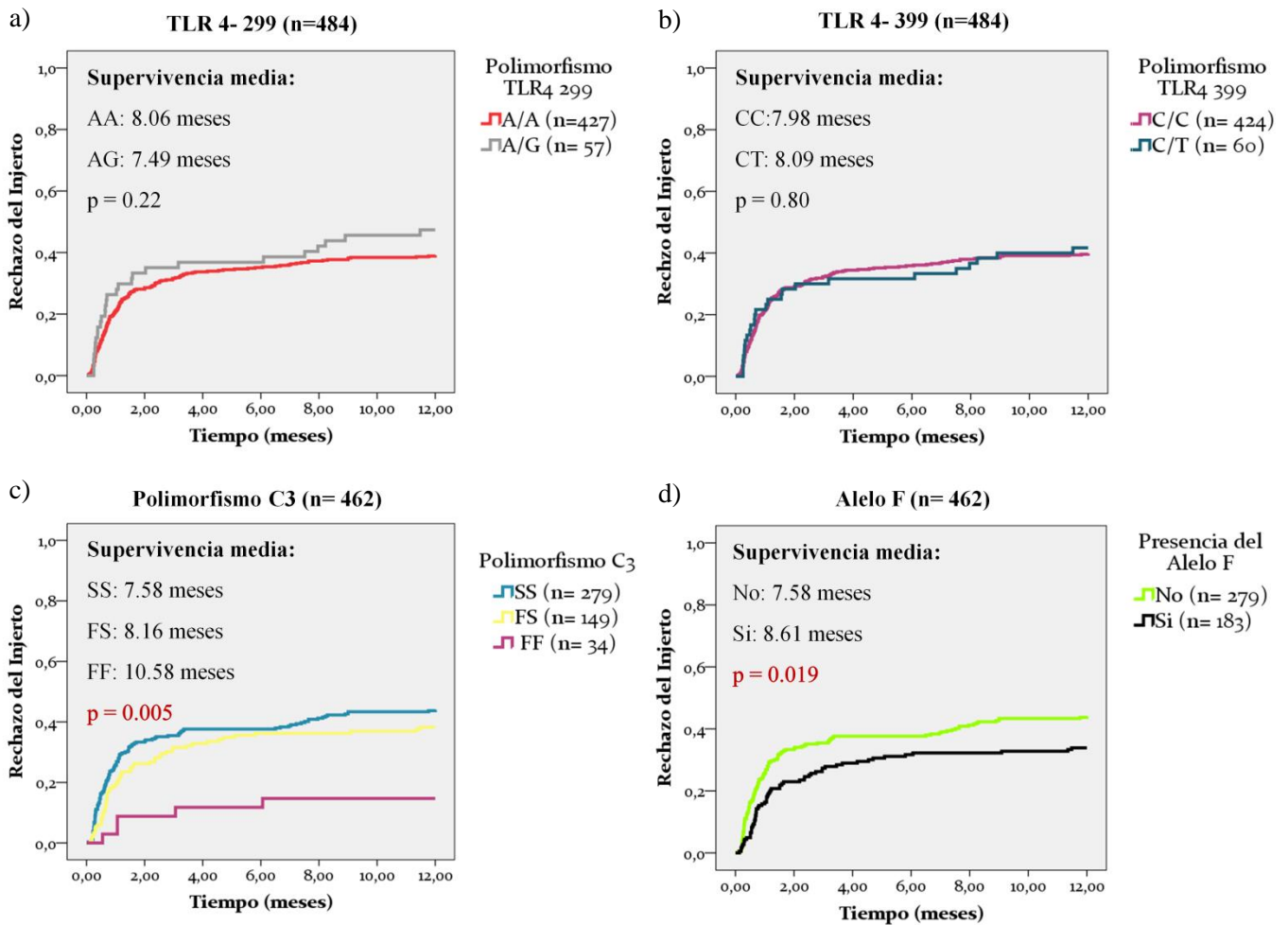


Figura 28. Tiempo libre de rechazo del injerto. El gráfico muestra los tiempos transcurridos hasta el desarrollo de rechazo del injerto y el valor p obtenido del test logrank, para los polimorfismos TLR4-299 (a), TLR4-399 (b), la comparación por genotipos del factor C3 (c) y la comparación por ausencia/presencia del alelo C3F (d). El rechazo del injerto apareció de forma estadísticamente más tardía en pacientes homocigotos para C3FF ($p= 0.005$) y portadores del alelo C3F ($p= 0.019$).

Finalmente se analizó el efecto de los polimorfismos sobre el número de eventos de rechazo (entre 1 y 4), identificados en los pacientes. No se observaron diferencias en el número de rechazos cuando se compararon los polimorfismos de TLR4 y C3 y la incidencia de 1, 2, 3 ó 4 eventos de rechazo agudo ($p= 0.32$ para TLR4-299; $p= 0.24$ para TLR4-399; $p= 0.93$ para C3; $p= 0.70$ para alelo C3F).

Para hacer los grupos más homogéneos se distribuyeron de nuevo los pacientes en función de si presentaron más de uno o más de 2 eventos y se analizó el efecto de los polimorfismos. No se observaron asociaciones entre ninguno de los polimorfismos con el desarrollo de más de 1 evento ($p= 0.61$ para TLR4-299; $p= 0.65$ para TLR4-399; $p= 0.71$ para

C3; $p=0.44$ para alelo C3F), o el desarrollo de más de 2 eventos ($p=0.91$ para TLR4-299; $p=0.82$ para TLR4-399; $p=0.78$ para C3; $p=0.55$ para alelo C3F).

2.1.3. Efecto de los polimorfismos de TLR4 y C3 en pacientes trasplantados por VHC

De un total de 247 pacientes trasplantados por VHC, 158 (63.9%) desarrollaron recidiva en el primer año post-trasplante. La comparación de la incidencia de recidiva VHC en función de los polimorfismos (238 pacientes para TLR4-299 y 399; 228 pacientes para C3) mostró que ninguno de los mismos influía en el desarrollo de la misma ($p=0.84$ para TLR4-299; $p=0.99$ para TLR4-399; $p=0.47$ para C3; $p=0.89$ para alelo C3F).

No se observaron diferencias cuando se analizó la influencia de los polimorfismos de TLR4 y C3 en la supervivencia del paciente, pérdida del injerto y rechazo del injerto para esta cohorte de pacientes trasplantados a causa de infección por VHC. Sin embargo sí que observamos una tendencia a una mayor incidencia de rechazo del injerto en los pacientes portadores en heterocigosis del polimorfismo TLR4-299 (Tabla 22).

Tabla 22. Pacientes trasplantados a causa de cirrosis por VHC (n=247) que desarrollaron el evento clínico considerado en función de los polimorfismos de TLR4 y C3

		Éxito		Pérdida de injerto		Rechazo del injerto	
		%	p	%	p	%	p
TLR4-299	AA	8.7	0.94	5.3	0.37	29	0.09
	AG	6.5		0		45.2	
TLR4-399	CC	8.7	0.89	5.3	0.36	29.6	0.22
	CT	6.3		0		40.6	
Genotipo C3	C3SS	8.5	0.79	3.1	0.35	30.2	0.62
	C3FS	10		7.5		35.2	
	C3FF	5.3		5.3		21.1	
Presencia alelo C3F	No	8.5	0.99	3.1	0.28	30.2	0.99
	Si	9.1		7.1		30.3	

La tabla muestra los porcentajes de aquellos pacientes trasplantados por VHC que fallecieron, perdieron o rechazaron el injerto para cada una de las comparaciones realizadas. La casilla sombreada en azul indica una tendencia no significativa a una incidencia superior de rechazo del injerto en pacientes heterocigotos para el polimorfismo TLR4-299.

2.1.4. Análisis univariable y multivariable

Se realizó un análisis de asociación univariable y multivariable para cada uno de los eventos: éxito, pérdida del injerto y rechazo. En todos los análisis univariados se incluyeron las siguientes variables: sexo, genotipo de TLR4-299, genotipo de TLR4-399, genotipo de C3, presencia de alelo C3F, edad en el momento del trasplante (mayor de 18 años), compatibilidad de seroestatus CMV donante-receptor, donante vivo o cadáver, donante en muerte encefálica o asistólica, terapia inmunosupresora en diferentes combinaciones e infección de base por VHC. Aquellas variables con un valor $p \leq 0.25$ en el análisis univariable se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

2.1.4.a. Supervivencia de pacientes

En el análisis univariable la inmunosupresión constituida por otras combinaciones terapéuticas diferentes a la clásica (tacrólimus y esteroides) supuso mayor riesgo de fallecimiento de los pacientes.

Tanto la administración de diversas combinaciones terapéuticas como la presencia de enfermedad de base causada por infección por VHC que quedó cercana a la significación estadística se incluyeron en el análisis multivariable. Únicamente la inmunosupresión constituida por otras combinaciones terapéuticas supuso un factor de riesgo frente a la inmunosupresión clásica, manteniendo su significación estadística y mostrándose como independiente frente al resto de factores incluidos en el estudio (OR: 4.72; IC 95%: 1.90-11.76; $p= 0.001$) (Tabla 23).

Tabla 23. Análisis univariable y multivariable para el evento éxito

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Mujer vs Varón	0.77	0.90	0.44-1.83			
TLR4-299 A/G vs AA	0.56	0.69	0.21-2.35			
TLR4-399 C/T vs CC	0.84	0.89	0.30-2.63			
C3FF vs C3SS	0.27	0.32	0.04-2.48			
Si alelo C3 F vs No alelo C3 F	0.54	0.80	0.39-1.63			
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.41	0.43	0.06-3.23			
Mismatch CMV (R-/D+)	0.55	1.58	0.35-7.12			
Dte Vivo vs Cadáver	0.53	0.52	0.07-4.01			
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.52	0.62	0.14-2.66			
Otras terapias vs T+E	0.002	4.21	1.72-10.3	0.001	4.72	1.90-11.76
Infección VHC	0.24	1.48	0.77-2.86	0.07	2.0	0.94-4.27

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con $p < 0.25$ que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. Otras terapias incluyeron: T+E+MMF, CsA+E+MMF, CsA+E, Basiliximab/anti-CD3+CsA+E+MMF.

2.1.4.b. Pérdida del injerto

El análisis univariable mostró que el genotipo C3FF confiere mayor riesgo para la pérdida del injerto en comparación con el genotipo C3SS. Esta asociación se incluyó en el análisis multivariable junto con las variables con un valor $p < 0.25$, presencia del alelo C3F, donación en asistolia frente a encefálica, la triple terapia inmunosupresora en comparación con la doble y la infección por VHC como causa del trasplante.

Los resultados del análisis multivariable mostraron que la presencia del genotipo C3FF ejerció un efecto promotor de la pérdida del injerto significativo e independiente de las restantes variables en comparación con el genotipo C3SS (OR: 2.38; IC 95%: 1.29-4.38; $p = 0.005$). La presencia del alelo C3F se mostró en el multivariable como factor promotor de la pérdida del injerto de forma significativa e independiente del resto de variables (OR: 2.66; IC 95%: 1.17-6.08; $p = 0.02$) (Tabla 24).

Tabla 24. Análisis univariable y multivariable de la pérdida del injerto

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Mujer vs Varón	0.68	0.86	0.42-1.76			
TLR4-299 A/G vs AA	0.96	0.97	0.33-2.87			
TLR4-399 C/T vs CC	0.74	1.18	0.44-3.16			
C3FF vs C3SS	0.02	3.31	1.21-9.11	0.005	2.38	1.29-4.38
Si aleloC3F vs No aleloC3F	0.068	1.89	0.95-3.75	0.02	2.66	1.17-6.08
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.51	1.51	0.43-5.23			
Mismatch CMV (R-/D+)	0.53	1.63	0.367.34			
Dte Vivo vs Cadáver	0.84	1.17	0.26-5.16			
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.18	1.97	0.72-5.48	0.26	2.54	0.49-12.91
Triple terapia vs doble	0.10	1.97	0.87-4.43	0.31	2.03	0.51-8.07
Infección VHC	0.053	0.48	0.23-1.01	0.07	0.32	0.96-1.08

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con $p < 0.25$ que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. La triple terapia incluyó T+E+MMF o CsA+E+MMF; La doble terapia consistió en T+E o CsA+E.

2.1.4.c. Rechazo del injerto

El genotipo C3FF apareció como factor protector frente al rechazo del injerto en comparación con los genotipos homocigotos C3SS. Esta variable se incluyó en el multivariable junto con las variables con un valor $p < 0.25$, presencia del alelo C3F, donante vivo frente a cadáver y terapia triple frente a la doble. En el análisis multivariable C3FF se mantuvo como factor protector del rechazo de forma independiente (OR: 0.54; IC 95%: 0.31-0.93; $p = 0.028$). La presencia del alelo C3F se presentó también como variable significativa e independiente con este efecto protector (OR: 0.63; IC 95%: 0.40-0.99; $p = 0.047$) mientras que la administración de triple terapia inmunosupresora alcanzó la independencia como factor de riesgo para el desarrollo de rechazo del injerto (OR: 1.84; IC 95%: 1.04-3.25; $p = 0.03$) (Tabla 25).

Tabla 25. Análisis univariable y multivariable para el rechazo del injerto

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Mujer vs Varón	0.71	0.92	0.61-1.39			
TLR4-299 A/G vs AA	0.38	1.30	0.72-2.35			
TLR4-399 C/T vs CC	0.91	0.96	0.53-1.76			
C3FF vs C3SS	0.015	0.26	0.09-0.77	0.028	0.54	0.31-0.93
Si aleloC3F vs No aleloC3F	0.08	0.69	0.46-1.05	0.047	0.63	0.40-0.99
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.81	0.90	0.39-2.09			
Mismatch CMV (R-/D+)	0.71	1.20	0.44-3.26			
Dte Vivo vs Cadáver	0.16	0.46	0.15-1.38	0.16	0.39	0.10-1.45
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.48	1.27	0.65-2.51			
Triple terapia vs doble	0.08	1.58	0.94-2.65	0.03	1.84	1.04-3.25
Infección VHC	0.54	1.12	0.77-1.64			

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con $p < 0.25$ que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. La triple terapia incluyó T+E+MMF o CsA+E+MMF; La doble terapia consistió en T+E o CsA+E.

2.2. Papel de KIR y sus ligandos en supervivencia y rechazo

2.2.1. Influencia de haplotipos HLA-C, HLA-Bw4 y KIR del receptor en el desarrollo del evento clínico

En este estudio se incluyó una cohorte de 95 pacientes receptores hepáticos. Sobre estos, 62 pacientes (65.3%) presentaron el alelo serológico Bw4 y 33 (34.7%) se clasificaron como Bw4-. En relación a las moléculas HLA-C, 35 (36.8%) pacientes se clasificaron en el grupo HLA-C1C1, 20 (21.1%) en el grupo HLA-C2C2 y 40 pacientes (42.1%) como HLA-C1C2. En la distribución por haplotipos KIR 10 (10.5%) pacientes presentaron los haplotipos AA y 85 (89.5%) los haplotipos Bx.

No se observaron diferencias significativas en la incidencia de éxitos, pérdida del injerto y rechazo del mismo entre los grupos de pacientes mencionados en el párrafo anterior durante los 12 meses post-trasplante ($n=95$). No obstante, se observó una tendencia de una mayor tasa de rechazo del injerto en los pacientes que no portaban el alelo serológico Bw4 ($p= 0.09$). Cuando se observaron los tiempos transcurridos desde el trasplante hasta que se desarrolló el

rechazo en cada uno de los grupos de Bw4, se detectó que la diferencia entre Bw4+ y Bw4- aparecía tras el primer mes post-trasplante, cuando disminuye el efecto del procedimiento quirúrgico sobre paciente e injerto trasplantado, emergiendo los factores de carácter inmunológico. Al repetir el análisis sólo con los rechazos del injerto producidos a partir del segundo mes post-trasplante (n=77), la asociación en el límite de la significación de Bw4 como protector frente al rechazo del injerto, adquirió significación estadística relevante mostrándose una mayor incidencia de rechazo del injerto en los pacientes no portadores del alelo Bw4 (Tabla 26).

Tabla 26. Porcentaje de pacientes que desarrollaron el evento clínico considerado en función de las moléculas HLA-C, HLA-B y los haplotipos KIR

		Éxitus		Pérdida de injerto		Rechazo del injerto		Rechazo del injerto desde el 2º mes post-Tx	
		%	p	%	p	%	p	%	p
HLA-C	C1C1	5.7	0.74	11.4	0.58	31.4	0.87	11.1	0.99
	C2C2	10		10		25		11.8	
	C1C2	5		5		72.5		12.1	
HLA-Bw4	Bw4+	8.1	0.6	8.1	0.82	22.6	0.09	2	0.001
	Bw4-	3		9.1		39.4		28.6	
Haplotipos KIR	AA	10	0.85	10	0.68	30	0.79	12.5	0.61
	Bx	5.9		8.2		28.2		11.6	

La tabla muestra los porcentajes de aquellos pacientes que fallecieron, perdieron o rechazaron el injerto para cada una de las comparaciones realizadas. La casilla sombreada en azul muestra como la ausencia del alelo Bw4, se presentó como factor promotor significativo del rechazo del injerto a partir del segundo mes post-trasplante.

En los correspondientes análisis de supervivencia incluyendo el periodo completo de seguimiento post-trasplante, no se observaron diferencias en el tiempo medio de fallecimiento de los pacientes, en la supervivencia del injerto, ni en el rechazo del injerto entre los pacientes agrupados de acuerdo a los haplotipos HLA-C, HLA-B y los haplotipos KIR (Fig. 29 a-c). Sin embargo, el análisis del tiempo medio libre de rechazo a partir del segundo mes post-trasplante (n=77), confirmó las diferencias observadas en el análisis de asociación previo respecto al tiempo libre de rechazo para los grupos Bw4+ y Bw4-, mostrando un tiempo libre de rechazo estadísticamente superior en pacientes portadores del alelo serológico Bw4 (11.86

meses) en comparación con los pacientes no portadores del mismo (9.67 meses) ($p= 0.0004$) (Fig. 29 d).

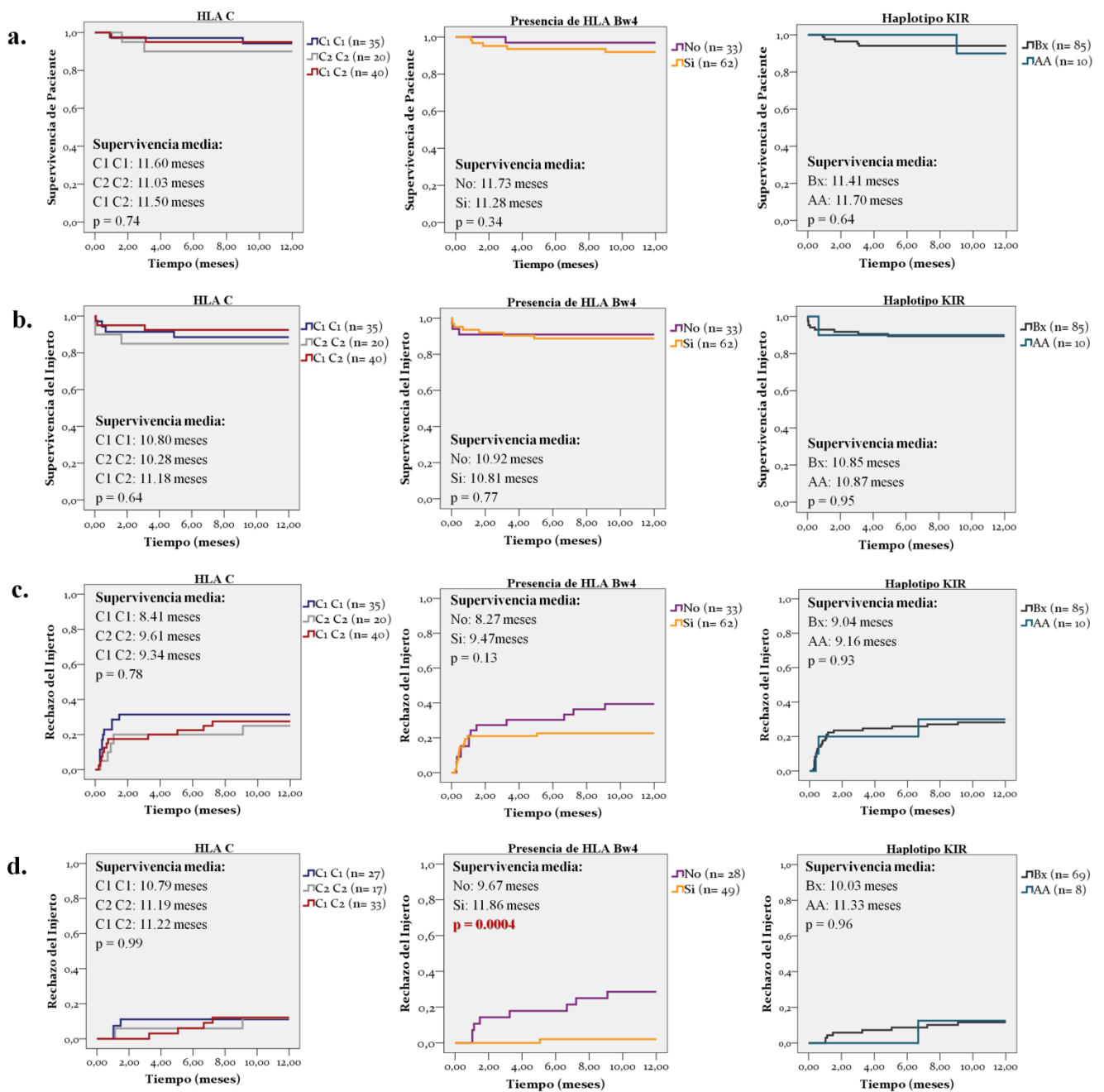


Figura 29. Tiempo libre de los diferentes eventos estudiados en función de las moléculas HLA-C, alelo serológico Bw4 y haplotipos KIR. a) Supervivencia de pacientes; b) Supervivencia del injerto; c) Rechazo del injerto; d) Rechazo del injerto desde el segundo mes. En cada gráfico se muestra la supervivencia de cada grupo y el valor p obtenido del test logrank.

2.2.2. Influencia del número de receptores KIR e interacciones KIR-HLA en el desarrollo del evento clínico

La distribución de pacientes de acuerdo al número de receptores KIR totales, de receptores aKIR e iKIR y de las interacciones HLA-KIR activadoras e inhibidoras se muestra en la figura 24.

Para averiguar si existía alguna relación entre ellos y la supervivencia de pacientes, supervivencia del injerto y rechazo del injerto en los 12 meses post-trasplante y a partir del segundo mes, se compararon los números medios de receptores e interacciones entre los pacientes que sufrieron el evento y los que no lo sufrieron. Los resultados quedan resumidos en la Tabla 27. Los pacientes que desarrollaron rechazo del injerto desde el segundo mes, presentaron significativamente un mayor número medio de receptores (valor medio 9.11 receptores) respecto a los que no desarrollaron rechazo (valor medio 7.76 receptores) ($p=0.03$).

Tabla 27. Relación entre el número de receptores KIR e interacciones KIR-HLA en el desarrollo de eventos

		Total KIR [5-13]		aKIR [0-6]		iKIR [3-8]		aKIR-HLA [1-4]		iKIR-HLA [0-6]	
		Media	p	Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Éxitus	Si (n= 6)	7.50	0.53	2.00	0.48	5.17	0.54	0.50	0.17	2.17	0.65
	No (n= 89)	7.96		2.42		5.40		0.92		2.43	
Pérdida injerto	Si (n= 8)	7.38	0.35	2.25	0.77	5.13	0.39	1.13	0.36	2.13	0.54
	No (n= 87)	7.98		2.40		5.41		0.87		2.44	
Rechazo	Si (n= 27)	8.33	0.15	2.56	0.47	5.56	0.26	0.81	0.51	2.26	0.49
	No (n= 68)	7.76		2.32		5.32		0.93		2.47	
Rechazo tras 2º mes	Si (n= 9)	9.11	0.03	3.11	0.13	5.78	0.15	1.00	0.78	2.00	0.32
	No (n= 68)	7.76		2.32		5.32		0.93		2.47	

La tabla muestra el número medio (columna “media”) de receptores KIR totales, aKIR, i KIR e interacciones entre los receptores aKIR e iKIR con sus respectivos ligandos HLA para cada evento estudiado. Entre corchetes se muestra rango de receptores/interacciones posibles. Entre paréntesis se indica el número de pacientes incluidos. Los pacientes

que desarrollaron rechazo del injerto desde el segundo mes post-trasplante presentaron significativamente mayor número de receptores KIR totales ($p= 0.03$) tal y como se indica en la casilla sombreada en azul.

Debido a la gran variedad en el número de receptores KIR por individuo, se decidió agrupar los pacientes de acuerdo a que su número de KIR estuviera por encima o debajo de cierto nivel. Para establecer dicho nivel se consideró la relación biológica entre el número de KIR por haplotipo y el perfil más activador o inhibidor de las células NK, tal y como se ha explicado en la introducción y como se recuerda a continuación.

Con respecto al número total de KIR, los pacientes se agruparon en aquellos con 9 o más de 9 y con menos de 9, ya que los individuos con menos de 9 receptores se corresponden, probablemente, con los que presentan haplotipos AA y son por tanto de carácter más inhibidor, mientras que los individuos con más de 9 receptores KIR se corresponden más probablemente con genotipos Bx, de carácter más activador [181]. Del mismo modo, ya que los haplotipos AA sólo pueden poseer hasta dos aKIR, la presencia de un número de receptores aKIR igual o mayor de 3, y menos de 3 podría corresponderse con individuos Bx y AA respectivamente. En relación a los iKIR en ambos haplotipos pueden presentarse hasta 6iKIR. Tal y como ha sido descrito en la literatura, son los haplotipos AA en los que predominan un mayor número de receptores inhibidores [173], y dado que en nuestra cohorte identificamos la mayor frecuencia de receptores iKIR entre 5 y 6 (Figura 24), se seleccionó como punto de corte la presencia de 5 o más de 5iKIR y menos de 5iKIR. En cuanto a las interacciones entre los receptores KIR y sus ligandos HLA, para identificar la existencia de una capacidad funcional activadora de las células NK, se clasificaron los pacientes en función de si presentaron al menos una interacción aKIR-HLA frente a los pacientes que no presentaban ninguna. Finalmente en caso de las interacciones inhibidoras, ya que ha sido descrita para la población caucásica la presencia de al menos 2 o 3 interacciones inhibidoras iKIR-HLA [181-183], se seleccionó como punto de corte para la distribución de los pacientes la presencia de al menos 4 o más interacciones iKIR-HLA, que representarían poblaciones de NK muy inhibitorias o menos de 4, que representarían un estado inhibitorio inferior más frecuentemente descrito en la población general.

No se observó ninguna diferencia entre los grupos asignados en cuanto al desarrollo de éxito, pérdida del injerto, rechazo del injerto durante los 12 meses de seguimiento ($n=95$ para

todos ellos), ni tampoco en el caso de rechazo del injerto desde el segundo mes post-trasplante (n=77). Los resultados de estos análisis quedan resumidos en la Tabla 28.

Tabla 28. Porcentaje de pacientes que desarrollaron el evento clínico considerado en función de los receptores KIR e interacciones KIR-HLA agrupadas

		Éxito		Pérdida de injerto		Rechazo del injerto		Rechazo del injerto desde el 2º mes post-Tx	
		%	p	%	p	%	p	%	p
KIR Totales	< 9	6.9	0.88	5.4	0.64	25.9	0.49	8.5	0.47
	≥ 9	5.4		5.4		34.2		16.7	
aKIR	< 3	7.4	0.93	9.3	0.97	25.9	0.64	7	0.27
	≥ 3	4.9		7.3		31.7		17.6	
iKIR	< 5	16.7	0.34	8.3	0.58	16.7	0.53	0	0.48
	≥ 5	4.8		8.4		30.1		13.4	
aKIR-HLA	Ninguno	10	0.58	3.3	0.41	30	0.81	4.5	0.43
	≥ 1	4.6		10.8		27.7		14.5	
iKIR-HLA	< 4	6.7	0.80	8	0.86	29.3	0.78	13.1	0.74
	≥ 4	5		10		25		6.3	

La tabla muestra los porcentajes de aquellos pacientes que fallecieron, perdieron o rechazaron el injerto para cada una de las comparaciones realizadas.

El siguiente paso en el estudio consistió en la comparación de la supervivencia según el número de receptores KIR totales, aKIR, iKIR e interacciones aKIR-HLA e iKIR-HLA. Los resultados no fueron concluyentes debido a la gran variedad de número de receptores y los valores de muestra “n” tan diversos para cada tipo de receptor/interacción. Por esto se re-analizó la supervivencia empleando las agrupaciones descritas en el apartado anterior en cada uno de los eventos estudiados. Ni en la supervivencia de los pacientes ni del injerto, se observaron diferencias entre los grupos establecidos para receptores KIR totales, aKIR, iKIR, aKIR-HLA e iKIR-HLA (Figs. 30 y 31).

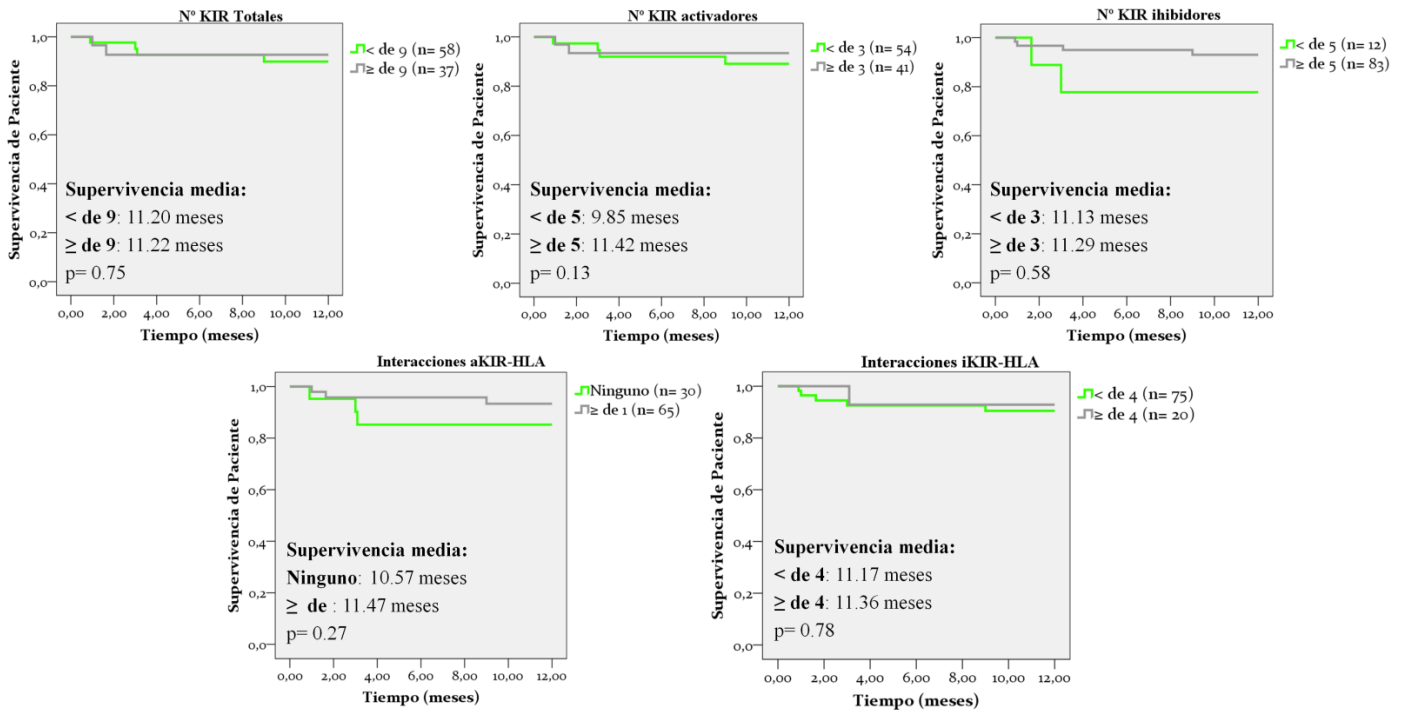


Figura 30. Supervivencia de los pacientes en función de la agrupación de los receptores KIR y las interacciones KIR-HLA. El gráfico muestra los valores de supervivencia de cada uno de los grupos y el valor p obtenido del test logrank.

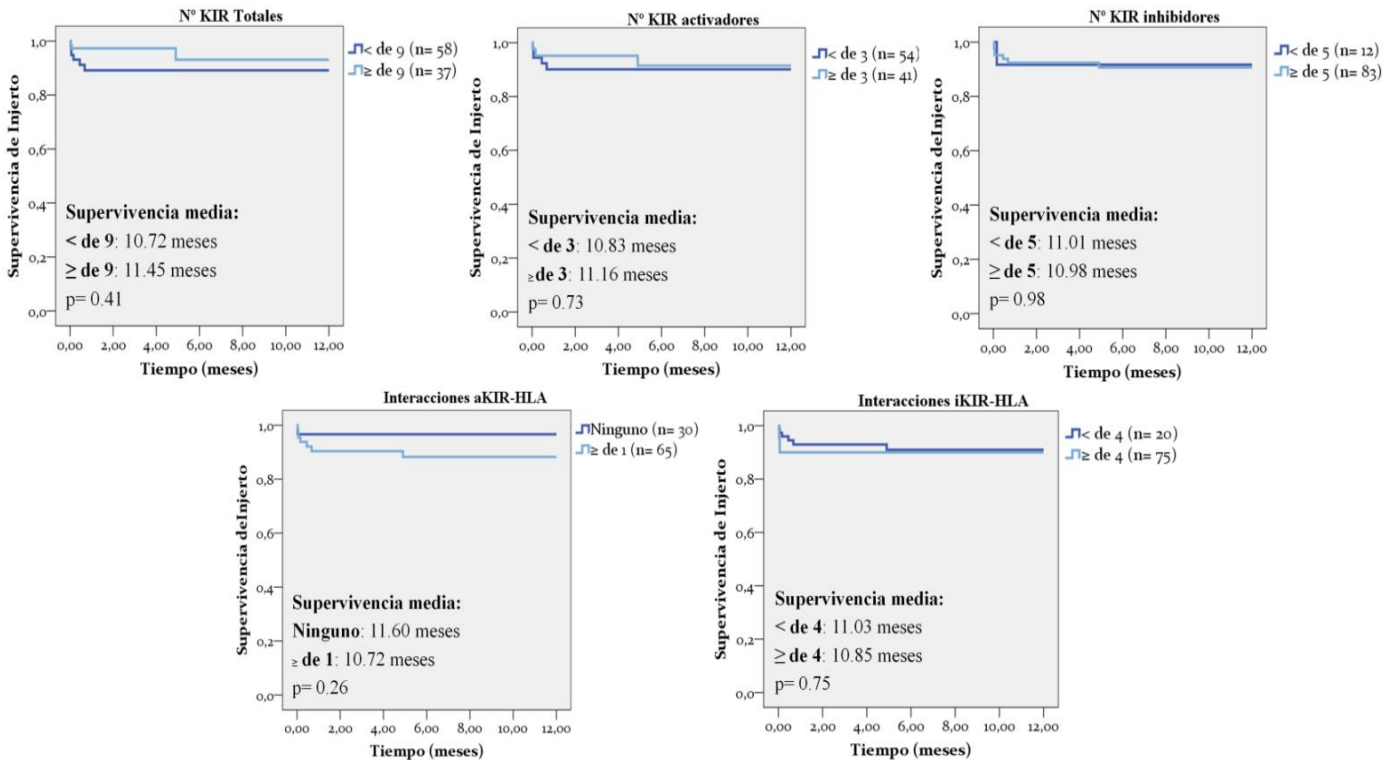


Figura 31. Supervivencia del injerto en función de la agrupación de los receptores KIR y las interacciones KIR-HLA. El gráfico muestra los valores de supervivencia de cada uno de los grupos y el valor p obtenido del test logrank.

El análisis del tiempo medio libre de rechazo del injerto durante el año de seguimiento y desde el segundo mes post-trasplante, se realizó sobre el número total de receptores e interacciones individuales obteniendo de nuevo de resultados no concluyentes debido a la gran variabilidad en receptores y del tamaño muestral. Por este motivo, se realizó el análisis sobre las agrupaciones de los receptores y de las interacciones previamente descritas. En el caso del tiempo medio libre de rechazo no se observaron diferencias entre los grupos (Fig. 32). En el análisis de rechazo del injerto desde el segundo mes post-trasplante, tampoco se observaron diferencias en el tiempo medio de aparición de rechazo para las agrupaciones de los receptores KIR e interacciones KIR-HLA (Fig. 33).

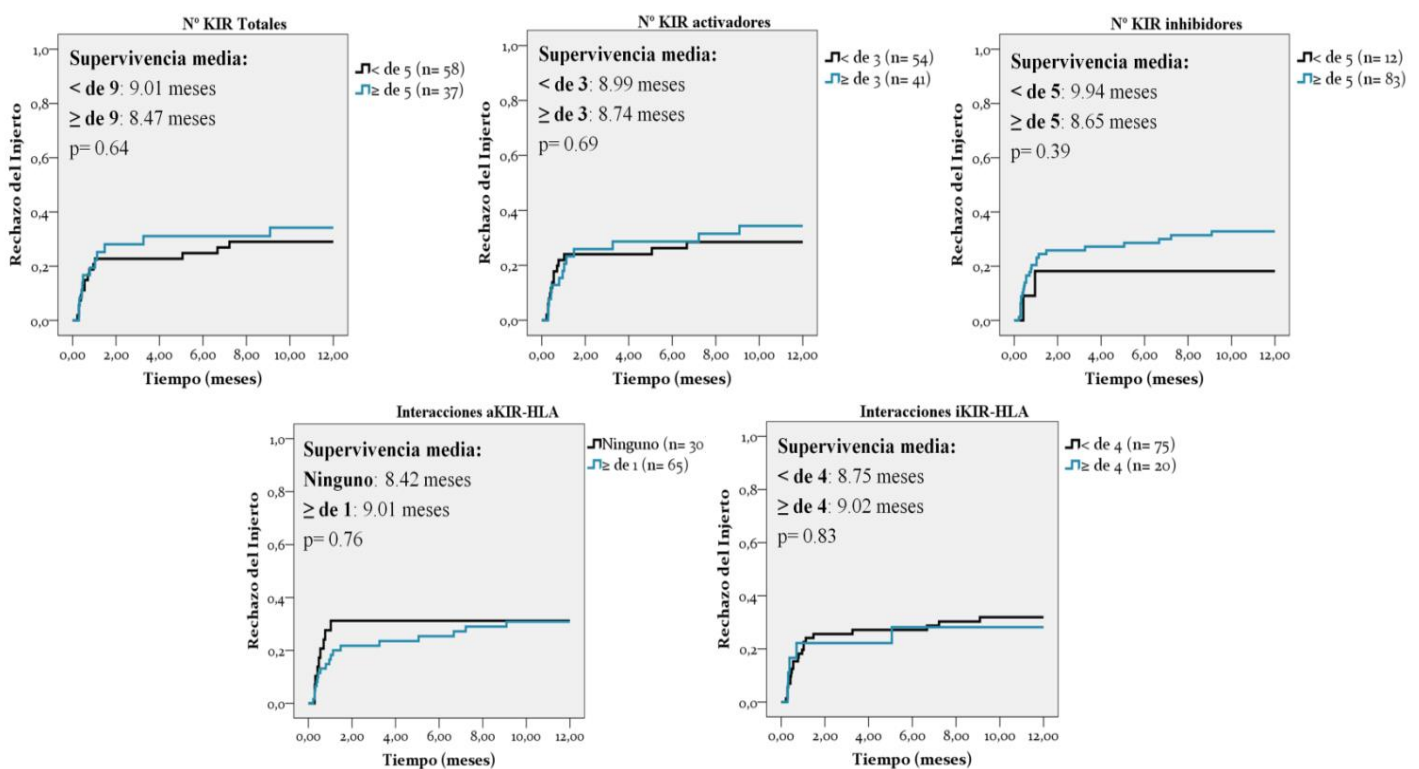


Figura 32. Supervivencia libre de rechazo del injerto en función de la agrupación de los receptores KIR y las interacciones KIR-HLA. El gráfico muestra los valores de supervivencia de cada uno de los grupos y el valor p obtenido del test logrank.

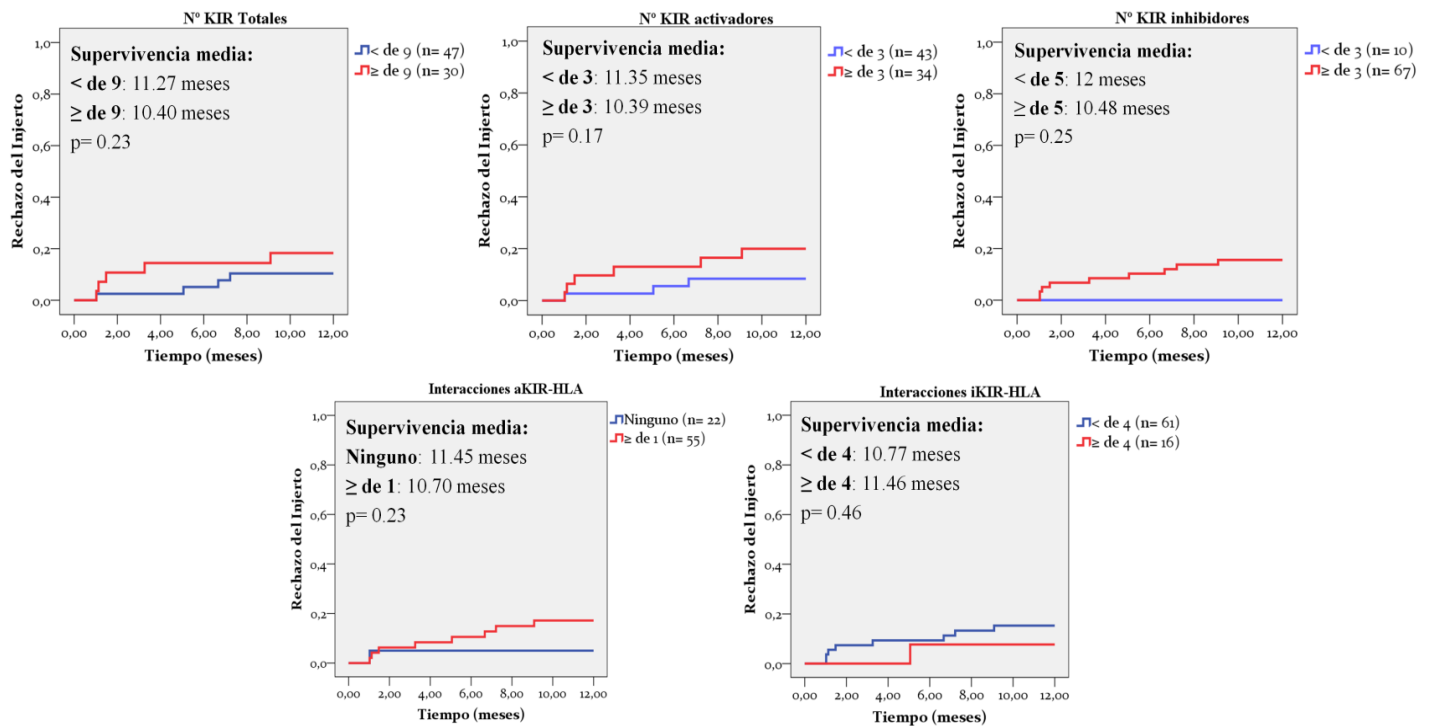


Figura 33. Supervivencia libre de rechazo del injerto desde el 2º mes post-trasplante en función de la agrupación de los receptores KIR y las interacciones KIR-HLA. El gráfico muestra los valores de supervivencia de cada uno de los grupos y el valor p obtenido del test logrank.

2.2.3. Efecto de KIR y sus ligandos en pacientes trasplantados por VHC

Sobre los 46 pacientes trasplantados por VHC, 31 (67.4%) desarrollaron recidiva. No se observaron diferencias en la incidencia de recidiva VHC, en el primer año, entre los grupos de pacientes clasificados de acuerdo a HLA-C ($p=0.87$), HLA-B ($p=0.52$), el número de receptores KIR totales (independientes $p=0.20$; agrupados $p=0.46$), el número de receptores aKIR (independientes $p=0.29$; agrupados $p=0.79$), número de iKIR (independientes $p=0.43$; agrupados $p=0.67$), interacciones aKIR-HLA (independientes $p=0.13$; agrupadas $p=0.76$) ni para las interacciones iKIR-HLA (independientes $p=0.85$; agrupadas $p=0.53$). Sin embargo sí se observó que los pacientes con haplotipos KIR Bx presentaron una incidencia de recidiva VHC estadísticamente superior a los portadores de los haplotipos AA (Bx 75.6% vs AA 0%; $p=0.004$).

No se observaron diferencias cuando se analizó la influencia en la supervivencia del paciente, pérdida del injerto y rechazo del injerto para esta cohorte de pacientes trasplantados a causa de infección por VHC, de las moléculas HLA-C, HLA-B y haplotipos KIR (Tabla 29), ni en el número medio de receptores KIR e interacciones KIR-HLA (Tabla 30).

Tabla 29. Porcentaje de pacientes trasplantados a causa de cirrosis por VHC que desarrollaron el evento clínico considerado en función de las moléculas HLA-C, HLA-B y haplotipos KIR

		Éxitus		Pérdida de injerto		Rechazo del injerto		Rechazo del injerto desde el 2° mes post Tx	
		%	p	%	p	%	p	%	p
HLA-C	C1C1	6.3		6.3		18.8		0	
	C2C2	0	0.79	0	0.79	42.9	0.47	20	0.22
	C1C2	4.3		4.3		30.4		20	
HLA-Bw4	Bw4+	7.7	0.59	3.8	0.99	23.1	0.51	4.8	0.22
	Bw4-	0		5		35		23.5	
Haplotipos KIR	AA	0	0.99	0	0.99	40	0.92	25	0.99
	Bx	4.9		4.9		26.8		11.8	

La tabla muestra los porcentajes de aquellos pacientes que fallecieron, perdieron o rechazaron el injerto para cada una de las comparaciones realizadas.

Tabla 30. Número medio de receptores KIR e interacciones KIR-HLA en los pacientes trasplantados a causa de cirrosis por VHC que desarrollaron el evento clínico considerado

		Total KIR [5-13]		aKIR [0-6]		iKIR [3-8]		aKIR-HLA [1-4]		iKIR-HLA [0-6]	
		Media	p	Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Éxitus	No (n=44)	7.91		2.43		5.34		1.02		2.55	
	Si (n= 2)	8	0.94	2	0.70	6	0.26	0.5	0.34	2.5	0.96
Pérdida injerto	No (n= 44)	7.95		2.45		5.36		1		2.55	
	Si (n= 2)	7	0.45	1.5	0.39	5.50	0.81	1	0.99	2.5	0.96
Rechazo	No (n= 33)	7.94		2.36		5.42		1.03		2.58	
	Si (n= 13)	7.85	0.87	2.54	0.73	5.23	0.46	0.92	0.67	2.46	0.79
Rechazo tras 2° mes	No (n= 30)	7.94		2.36		5.42		1.03		2.58	
	Si (n= 5)	8.60	0.46	3.20	0.29	5.40	0.95	1.20	0.65	3	0.48

La tabla muestra el número medio (columna “media”) de receptores KIR totales, aKIR, i KIR e interacciones entre los receptores aKIR e iKIR con sus respectivos ligandos HLA para cada evento estudiado. Entre corchetes se muestra rango de receptores/interacciones posibles. Entre paréntesis se indica el número de pacientes incluidos.

2.2.4. Análisis univariable y multivariable

Se realizó el correspondiente análisis univariable y multivariable para evaluar las variables que conferirían riesgo de éxitus, pérdida del injerto, rechazo del injerto y rechazo del injerto desde el segundo mes post-trasplante. En los análisis univariados se incluyeron sexo, haplotipos HLA (C1C1, C1C2 y C2C2), haplotipos KIR (AA y Bx), presencia/ausencia de Bw4, la agrupación correspondiente de receptores KIR (mayor o igual a 9 para KIR totales, mayor o igual a 3 aKIR y mayor o igual a 5 iKIR) e interacciones KIR-HLA (mayor o igual de 1 interacción aKIR-HLA y mayor o igual de 4 interacciones iKIR-HLA), edad (mayor de 18 años), compatibilidad de seroestatus CMV donante-receptor, donante vivo o cadáver, donante en muerte encefálica o asistólica, empleo de terapia profiláctica frente al virus CMV, terapia inmunosupresora en diferentes combinaciones y enfermedad de base por infección VHC. Aquellas variables con un valor $p \leq 0.35$ en el análisis univariable se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

Debido a la potente asociación observada entre el desarrollo de recidiva VHC y la presencia de los haplotipos KIR Bx, se realizó el análisis univariable para determinar el riesgo que implicaría la presencia de estos haplotipos en el desarrollo de recidiva. Los resultados obtenidos en este análisis no mostraron la existencia de una asociación significativa ($p=0.99$).

2.2.4.a. Supervivencia del paciente

El análisis univariable no mostró asociaciones significativas entre las variables y el desarrollo de éxitus. Para el análisis multivariable se incluyeron aquellas que se encontraron más cercanas al valor de significación: presencia de Bw4 como promotor de éxitus y la presencia de 5 o más receptores iKIR y 1 o más interacciones aKIR-HLA ambas con función protectora. En el análisis multivariable no se observó ninguna relación significativa en ninguna de las variables (Tabla 31).

Tabla 31. Análisis univariable y multivariable para la supervivencia del paciente

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Varón vs Mujer	0.52	2.06	0.23-18.53			
HLA C1C1 vs C1C2	0.89	1.15	0.15-8.63			
HLA C2C2 vs C1C2	0.47	2.11	0.27-16.21			
Haplotipo KIR AA vs Bx	0.61	1.78	0.18-16.95			
HLA Bw4+	0.35	2.81	0.31-25.09	0.45	2.35	0.25-21.89
≥9 KIR Totales	0.83	0.79	0.08-7.20			
≥ 3 aKIR	0.74	0.69	0.76-6.25			
≥ 5 iKIR	0.14	0.25	0.04-1.56	0.21	0.30	0.05-1.96
≥ 1 aKIR-HLA	0.32	0.43	0.08-2.29	0.53	0.57	0.10-3.25
≥ 4 iKIR-HLA	0.78	0.73	0.08-6.69			
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.99	-	-			
Mismatch CMV (R-/D+)	0.99	-	-			
Dte Vivo vs Cadáver	0.99	-	-			
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.99	-	-			
Profilaxis CMV	0.99	-	-			
Otras terapias vs T+E	0.65	0.67	0.12-3.86			
Infección VHC	0.45	0.51	0.09-2.94			

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con $p < 0.35$ que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. Otras terapias incluyeron: T+E+MMF, CsA+E+MMF, CsA+E, Basiliximab/anti-CD3+CsA+E+MMF.

2.2.4.b. Pérdida del injerto

En el análisis univariable no se observó ninguna asociación significativa. Se encontró cercana al límite de la significación la donación en asistolia respecto a la muerte encefálica como factor de riesgo para la pérdida de injerto.

Junto con ésta, se incluyeron aquellas cercanas al límite de significación en el análisis multivariable: HLA-C1C1 frente a HLA-C1C2, 1 o más interacciones aKIR-HLA, edad adulta frente a niños, donante vivo frente a cadáver, la terapia profiláctica frente a CMV, la administración de otros tratamientos inmunosupresores frente a la inmunosupresión con tacrólimus y esteroides y VHC como enfermedad de base. No se observaron asociaciones significativas en el análisis multivariable (Tabla 32).

Tabla 32. Análisis univariable y multivariable de la pérdida del injerto

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Varón vs Mujer	0.55	1.57	0.39-7.10			
HLA C1C1 vs C1C2	0.32	2.45	0.42-14.28	0.50	0.52	0.07-3.57
HLA C2C2 vs C1C2	0.47	2.11	0.27-16.21			
Haplotipo KIR AA vs Bx	0.85	1.24	0.14-11.24			
HLA Bw4+	0.86	0.88	0.19-3.92			
≥9 KIR Totales	0.40	0.49	0.09-2.59			
≥ 3 aKIR	0.73	0.77	0.17-3.44			
≥ 5 iKIR	0.99	1.01	0.11-9.04			
≥ 1 aKIR-HLA	0.25	3.50	0.41-29.80	0.17	4.59	0.51-40.95
≥ 4 iKIR-HLA	0.77	1.28	0.24-6.87			
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.16	6.07	0.49-75.55	0.28	5.09	0.25-102.21
Mismatch CMV (R- D+)	0.99	-	-			
Dte Vivo vs Cadáver	0.18	3.29	0.57-19.09	0.26	5.93	0.26-131.97
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.08	13.17	0.73-237.7	0.22	6.72	0.32-138.5
Profilaxis CMV	0.35	2.96	0.29-30.26	0.48	2.67	0.17-41.15
Otras terapias vs T+E	0.12	1.78	0.86-3.69	0.21	0.20	0.02-2.43
Infección VHC	0.18	0.32	0.06-1.70	0.16	0.29	0.05-1.65

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con $p < 0.35$ que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. Otras terapias incluyeron: T+E+MMF, CsA+E+MMF, CsA+E, Basiliximab/anti-CD3+CsA+E+MMF.

2.2.4.c. Rechazo del injerto

Tanto la presencia del alelo HLA-Bw4, como el tratamiento inmunosupresor clásico doble (tacrólimus y esteroides) o el triple (tacrólimus, esteroides y micofenolato mofetilo) frente al resto de inmunosupresión, emergieron como factores protectores para el desarrollo de rechazo del injerto cercanas al límite de significación estadística. Junto con el género masculino frente a femenino cercano a la significación estadística, se incluyeron en el multivariable.

En el análisis multivariable sólo se mantuvo cercano a la significación el tratamiento inmunosupresor con combinaciones de terapias inmunosupresoras no clásicas frente a la

inmunosupresión convencional doble o triple como protector frente al rechazo (OR: 0.27; IC 95%: 0.07-1.04; p= 0.057) (Tabla 33).

Tabla 33. Análisis univariable y multivariable para el rechazo del injerto

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Varón vs Mujer	0.18	0.47	0.15-1.44	0.18	0.46	0.15-1.43
HLA C1C1 vs C1C2	0.71	1.21	0.45-3.27			
HLA C2C2 vs C1C2	0.84	0.88	0.26-2.99			
Haplotipo KIR AA vs Bx	0.91	1.09	0.26-4.56			
HLA Bw4+	0.08	0.45	0.18-1.12	0.13	0.48	0.18-1.25
≥9 KIR Totales	0.36	1.63	0.56-4.73			
≥ 3 aKIR	0.53	1.32	0.54-3.25			
≥ 5 iKIR	0.34	2.15	0.44-10.57			
≥ 1 aKIR-HLA	0.81	0.89	0.54-2.31			
≥ 4 iKIR-HLA	0.70	0.80	0.26-2.48			
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.85	1.27	0.11-14.60			
Mismatch CMV (R- D+)	0.85	1.27	0.11-14.60			
Dte Vivo vs Cadáver	0.82	0.83	0.15-4.38			
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.51	0.39	0.02-6.55			
Profilaxis CMV	0.67	0.61	0.07-5.77			
Otras terapias vs Doble/Triple	0.06	0.28	0.07-1.03	0.057	0.27	0.07-1.04
Infección VHC	0.97	0.98	0.40-2.40			

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con $p < 0.35$ que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. Otras terapias incluyeron: T+E+MMF, CsA+E+MMF, CsA+E, Basiliximab/anti-CD3+CsA+E+MMF. La triple terapia incluyó T+E+MMF o CsA+E+MMF; La doble terapia consistió en T+E o CsA+E.

2.2.4.d. Rechazo del injerto desde el segundo mes post-trasplante

La presencia del alelo HLA-Bw4 se presentó como factor significativamente protector de rechazo del injerto tras el primer mes post-trasplante. La presencia de HLA-Bw4 se incluyó en el análisis multivariable junto con las variables cercanas a la significación, sexo del paciente trasplantado, 3 ó más receptores aKIR, la presencia de al menos 1 interacción aKIR-HLA y el tratamiento inmunosupresor constituido por combinaciones no convencionales

respecto al tratamiento inmunosupresor clásico con doble (tacrólimus y esteroides) o triple (tacrólimus, esteroides y micofenolato mofetilo) terapia.

En el análisis multivariable se mantuvo y confirmó de forma significativa la independencia del alelo HLA-Bw4 como protector frente al desarrollo de rechazo del injerto tras el primer mes post-trasplante (OR: 0.06; IC 95%: 0.007-0.53; p= 0.01). El resto de variables no presentaron asociaciones significativas (Tabla 34).

Tabla 34. Análisis univariable y multivariable para el rechazo del injerto a partir del segundo mes post-trasplante

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Varón vs Mujer	0.22	3.82	0.45-32.52	0.16	0.19	0.018-1.96
HLA C1C1 vs C1C2	0.90	0.90	0.18-4.45			
HLA C2C2 vs C1C2	0.97	0.96	0.15-5.89			
Haplotipo KIR AA vs Bx	0.96	0.95	0.10-8.67			
HLA Bw4+	0.007	0.05	0.06-0.44	0.01	0.06	0.007-0.53
≥9 KIR Totales	0.28	2.15	0.53-8.75	0.98	1.03	0.55-19.17
≥ 3 aKIR	0.16	2.85	0.66-12.39	0.66	2.01	0.09-46.17
≥ 5 iKIR	0.99	-	-			
≥ 1 aKIR-HLA	0.24	3.57	0.42-30.43	0.67	1.82	0.12-27.89
≥ 4 iKIR-HLA	0.46	0.44	0.05-3.82			
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.99	-	-			
Mismatch CMV (R- D+)	0.99	-	-			
Dte Vivo vs Cadáver	0.82	1.29	0.14-12.15			
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.99	-	-			
Profilaxis CMV	0.99	-	-			
Otras terapias vs Doble/Triple	0.24	0.28	0.03-2.38	0.23	0.24	0.02-2.52
Infección VHC	0.75	1.25	0.31-5.06			

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con p<0.35 que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. Otras terapias incluyeron: T+E+MMF, CsA+E+MMF, CsA+E, Basiliximab/anti-CD3+CsA+E+MMF.

3. INFLUENCIA EN EL DESARROLLO DE INFECCIONES

3.1. Análisis de los polimorfismos de TLR4 c.896A>G (TLR4-299) y c.1196C>T (TLR4-399) y del polimorfismo c.304G>C del factor C3 del complemento

3.1.1. Influencia de los polimorfismos de TLR4 y C3 en el desarrollo de infecciones

Del total de pacientes incluidos en esta cohorte, 267 (52%) desarrollaron algún tipo de evento infeccioso. En 229 (85.7%) pacientes los eventos infecciosos fueron de etiología bacteriana, en 76 (28.5%) pacientes vírica y en 4 (1.5%) fúngica. Dado que las infecciones pudieron presentarse como eventos únicos o de repetición, se recogieron un total de 506 eventos sobre los 267 pacientes, de los cuales 418 (82.8%) fueron de etiología bacteriana, 83 (16.4%) eventos de tipo vírico y 4 (0.8%) fúngicos. Ya que sólo se presentaron en toda la cohorte 4 casos de pacientes con infección fúngica, aunque se realizaron igualmente las correspondientes comparaciones no se identificó ninguna relación significativa en ninguno de los casos (datos no mostrados).

3.1.1.a. Primera infección

En este apartado nos propusimos analizar la posible influencia de los polimorfismos genéticos de C3 y TLR4 sobre la aparición de infecciones post-trasplante. Antes de realizar el análisis, razonamos que la presencia de infecciones previas o coincidentes y tratamientos anti-infecciosos previos, podría condicionar la susceptibilidad del receptor a infecciones posteriores e introducir un sesgo que oscurecería el papel de los factores genéticos considerados. Por este motivo se decidió estudiar la posible relación entre polimorfismos genéticos y la primera infección de los pacientes (Tabla 35).

Tabla 35. Porcentaje de pacientes que desarrollaron la infección considerada en función de los polimorfismos de TLR4 y C3

		Infección global		Infección bacteriana		Infección vírica	
		%	p	%	p	%	p
TLR4-299	AA	52.1	0.88	46.8	0.76	16.7	0.63
	AG	50.9		43.8		20.6	
		n= 493		n= 443		n= 286	
TLR4-399	CC	52.1	0.89	46.8	0.77	16.8	0.64
	CT	50.8		44.2		19.4	
		n= 493		n= 443		n= 286	
Genotipo C3	C3SS	49.8	0.41	45.7	0.21	13.2	0.043
	C3FS	56.3		51.4		17.9	
	C3FF	50		34.5		32.1	
		n= 471		n= 425		n= 271	
Presencia alelo C3F	No	49.8	0.26	45.7	0.62	13.2	0.09
	Si	55.1		48.5		21.4	
		n=471		n= 425		n= 271	

La tabla muestra los porcentajes de aquellos pacientes que si desarrollaron el tipo de infección considerada para cada una de las comparaciones realizadas. La casilla sombreada en azul muestra la tasa de infección vírica estadísticamente superior en pacientes homocigotos C3FF en comparación con los restantes genotipos ($p=0.043$).

No se observaron asociaciones entre los polimorfismos y el desarrollo de la primera infección global y bacteriana. En cuanto a la influencia de los polimorfismos en la aparición de la primera infección vírica, el análisis mostró que el genotipo C3 FF, actuó significativamente como factor de predisposición al desarrollo de infección vírica. En el análisis sobre la presencia del alelo C3F la relación estadística no se mantuvo significativa.

3.1.1.b. Influencia de polimorfismos en el desarrollo del total de eventos infecciosos

Se evaluó la influencia de los polimorfismos en la aparición de la totalidad de eventos infecciosos descritos en el apartado 3.1.1, tanto generales como en función de la etiología bacteriana, vírica o fúngica, independientemente de si fueron infecciones primarias o de repetición, con el fin de tratar de identificar una posible asociación entre los polimorfismos y las infecciones de forma genérica o a etiologías particulares de las mismas.

Ninguno de los polimorfismos analizados influyó en el desarrollo de infección global (TLR4-299 $p= 0.81$; TLR4-399 $p= 0.44$; genotipos C3 $p= 0.75$, presencia del alelo C3F $p= 0.56$), infección bacteriana (TLR4-299 $p= 0.32$; TLR4-399 $p= 0.22$; genotipos C3 $p= 0.11$, presencia del alelo C3F $p= 0.81$) o infección fúngica (TLR4-299 $p= 0.87$; TLR4-399 $p= 0.92$; genotipos C3 $p= 0.46$, presencia del alelo C3F $p= 0.89$).

En la infección vírica, los polimorfismos de TLR4 no influyeron (TLR4-299 $p= 0.69$; TLR4-399 $p= 0.56$), pero el genotipo homocigoto para C3F favoreció significativamente su desarrollo en comparación con los restantes genotipos. El 21.4% pacientes con infección vírica presentaron el genotipo C3FF en comparación con 10.3 % de pacientes heterocigotos y 9.6% de homocigotos C3SS; $p= 0.026$). No obstante esta relación significativa no se mantuvo en la comparación de la presencia/ausencia del alelo C3F ($p= 0.26$). La infección de tipo vírica más frecuente identificada en la cohorte resultó la infección por VHS y VVZ en el 9.7% de los pacientes seguida de síndrome viral por CMV en el 3% de los pacientes (los tipos de infección identificados en la cohorte se encuentran descritos en la Tabla 18).

3.1.2. Supervivencia libre de infección

Para comprobar si los diferentes genotipos de TLR4 y C3 modificaban el tiempo de aparición de la primera infección, se comparó la supervivencia libre de infección entre los distintos genotipos en los pacientes que sufrieron al menos una infección post-trasplante. Se incluyeron los pacientes que desarrollaron su primera infección independientemente de su etiología (256 pacientes para TLR4 y 245 para C3). No se observaron diferencias en el tiempo transcurrido hasta el desarrollo de la primera infección para ningún grupo analizado (Fig. 34).

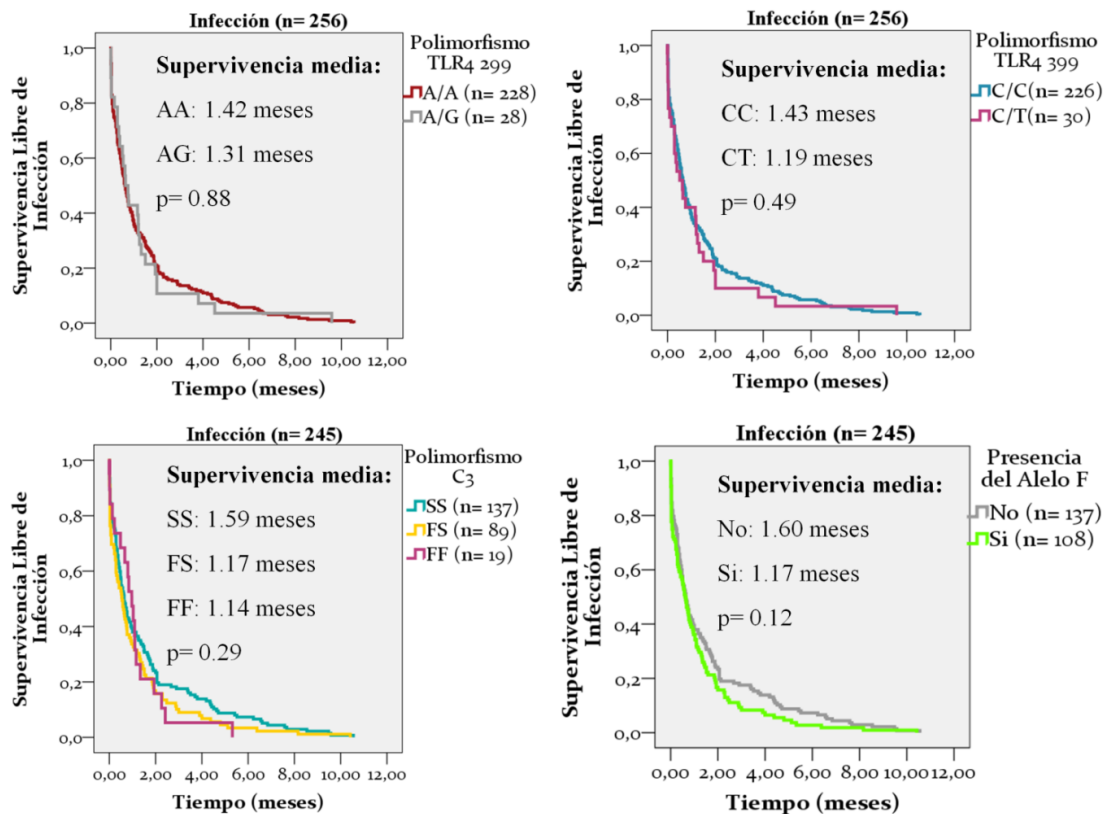


Figura 34. Supervivencia libre de la primera infección para los polimorfismos estudiados. En cada gráfico se muestran los valores de supervivencia para cada grupo incluido en el análisis y el valor p obtenido del test logrank.

Para cada etiología infecciosa se realizó el correspondiente análisis del tiempo libre de la primera infección. En el caso de la infección bacteriana, se incluyeron 206 pacientes para TLR4 y 199 pacientes para C3. Respecto a las primeras infecciones víricas el análisis de supervivencia incluyó para TLR4 49 pacientes y en el caso de C3 a 45 pacientes. No se observaron diferencias en el tiempo medio de aparición de las primeras infecciones bacterianas y víricas para ninguno de los polimorfismos estudiados (Figs. 35 y 36).

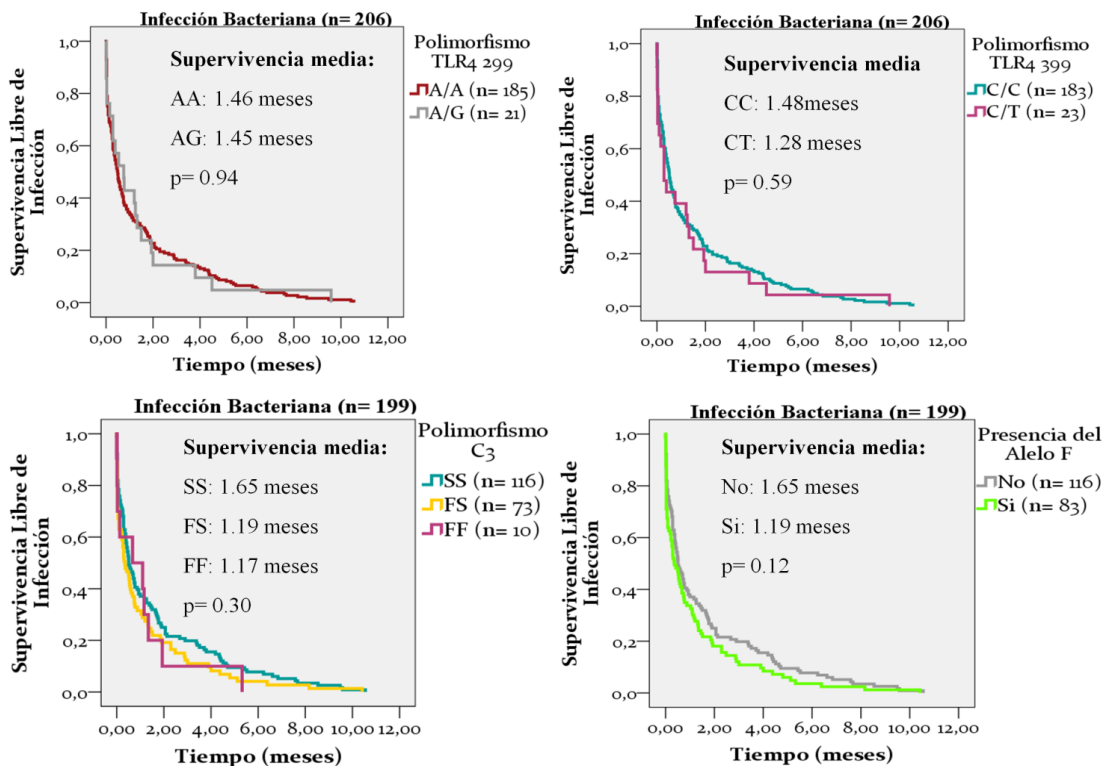


Figura 35. Supervivencia libre de la primera infección bacteriana para los diferentes polimorfismos estudiados. En cada gráfico se muestran los valores de supervivencia para cada grupo incluido en el análisis y el valor p obtenido del test logrank.

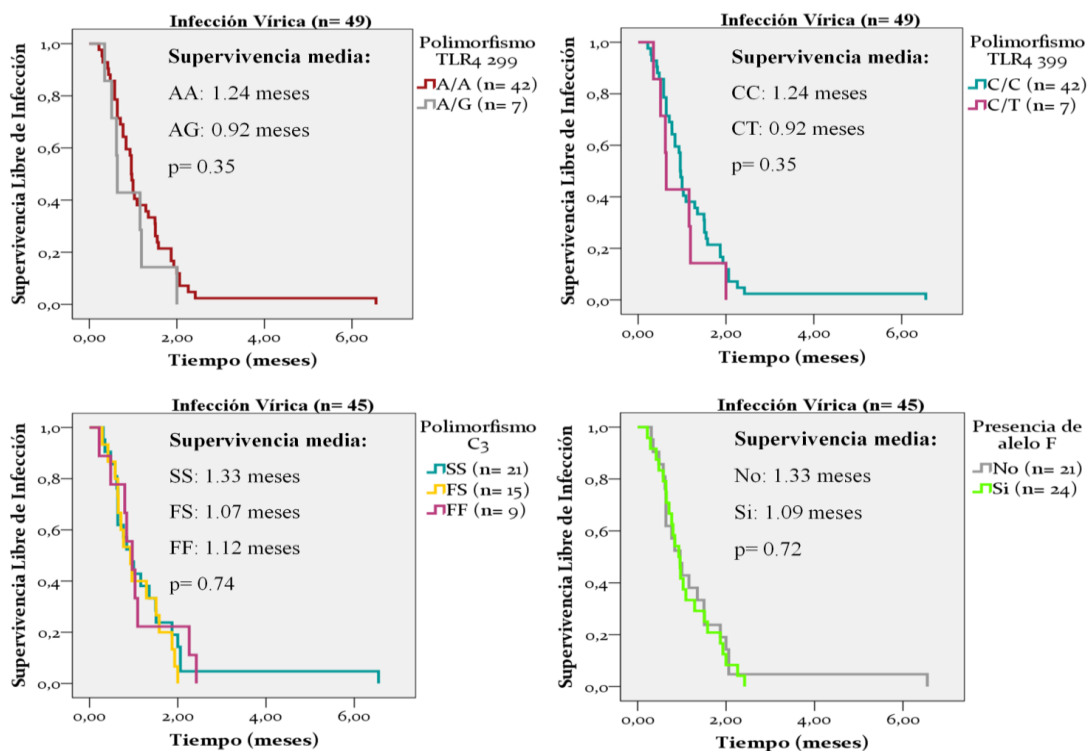


Figura 36. Supervivencia libre de la primera infección vírica para los diferentes polimorfismos estudiados. En cada gráfico se muestran los valores de supervivencia para cada grupo incluido en el análisis y el valor p obtenido del test logrank.

3.1.3. Análisis univariable y multivariable

En los análisis univariable y multivariable para infección general, bacteriana y vírica se incluyeron las variables sexo del paciente, los polimorfismos TLR4 y de C3, la presencia o ausencia del alelo C3F, la edad del paciente en el momento del trasplante (mayor de 18 años), compatibilidad de seroestatus CMV donante-receptor, donante vivo o cadáver, donante en muerte encefálica o asistólica y el tratamiento inmunosupresor administrado. Aquellas variables con un valor $p \leq 0.20$ en el análisis univariable se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

3.1.3.a. Infección global

El análisis univariable mostró que los receptores pediátricos presentaron mayor riesgo de desarrollar infección general frente a los adultos. El trasplante procedente de donante vivo respecto a los procedentes de donante cadáver y la terapia inmunosupresora no convencional frente a la clásica (tacrólimus más esteroides o tacrólimus más esteroides y micofenolato) también implicaron mayor riesgo en el desarrollo de infección global. Las variables significativas, junto con el sexo masculino como protector de la infección, la presencia de serologías positivas para CMV en el donante y no en el receptor (mismatch CMV), así como la donación por muerte en asistolia frente e encefálica, ambas cercanas a la significación como promotoras del desarrollo de infecciones, se incluyeron en el análisis multivariable.

Se mantuvieron las asociaciones significativas, edad del paciente en el momento del trasplante menor de 18 años (OR: 3.37; IC 95%: 1.19-9.5; $p= 0.021$) y la administración de terapias inmunosupresoras diferentes a la doble o triple clásica (OR: 3.24; IC 95%: 1.87-5.59; $p= 0.0001$), en ambos casos suponiendo mayor riesgo de infecciones indicando así su independencia del resto de variables. El riesgo incrementado observado en pacientes cuyo injerto procedía de donante en asistolia frente a donación por muerte encefálica alcanzó a la significación estadística y la independencia en el análisis multivariable (OR: 2.23; IC 95%: 1.19-4.47; $p= 0.023$). El resto de variables incluidas no presentaron asociaciones de riesgo significativas (Tabla 36).

Tabla 36. Análisis univariable y multivariable para el desarrollo de infección global

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Varón vs Mujer	0.18	0.77	0.52-1.13	0.15	0.74	0.48-1.12
TLR4-299 A/G vs AA	0.87	0.95	0.54-1.67			
TLR4-399 C/T vs CC	0.86	0.95	0.55-1.64			
C3FF vs C3SS	0.98	1.07	0.51-1.98			
Si alelo C3F vs No alelo C3F	0.26	1.24	0.86-1.79			
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.002	4.8	1.80-12.8	0.021	3.37	1.19-9.5
Mismatch CMV (R-/D+)	0.17	0.49	0.18-1.36	0.33	0.58	0.20-1.71
Dte Vivo vs Cadáver	0.045	2.49	1.02-6.07	0.12	1.96	0.85-4.55
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.095	1.75	0.91-3.40	0.023	2.23	1.19-4.47
Otras terapias vs Doble/Triple	0.0001	3.03	1.78-5.17	0.0001	3.24	1.87-5.59

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con $p < 0.20$ que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. Otras terapias incluyeron: T+E+MMF, CsA+E+MMF, CsA+E, Basiliximab/anti-CD3+CsA+E+MMF. La triple terapia incluyó T+E+MMF o CsA+E+MMF; La doble terapia consistió en T+E o CsA+E.

3.1.3.b. Infección bacteriana

El trasplante pediátrico, así como la donación procedente de cadáver por asistolia actuaron como factores de riesgo significativos para la aparición de infección bacteriana. Estas variables significativas se incluyeron en el multivariable junto con el sexo masculino y el genotipo homocigoto C3FF frente al homocigoto C3SS, como factores cercanos a la significación con efecto protector frente al desarrollo de infecciones bacterianas.

Mantuvieron la asociación significativa confirmando también la independencia de la asociación, el trasplante en receptores menores de 18 años (OR: 13.4; IC 95%: 2.87-62.06; $p = 0.001$) y la donación en asistolia (OR: 4.09; IC 95%: 1.67-10.06; $p = 0.02$). Las restantes variables incluidas no alcanzaron la significación estadística (Tabla 37).

Tabla 37. Análisis univariable y multivariable para el desarrollo de infección bacteriana

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Varón vs Mujer	0.11	0.71	0.47-1.08	0.07	0.58	0.32-1.05
TLR4-299 A/G vs AA	0.90	0.96	0.52-1.77			
TLR4-399 C/T vs CC	0.95	1.02	0.56-1.83			
C3FF vs C3SS	0.19	0.58	0.26-1.3	0.31	0.80	0.52-1.23
Si alelo C3F vs No alelo C3F	0.94	0.98	0.65-1.48			
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.0001	7.4	2.69-20.33	0.001	13.4	2.87-62.06
Mismatch CMV (R-/D+)	0.75	0.84	0.28-2.46			
Dte Vivo vs Cadáver	0.22	1.64	0.74-3.63			
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.025	2.17	1.10-4.27	0.02	4.09	1.67-10.06
Otras terapias vs Doble/Triple	0.99	-	-			

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con $p < 0.20$ que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. Otras terapias incluyeron: T+E+MMF, CsA+E+MMF, CsA+E, Basiliximab/anti-CD3+CsA+E+MMF. La triple terapia incluyó T+E+MMF o CsA+E+MMF; La doble terapia consistió en T+E o CsA+E.

3.1.3.c. Infección vírica

Supusieron factores de riesgo para el desarrollo de infección vírica el genotipo C3FF frente al homocigoto C3SS, así como otros tratamientos no convencionales en comparación con la terapia inmunosupresora clásica (tacrólimus más esteroides o tacrólimus más esteroides y micofenolato).

Ambas variables se incluyeron en el análisis multivariable junto con la presencia del alelo C3F y la donación de vivo, como promotores cercanos a la significación de este tipo de infecciones. Mantuvieron su asociación significativa como promotoras del riesgo el genotipo C3FF frente a C3SS (OR: 3.75; IC 95%: 1.57-8.96; $p = 0.003$) y la terapia no convencional frente a la inmunosupresión clásica (OR: 2.69; IC 95%: 1.29-5.63; $p = 0.008$) (Tabla 38).

Tabla 38. Análisis univariable y multivariable para el desarrollo de infección vírica

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Varón vs Mujer	0.78	1.09	0.57-2.08			
TLR4-299 A/G vs AA	0.46	1.37	0.58-3.23			
TLR4-399 C/T vs CC	0.59	1.25	0.53-2.94			
C3FF vs C3SS	0.003	3.75	1.57-8.96	0.008	3.6	1.39-9.27
Si alelo C3F vs No alelo C3F	0.09	1.68	0.91-3.12	0.15	1.64	0.83-3.25
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.99	-	-			
Mismatch CMV (R-/D+)	0.99	-	-			
Dte Vivo vs Cadáver	0.17	2.03	0.74-5.60	0.54	1.57	0.36-6.75
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.59	1.44	0.39-5.31			
Otras terapias vs Doble/Triple	0.006	2.53	1.31-4.89	0.008	2.69	1.29-5.63

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con $p < 0.20$ que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. Otras terapias incluyeron: T+E+MMF, CsA+E+MMF, CsA+E, Basiliximab/anti-CD3+CsA+E+MMF. La triple terapia incluyó T+E+MMF o CsA+E+MMF; La doble terapia consistió en T+E o CsA+E.

3.2. Análisis del repertorio genético de killer immunoglobulin-like receptors (KIR)

3.2.1. Influencia del sistema KIR-HLA en el desarrollo de infecciones

Del total de pacientes incluidos en esta cohorte ($n=95$), 51 (53.7%) desarrollaron algún tipo de evento infeccioso. En 33 (85.7%) pacientes las infecciones presentadas fueron bacterianas, en 22 (28.5%) pacientes víricas y en 3 (1.5%) pacientes fúngicas. Dado que las infecciones pudieron presentarse como eventos únicos o de repetición, se recogieron un total de 85 eventos sobre los 51 pacientes, de los cuales 59 (69.4%) fueron de etiología bacteriana, 23 (27.1%) eventos de tipo vírico y 3 (3.5%) fúngicos. Ya que sólo se presentaron en toda la cohorte 3 casos de pacientes con infección fúngica, aunque se realizaron igualmente las correspondientes comparaciones no se identificó ninguna relación significativa en ninguno de los casos (datos no mostrados).

3.2.1.a. Efecto de las moléculas HLA-B, HLA-C y haplotipos KIR en la aparición de primera infección tras el trasplante

Como se ha explicado con anterioridad (punto 3.1.1.a), se estudió el posible efecto de las moléculas HLA-B y -C y los haplotipos KIR, sobre la aparición de la primera infección en los pacientes para minimizar el posible efecto de infecciones y/o tratamientos previos. La distribución de los pacientes en función de los genotipos de las moléculas HLA-B, HLA-C y los haplotipos KIR se describe en el apartado 1.2.1. Se analizó la aparición de la primera infección independiente de su etiología (n=95), de la primera infección bacteriana (n=77) y la primera vírica (n=61) en función de las moléculas HLA-C, HLA-B y los haplotipos KIR (Tabla 39). No se observaron diferencias respecto a la incidencia de infección global, bacteriana ni vírica. No obstante el análisis mostró que los pacientes con haplotipos KIR AA presentaron una tendencia a una mayor incidencia de infección vírica.

Tabla 39. Porcentaje de pacientes que desarrollaron la infección considerada en función de las moléculas HLA-C, HLA-B y los haplotipos KIR

		Infección global (n=95)		Infección bacteriana (n=77)		Infección vírica (n=61)	
		%	p	%	p	%	p
HLA-C	C1C1	42.9	0.14	31	0.17	23.1	0.28
	C2C2	50		41.2		16.7	
	C1C2	65		54.8		39.1	
HLA-B	Bw4-	54.5	0.90	48.3	0.48	21.1	0.54
	Bw4+	53.2		39.6		31	
Haplotipo KIR	AA	80	0.15	66.7	0.42	66.7	0.07
	Bx	50.6		40.8		23.6	

La tabla muestra los porcentajes de aquellos pacientes que si desarrollaron el tipo de infección considerada para cada una de las comparaciones realizadas. La casilla sombreada en azul muestra una tendencia a una mayor incidencia de primeras infecciones de tipo víricas en pacientes con haplotipos KIR AA.

3.2.1.b. Efecto del repertorio KIR e interacciones KIR-HLA en la aparición de primera infección tras el trasplante

La distribución de pacientes de acuerdo al número de receptores KIR totales, de receptores aKIR e iKIR y de las interacciones HLA-KIR activadoras e inhibidoras se muestra en la figura 24. Se estudió la relación entre el número medio de receptores KIR (totales, activadores e inhibidores) y de las interacciones KIR-HLA, en la aparición de la infección independiente de la etiología, bacteriana y vírica. (Tabla 40).

Este análisis no mostró diferencias para la primera infección global, ni para la de etiología bacteriana. Cuando se compararon los números de receptores e interacciones KIR en la incidencia de la primera infección vírica tampoco observamos diferencias para el número total de KIR, aKIR, iKIR e interacciones iKIR-HLA. Sin embargo, para las interacciones activadoras identificamos una relación en el límite de la significación estadística en la que los pacientes que desarrollaron infección vírica presentaban un mayor número de interacciones aKIR-HLA ($p=0.06$).

Tabla 40. Número medio de receptores KIR e interacciones KIR-HLA presentes en los pacientes en función del evento infeccioso considerado

		Total KIR [5-13]		aKIR [0-6]		iKIR [3-8]		aKIR-HLA [1-4]		iKIR-HLA [0-6]	
		Media	p	Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Infección global	No (n=44)	7.86	0.74	2.30	0.55	5.34	0.63	0.80	0.22	2.25	0.28
	Si (n=51)	7.98		2.47		5.43		0.98		2.55	
Infección bacteriana	No (n= 44)	7.86	0.97	2.30	0.76	5.34	0.81	0.80	0.42	2.25	0.51
	Si (n= 33)	7.85		2.39		5.39		0.94		2.45	
Infección vírica	No (n= 44)	7.86	0.40	2.30	0.37	5.34	0.47	0.80	0.06	2.25	0.28
	Si (n= 17)	8.29		2.65		5.53		1.12		2.71	

La tabla muestra el número medio (columna “media”) de receptores KIR totales, aKIR, i KIR e interacciones entre los receptores aKIR e iKIR con sus respectivos ligandos HLA para cada evento estudiado. Entre corchetes se muestra rango de receptores/interacciones posibles. Entre paréntesis se indica el número de pacientes incluidos. La casilla

sombreada en azul es indicativa de la tendencia a la presencia de un mayor número medio de interacciones activadoras KIR-HLA en aquellos pacientes que desarrollaron infección vírica.

Debido a la dispersión existente en el número de receptores KIR e interacciones, se agruparon los pacientes siguiendo los mismos criterios que los descritos en el apartado 2.2.2. (Influencia del número de receptores KIR e interacciones KIR-HLA en el desarrollo del evento clínico). Para los receptores KIR totales los pacientes se agruparon en función de la presencia de 9 o más receptores totales y menos de 9, para los receptores aKIR en igual o mayor de 3 y menos de 3, para los iKIR en igual o más de 5 y menos de 5, y para las interacciones aKIR-HLA los pacientes se clasificaron de acuerdo a la presencia de al menos 1 interacción aKIR-HLA o ninguna. Para las interacciones de iKIR también se siguió el mismo criterio dividiendo los pacientes según presentaran 4 o más y menos de 4, excepto en los análisis de las curvas de supervivencia, en los que no se dispuso de suficiente representación de 4iKIR-HLA y se empleó el punto de corte en 3 interacciones inhibitoras manteniéndose la consecuencia biológica. Los resultados obtenidos en el análisis de la influencia sobre el desarrollo de infección global, bacteriana y vírica de los distintos receptores KIR e interacciones KIR-HLA agrupados según los criterios previamente definidos se describen en la Tabla 41.

Tabla 41. Porcentaje de pacientes que desarrollaron el evento infeccioso considerado en función de los receptores KIR e interacciones KIR-HLA agrupadas

		Infección global (n=95)		Infección bacteriana (n=77)		Infección vírica (n=61)	
		%	p	%	p	%	p
KIR Totales	< 9	51.7	0.67	44	0.81	20	0.15
	≥ 9	56.8		40.7		38.5	
aKIR	< 3	51.9	0.83	43.5	0.25	21.1	0.26
	≥ 3	56.1		41.9		35.7	
iKIR	< 5	25	0.06	25	0.21	0	0.10
	≥ 5	57.8		46.2		32.7	
aKIR-HLA	Ninguno	40	0.08	35.7	0.47	5.3	0.01
	≥ 1	60		46.9		38.1	
iKIR-HLA	< 4	50.7	0.32	41.3	0.56	22.9	0.19
	≥ 4	65		42.9		46.2	

La tabla muestra los porcentajes de aquellos pacientes que si desarrollaron el tipo de infección considerada para cada una de las comparaciones realizadas. La casilla azul muestra que al menos una

interacción aKIR-HLA supuso mayor tasa de infección significativa ($p= 0.01$) en comparación con la ausencia de interacciones.

El análisis de receptores KIR agrupados para el desarrollo de infección global mostró que la presencia de un número mayor o igual de 5 iKIR suponía mayor incidencia de infección, aunque esta relación quedó en el límite de la significación ($p= 0.06$). También se observó una tendencia a una mayor incidencia de infección con la presencia de al menos 1 interacción positiva aKIR-HLA frente los pacientes sin interacciones ($p= 0.08$). El resto de variables agrupadas no mostraron diferencias.

En los correspondientes análisis de los receptores e interacciones KIR, agrupados para la infección de tipo bacteriana, tampoco se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos analizados.

Finalmente en el respectivo análisis de influencia de este repertorio en el desarrollo de la primera infección vírica, no se observaron diferencias para los receptores KIR totales, receptores aKIR, receptores iKIR ni en las interacciones iKIR-HLA. Sin embargo de nuevo para aKIR-HLA la presencia de al menos una interacción, en comparación con la ausencia de las mismas, supuso mayor tasa de infección significativa ($p= 0.01$) confirmando el análisis en números absolutos de interacciones aKIR-HLA.

3.2.1.c. Efecto de las moléculas HLA-B, HLA-C y haplotipos KIR en el desarrollo de eventos infecciosos

Se evaluó la influencia de las moléculas HLA-C y HLA-B y los haplotipos KIR en la aparición de la totalidad de los eventos infecciosos descritos en el apartado 3.2.1 independientemente de su etiología y analizando por separado todas las infecciones de cada etiología infecciosa (bacteriana, vírica y fúngica), independientemente de si fueron infecciones primarias o de repetición, con el fin de tratar de identificar una posible asociación entre los polimorfismos y las infecciones de forma genérica o a etiologías particulares de las mismas. Los resultados de esta comparación se encuentran resumidos en la Tabla 42.

La presencia del genotipo HLA-C1C2 supuso una incidencia significativamente superior a la del resto de los grupos en el desarrollo de infección global ($p= 0.04$), a favor de

una incidencia superior de infección bacteriana ($p=0.03$). Las restantes variables analizadas no mostraron ningún efecto en el desarrollo de infección general, bacteriana o vírica.

Tabla 42. Incidencia de los eventos infecciosos considerados en función de las moléculas HLA-C, HLA-B y los haplotipos KIR

		Infección global (n=129)		Infección bacteriana (n=103)		Infección vírica (n=67)	
		%	p	%	p	%	p
HLA-C	C1C1	55.6	0.04	42.9	0.03	20	0.45
	C2C2	56.5		50		8.7	
	C1C2	77		70.8		19.7	
HLA-B	Bw4-	68.1	0.84	62.5	0.42	12.8	0.34
	Bw4+	64.4		54		20.7	
Haplotipo KIR	AA	85.7	0.17	75	0.49	35.7	0.14
	Bx	63.5		55.8		15.7	

La tabla muestra la incidencia en % del tipo de infección considerada para cada una de las comparaciones realizadas. La casilla sombreada en azul muestra el genotipo HLA-C1C2 como el de mayor predisposición significativa al desarrollo de infecciones generales ($p=0.04$) y bacterianas ($p=0.03$).

3.2.1.d. Efecto del repertorio KIR e interacciones KIR-HLA en el desarrollo de eventos

La distribución de pacientes de acuerdo al número de receptores KIR totales, de receptores aKIR e iKIR y de las interacciones HLA-KIR activadoras e inhibidoras se muestra en la figura 24. El estudio de la primera infección se realizó igual que en el apartado 3.2.1.c para obviar otros factores influyentes como terapias antimicrobianas o infecciones secundarias.

No se observaron diferencias en el número medio de receptores KIR e interacciones KIR-HLA entre aquellos pacientes que desarrollaron las infecciones consideradas (global, bacteriana y vírica) y los pacientes que no desarrollaron ninguna infección (Tabla 43).

Tabla 43. Número medio de receptores KIR e interacciones KIR-HLA presentes en cada uno de los eventos infecciosos analizados

		Total KIR [5-13]		aKIR [0-6]		iKIR [3-8]		aKIR-HLA [1-4]		iKIR-HLA [0-6]	
		Media	p	Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Infección global	No (n=44)	7.86	0.92	2.30	0.82	5.34	0.89	0.80	0.58	2.25	0.56
	Si (n= 85)	7.84		2.35		5.34		0.87		2.40	
Infección bacteriana	No (n= 44)	7.89	0.76	2.33	0.96	5.36	0.99	0.84	0.97	2.30	0.66
	Si (n= 59)	7.80		2.34		5.36		0.85		2.41	
Infección vírica	No (n= 44)	7.79	0.44	2.29	0.46	5.35	0.84	0.81	0.16	2.33	0.74
	Si (n= 23)	8.09		2.52		5.39		1.00		2.43	

La tabla muestra el número medio (columna “media”) de receptores KIR totales, aKIR, i KIR e interacciones entre los receptores aKIR e iKIR con sus respectivos ligandos HLA para cada evento estudiado. Entre corchetes se muestra rango de receptores/interacciones posibles. Entre paréntesis se indica el número de pacientes incluidos.

Posteriormente se realizó este análisis agrupando los pacientes para limitar la diversidad. Los resultados de esta comparación se describen en la Tabla 44. No se observaron diferencias en el porcentaje de pacientes que desarrollaron infección global y bacteriana para ninguna de las agrupaciones de los receptores KIR e interacciones KIR-HLA. Igualmente no se observaron diferencias en los receptores KIR totales, aKIR, iKIR e interacciones inhibitoras, pero en el caso de las interacciones activadoras, se observó que la presencia de al menos 1 interacción aKIR-HLA implicaba significativamente ($p=0.016$) una mayor incidencia de eventos infecciosos víricos. La infección de tipo vírica más frecuente identificada en la cohorte resultó la infección por VHS y VVZ en el 16.57% de los pacientes, seguida de síndrome viral por CMV en el 7.1% de los pacientes (los tipos de infección identificados en la cohorte se encuentran descritos en la Tabla 20).

Tabla 44. Incidencia de los eventos infecciosos considerados en función de los receptores KIR e interacciones KIR-HLA agrupadas

		Infección global (n=129)		Infección bacteriana (n=103)		Infección vírica (n=67)	
		%	p	%	p	%	p
KIR Totales	< 9	66.7	0.84	59.4	0.67	30	0.43
	≥ 9	64.4		52.9		42.7	
aKIR	< 3	66.7	0.85	59.4	0.68	29.7	0.44
	≥ 3	64.7		53.8		40	
iKIR	< 5	47.1	0.10	43.8	0.28	10	0.16
	≥ 5	68.8		59.8		31.6	
aKIR-HLA	Ninguno	60	0.33	55	0.84	14.3	0.016
	≥ 1	69		58.7		43.5	
iKIR-HLA	< 4	63.4	0.36	54.3	0.33	31.5	0.50
	≥ 4	75		68.2		46.2	

La tabla muestra la incidencia en % del tipo de infección considerada para cada una de las comparaciones realizadas. La casilla sombreada en azul indica una mayor incidencia significativa de infecciones de tipo vírico para la presencia de al menos una interacción aKIR-HLA.

3.2.2. Supervivencia libre de infección

Se comparó el tiempo transcurrido desde el trasplante hasta la aparición de la primera infección (“tiempo libre de infección”) en función de las moléculas HLA-C (C1C1, C1C2 o C2C2), HLA-B (presencia o ausencia del alelo serológico Bw4) y los haplotipos KIR (AA o Bx) de los pacientes, y el número de receptores KIR (totales, aKIR, iKIR) e interacciones (aKIR-HLA e iKIR-HLA).

El tiempo medio de aparición de infección global (n=51) resulto independiente de las moléculas HLA-C, HLA-B y de los haplotipos KIR (Fig. 37). En la comparación de receptores KIR totales, aKIR, e KIR e interacciones tampoco se identificaron diferencias entre los grupos debido, probablemente, a la gran diversidad de datos (datos no mostrados). No obstante, el estudio de receptores agrupados tampoco mostró diferencias para la infección global entre los grupos establecidos (Fig. 38).

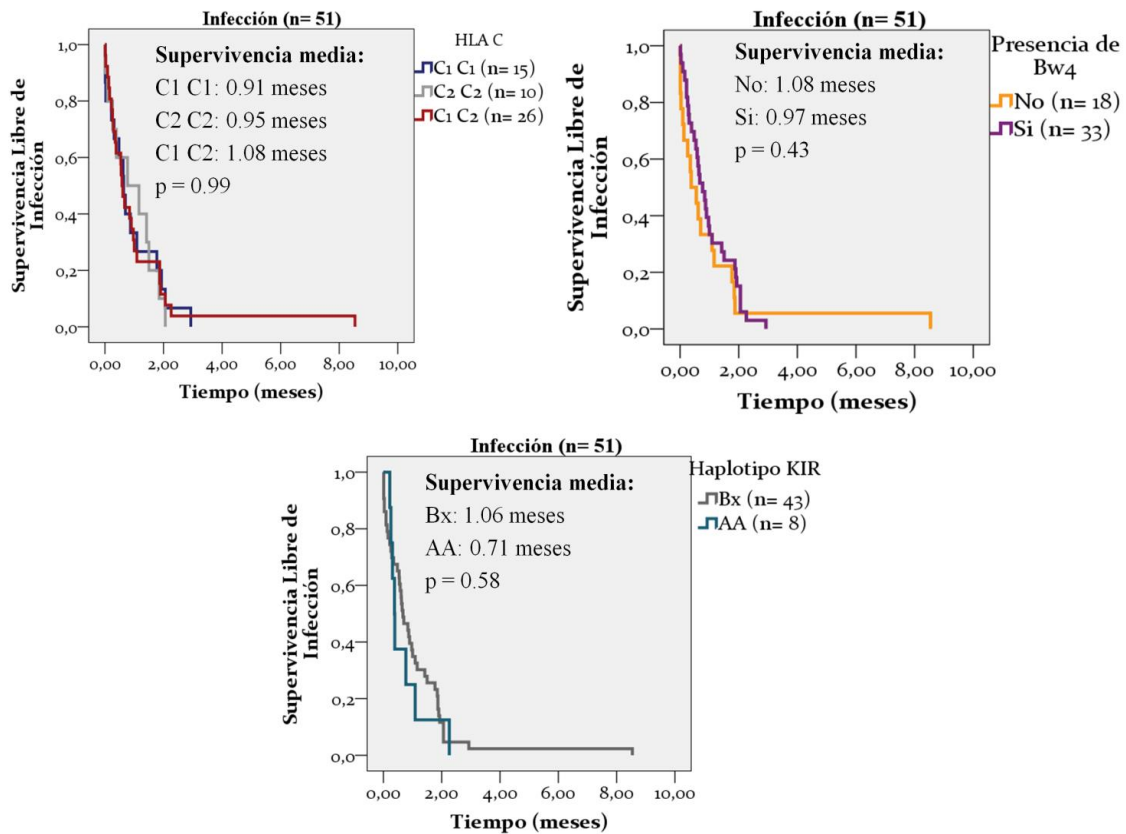


Figura 37. Tiempo de aparición de la primera infección en función de las moléculas HLA-C, HLA-B y haplotipos KIR. En cada gráfico se muestran los tiempos de aparición de infección y el valor p obtenido en el test logrank.

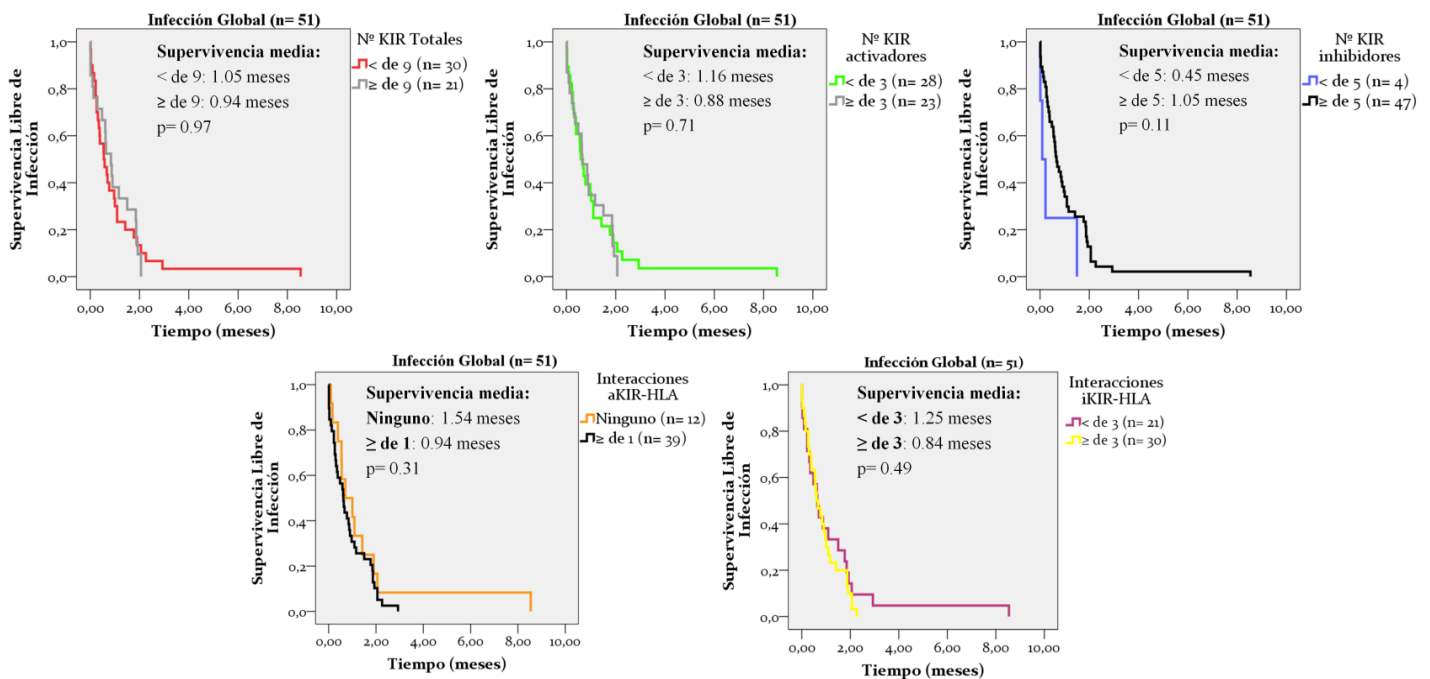


Figura 38. Tiempo de aparición de la primera infección en función de la agrupación de los receptores KIR totales, aKIR, iKIR e interacciones activadoras e inhibidoras. Los gráficos

muestran el tiempo de aparición de la primera infección global y el valor p obtenido mediante en el test logrank.

En el análisis del tiempo medio de aparición de infección bacteriana, se incluyeron aquellos pacientes que desarrollaron este tipo de infección (n= 33). El tiempo medio de aparición de la primera infección bacteriana fue similar entre los grupos para las moléculas HLA-C, HLA-B y los haplotipos KIR, cercanos al mes post-trasplante (Fig. 39).

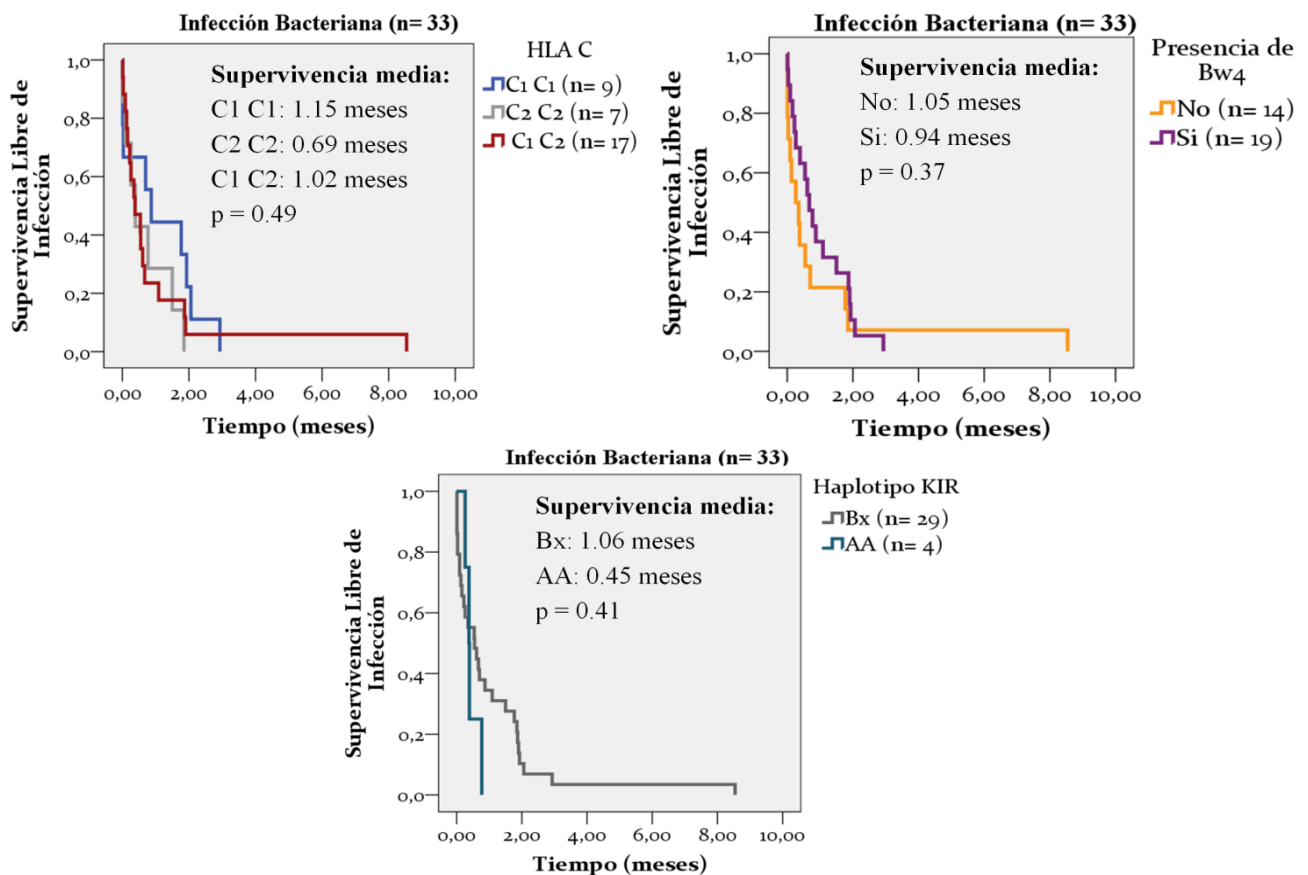


Figura 39. Comparación del tiempo de aparición de la primera infección bacteriana. Se muestra en cada grafico el tiempo de aparición de la primera infección bacteriana y el valor p obtenido en el test logrank.

La comparación del número total de los diferentes receptores e interacciones KIR tampoco mostró diferencias en el tiempo transcurrido hasta el desarrollo de la infección bacteriana (receptores KIR totales p= 0.14; aKIR p= 0.22; iKIR p= 0.18; interacciones aKIR-HLA p= 0.28; interacciones iKIR-HLA p= 0.15). Sin embargo, en la agrupación posterior de tipos de receptores e interacciones KIR, la presencia de tres o más interacciones iKIR-HLA

supuso la aparición significativamente más temprana (la mitad de tiempo) de la primera infección bacteriana comparado con la presencia de menos de tres ($p=0.04$) (Fig. 40).

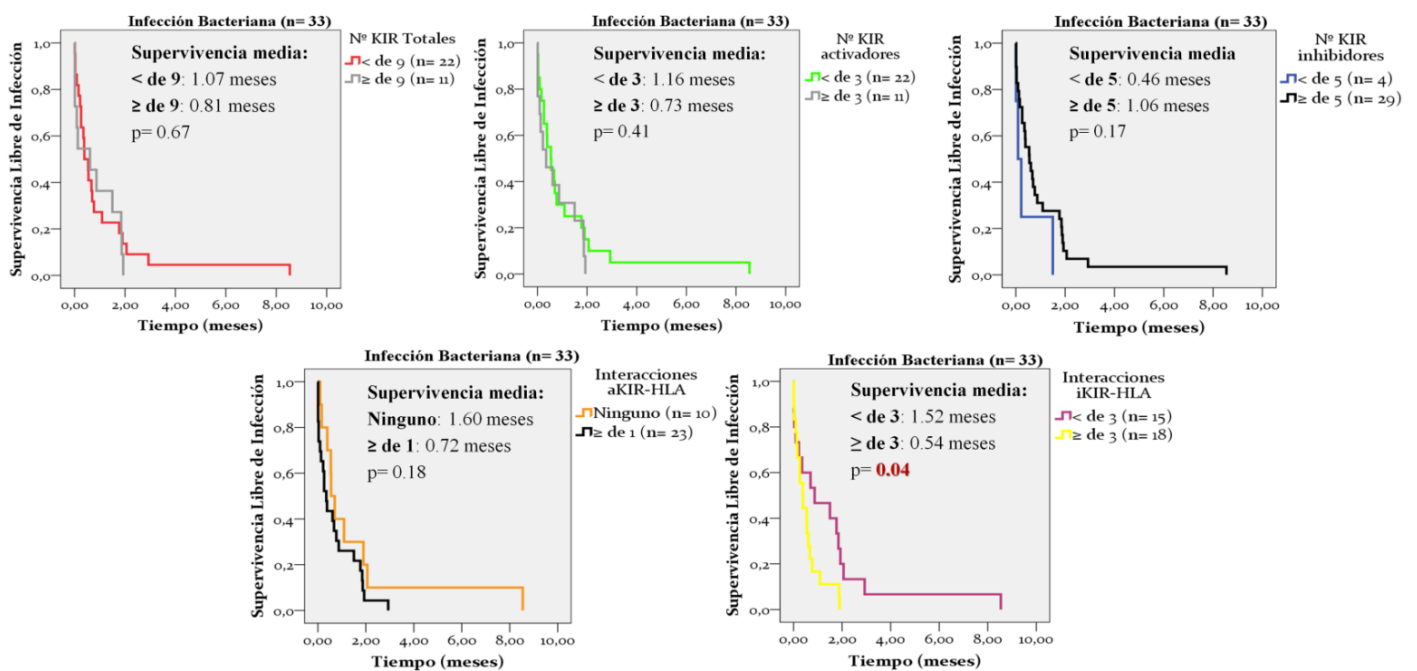


Figura 40. Tiempo de aparición de la primera infección bacteriana en función de la agrupación de los receptores KIR totales, aKIR, iKIR e interacciones activadoras e inhibitoras. Los gráficos muestran los valores de aparición de la primera infección bacteriana y el valor p obtenido en el test logrank. Los pacientes con 3 o más de 3 interacciones iKIR-HLA presentaron su primera infección bacteriana más pronto respecto a la presencia de menos de 3 iKIR-HLA ($p=0.04$).

Para el análisis del tiempo libre de infección vírica se incluyeron los pacientes cuya primera infección fue de esta etiología ($n=17$). Las curvas del tiempo libre de infección vírica no mostraron diferencias entre los haplotipos KIR AA y Bx, ni entre los grupos del alelo serológico Bw4, sin embargo los pacientes con haplotipos HLA-C1C1 presentaron significativamente su primera infección vírica más temprana que aquellos pacientes con haplotipos HLA-C1C2 y HLA-C2C2 ($p=0.04$) (Fig. 41).

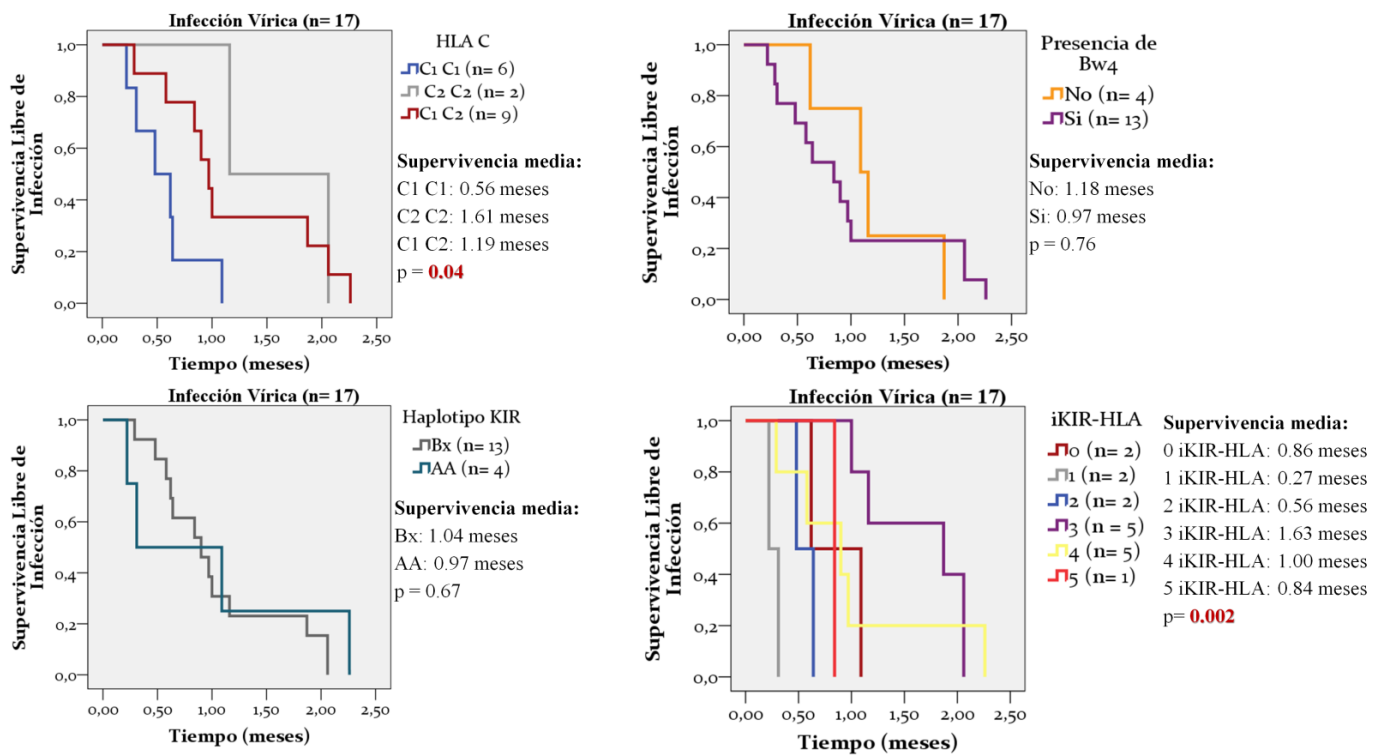


Figura 41. Tiempo de aparición de la primera infección vírica en función de las moléculas HLA-C y HLA-B, los haplotipos KIR y el número de interacciones iKIR-HLA. En cada gráfico se muestra el tiempo para el desarrollo de la primera infección vírica y el valor p obtenido en el test logrank. Los pacientes con haplotipos HLA-C1C1 desarrollaron su primera infección vírica en menos tiempo que los homocigotos C2C2 y los heterocigotos C1C2 (p= 0.04). En presencia de una única interacción iKIR-HLA, la primera infección vírica se desarrolló más pronto tras el trasplante (p= 0.002) que cuando se encuentra otro número de interacciones diferente.

No se observaron diferencias en el tiempo de aparición de la primera infección vírica entre receptores totales KIR (p= 0.87), aKIR (p= 0.46), iKIR (p= 0.72) e interacciones aKIR-HLA (p= 0.99), pero si se observó que la presencia de una única interacción iKIR-HLA suponía el desarrollo significativo (p= 0.002) más temprano de esta primera infección (0.27 meses) en comparación con ninguna interacción (0.86 meses), 2 interacciones (0.56 meses), 3 interacciones (1.63 meses), 4 interacciones (1 meses) o 5 interacciones (0.84 meses) (Fig. 41).

La comparación de los tipos de receptores KIR y sus interacciones agrupadas se muestra en la Figura 42. Únicamente se identificó que los pacientes con menos de 3 interacciones iKIR-HLA presentaron tres veces menor tiempo libre de infección, en

comparación con los que presentaron 3 o más interacciones ($p= 0.015$). Para el resto de agrupaciones no se observaron diferencias.

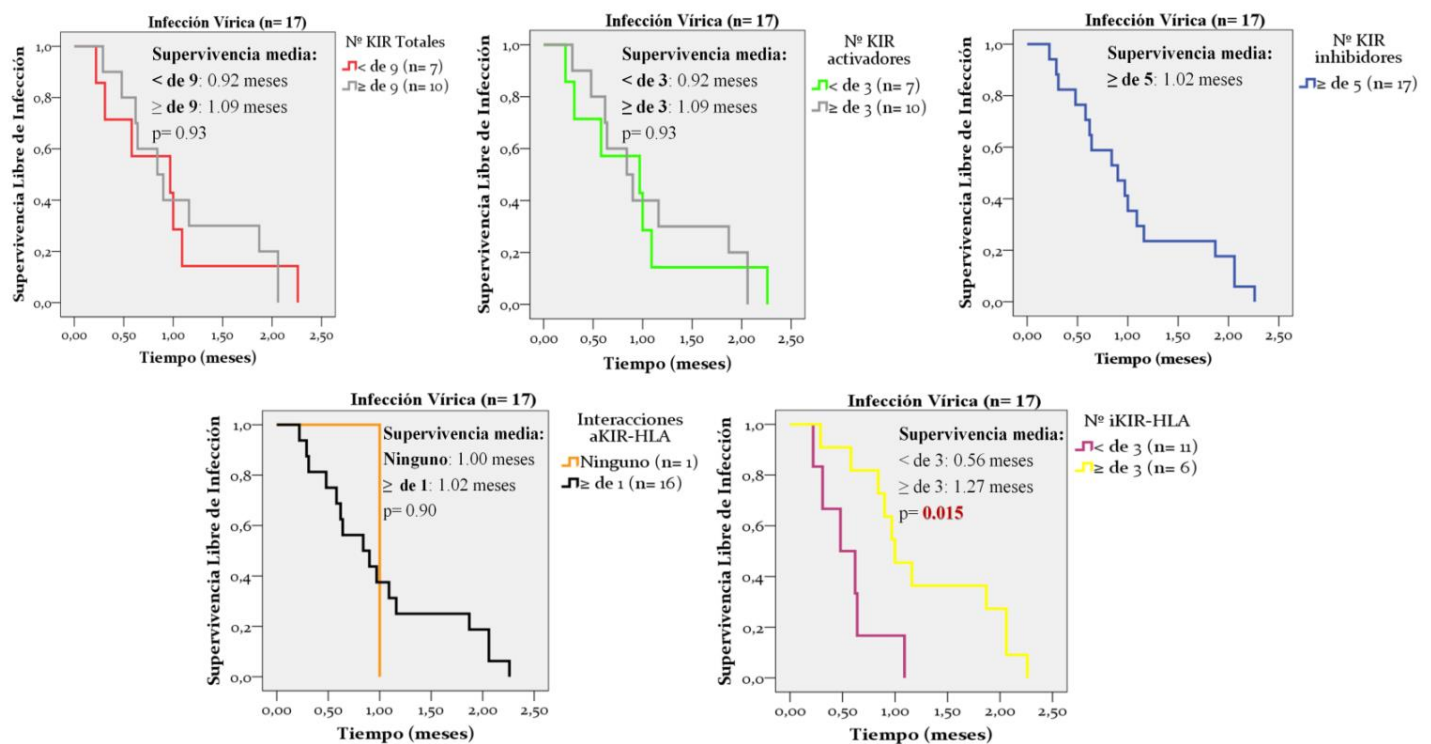


Figura 42. Tiempo de aparición de la primera infección vírica en función de las agrupaciones del número total de receptores KIR, aKIR, iKIR e interacciones aKIR-HLA e iKIR-HLA. En cada gráfico se muestran los valores del tiempo transcurrido hasta la aparición de la primera infección, así como el valor p obtenido en el test logrank. En el caso del número de receptores inhibidores, sólo generó un único grupo en el que todos los pacientes presentaron más o 5 interacciones por lo tanto, no se pudo realizar la comparación. Cuando los pacientes presentaron menos de 3 interacciones iKIR-HLA el tiempo medio libre de infección fue tres veces inferior al transcurrido para los pacientes con 3 o más de 3 interacciones ($p= 0.015$).

3.2.3. Análisis univariable y multivariable

El análisis univariable y multivariable se realizó para infección global, infección bacteriana, infección vírica. En todos ellos las variables incluidas fueron sexo del paciente, los grupos HLA-C (C1C1, C1C2 y C2C2), los haplotipos KIR AA o Bx, la presencia o ausencia del alelo serológico Bw4, la presencia de 9 o más de 9 KIR totales, 3 o más aKIR, 5 o más iKIR, al menos 1 interacción aKIR-HLA y 4 o más interacciones iKIR-HLA, la edad del

paciente en el momento del trasplante, la compatibilidad de seroestatus CMV donante-receptor, donante vivo o cadáver, donante en muerte encefálica o asistólica, la administración de terapia profiláctica frente a CMV y el tratamiento inmunosupresor administrado. Aquellas variables con un valor $p \leq 0.20$ en el análisis univariable se incluyeron en el posterior análisis multivariable

3.2.4.a. Infección global

El análisis univariable mostró que los pacientes heterocigotos HLA-C1C2 presentaron mayor riesgo de desarrollar infección global frente a los individuos homocigotos para uno u otro haplotipo. La inmunosupresión tradicional triple (tacrólimus, esteroides y micofenolato) supuso mayor riesgo de desarrollo de infección respecto a la doble convencional (tacrólimus, esteroides). Finalmente la presencia de 5 o más receptores iKIR implicó también un mayor riesgo significativo de desarrollo de infecciones.

Se incluyeron en el análisis multivariable las tres asociaciones significativas y las siguientes cercanas a la significación, haplotipo AA como factor de riesgo respecto al haplotipo Bx y la presencia de al menos una interacción aKIR-HLA como factores desencadenantes de infección.

En el análisis multivariable sólo se mantuvo la significación estadística en la inmunosupresión con tacrólimus, esteroides y micofenolato como factor de riesgo para el desarrollo de infección respecto a la doble terapia (OR: 3.66; IC 95%: 1.48-11.17; $p= 0.004$). El resto de variables incluidas no presentaron asociaciones de riesgo significativas (Tabla 45).

Tabla 45. Análisis univariable y multivariable del desarrollo de infección global

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Varón vs Mujer	0.82	1,11	0.45-2,71			
HLA C1C2 vs C1C1 y C2C2	0.05	2.29	0.98-6.36	0.16	1.99	0.76-5.19
Haplotipo KIR AA vs Bx	0.09	3.91	0.78-19.48	0.26	2.72	0.46-15.81
HLA Bw4+	0.90	0.95	0,40-2.21			
≥9 KIR Totales	0.63	1.22	0.53-2.81			
≥ 3 aKIR	0.68	1.19	0.52-2.68			
≥ 5 iKIR	0.044	4.11	1.04-16.31	0.15	2.91	0.67-12.67
≥ 1 aKIR-HLA	0.07	2.25	0.93-5.44	0.56	1.34	0.49-3.64
≥ 4 iKIR-HLA	0.25	1.81	0.65-5.03			
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.65	1.75	0.15-20.4			
Mismatch CMV (R-/D+)	0.99	-	-			
Dte Vivo vs Cadáver	0.60	1.48	0.33-6.04			
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.93	0.88	0.05-14.68			
Profilaxis CMV	0.77	1.31	0.21-8.23			
Triple terapia vs doble	0.001	5.03	1.99-12.73	0.01	3.66	1.37-9.77

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con $p < 0.20$ que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. La triple terapia incluyó T+E+MMF o CsA+E+MMF; La doble terapia consistió en T+E o CsA+E.

3.2.4.b. Infección bacteriana

Se identificó como significativa la administración de tacrólimus junto esteroides y micofenolato como promotora de infección bacteriana frente a la doble inmunosupresión sin la adición de micofenolato. La triple inmunosupresión se mantuvo como factor de riesgo independiente frente a la doble inmunosupresión (OR: 3.06; IC 95%: 1.25-7.49; $p = 0.014$) (Tabla 46).

Tabla 46. Análisis univariable y multivariable del desarrollo de infección bacteriana

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Varón vs Mujer	0.51	1.38	0.53-3.61			
HLA C1C2 vs C1C1 y C2C2	0.22	1.71	0.72-4.03			
Haplotipo KIR AA vs Bx	0.71	1.29	0.33-4.93			
HLA Bw4+	0.25	0.60	0.25-1.44			
≥9 KIR Totales	0.41	0.69	0.29-1.67			
≥ 3 aKIR	0.59	0.79	0.33-1.86			
≥ 5 iKIR	0.45	1.69	0.42-6.76			
≥ 1 aKIR-HLA	0.84	1.09	0.44-2.73			
≥ 4 iKIR-HLA	0.98	1.01	0.36-2.86			
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.27	3.93	0.34-45.11			
Mismatch CMV (R-/D+)	0.99	-	-			
Dte Vivo vs Cadáver	0.35	2.00	0.46-8.57			
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.99	-	-			
Profilaxis CMV	0.24	3.00	0.47-18.93			
Triple terapia vs doble	0.014	3.06	1.25-7.49	0.014	3.06	1.25-7.49

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con $p < 0.20$ que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. La triple terapia incluyó T+E+MMF o CsA+E+MMF; La doble terapia consistió en T+E o CsA+E.

3.2.4.c. Infección vírica

El análisis univariable identificó como significativa la presencia de al menos una interacción aKIR-HLA y la administración de triple terapia inmunosupresora como factores de predisposición al desarrollo de infección vírica. Además de éstas, se añadieron al análisis multivariable las asociaciones cercanas a la significación: haplotipo AA como desencadenante de infección frente al haplotipo Bx y la presencia de 9 o más receptores KIR totales, 3 o más aKIR y 4 o más interacciones inhibitoras iKIR-HLA como promotores de infección vírica.

Ninguna de las variables analizadas mantuvo su significación como factor de riesgo independiente en el análisis multivariable (Tabla 47).

Tabla 47. Análisis univariable y multivariable del desarrollo de infección vírica

	Univariable			Multivariable		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
Varón vs Mujer	0.92	1.06	0.33-3.36			
HLA C1C2 vs C1C1 y C2C2	0.23	1.9	0.66-5.47			
Haplotipo KIR AA vs Bx	0.067	3.69	0.91-14.92	0.16	4.08	0.52-31.08
HLA Bw4+	0.29	1.92	0.57-6.46			
≥9 KIR Totales	0.07	2.69	0.92-7.88	0.55	1.73	0.28-10.54
≥ 3 aKIR	0.15	2.16	0.74-6.29	0.50	1.62	0.39-6.68
≥ 5 iKIR	0.99	-	-			
≥ 1 aKIR-HLA	0.033	9.47	1.19-75.18	1.24	5.59	0.62-50.34
≥ 4 iKIR-HLA	0.12	2.49	0.79-7.88	0.52	0.53	0.074-3.77
Edad Tx <18 años vs >18 años	0.99	-	-			
Mismatch CMV (R-/D+)	0.99	-	-			
Dte Vivo vs Cadáver	0.68	0.63	0.07-5.52			
Dte en Asistolia vs Encefálica	0.29	4.66	0.27-78.87			
Profilaxis CMV	0.99	-	-			
Triple terapia vs doble	0.008	2.54	0.87-7.44	0.37	1.70	0.53-5.46

Las casillas sombreadas en azul indican aquellas variables con $p < 0.20$ que se incluyeron en el posterior análisis multivariable.

R-/D+: receptor negativo y donante positivo en la serología de CMV pre-Tx. La triple terapia incluyó T+E+MMF o CsA+E+MMF; La doble terapia consistió en T+E o CsA+E.

V. Discusión

El trasplante hepático se ha convertido con el paso de los años en una de las opciones terapéuticas más relevantes para los pacientes con hepatopatía terminal. Mientras que la mejora en las técnicas de preservación orgánica, el procedimiento quirúrgico y la terapia inmunosupresora permitieron que se instaurara como alternativa para estos pacientes, las complicaciones derivadas de este proceso, tales como el rechazo del injerto o las infecciones resultantes del adecuado balance en la inmunosupresión, continúan constituyendo los mayores obstáculos en la evolución del paciente trasplantado. A lo largo de los años, debido a la implicación inmunológica en los mecanismos responsables de desencadenar los eventos de rechazo e infecciones, muchos son los estudios que han tratado de identificar moléculas y mecanismos implicados en estos procesos en el trasplante de órgano sólido.

Bajo las condiciones de intensa inmunosupresión encaminada a limitar la inmunidad adaptativa, como principal y potente desencadenante de las posteriores complicaciones en estos pacientes, la inmunidad innata puede adquirir un papel fundamental como conjunto de mecanismos determinantes de la evolución del trasplante. En este sentido, el presente trabajo de tesis doctoral, trata de identificar la implicación de los polimorfismos genéticos de tres de los múltiples componentes de las vías moleculares más relevantes de la inmunidad innata, mediante los cuales desempeña sus funciones: TLR4 como representante de los receptores de reconocimiento de patrón, el factor C3 del sistema del complemento como principal proteína efectora de los mecanismos humorales y las células NK como responsables de la inmunidad innata celular.

1. El alelo C3F en el receptor hepático promueve la pérdida del injerto, protege del rechazo y favorece las infecciones virales

En este trabajo se describe que en pacientes trasplantados de hígado, las variantes de C3 del receptor, independientemente de las variantes genéticas de C3 del hígado donante, modifican la evolución de los injertos en el primer año post-trasplante. Esta observación sugiere, en primer lugar, que el complemento producido y activado de manera local, probablemente por las células del sistema inmune del receptor, e independientemente del

complemento circulante derivado del hígado donante, es un factor determinante en la respuesta al aloinjerto hepático. En segundo lugar, los datos apoyan la existencia de diferencias funcionales entre los alotipos C3F y C3S que, en el contexto del trasplante hepático, modificarían de forma distinta la respuesta inmune frente al injerto actuando en particular en el compartimento de la inmunidad celular adaptativa del receptor.

Los pacientes homocigotos para el alelo C3F presentaron una supervivencia del injerto significativamente menor y mayor incidencia de pérdida del injerto, sin embargo, los pacientes con este mismo genotipo presentaron una menor tasa de rechazo del injerto y una supervivencia libre de rechazo prolongada en el tiempo, en ambas circunstancias independientemente del resto de variables. Estas asociaciones también se identificaron para el análisis sobre la presencia/ausencia del alelo C3F, no obstante la significación estadística se vio reducida en relación a la obtenida en el análisis por genotipos. Este hecho sugiere por un lado, que el efecto observado es dependiente de "la dosis" de proteínas C3F y por otro lado que el alelo C3S ejerce un efecto opuesto al de la variante C3F. Al mismo tiempo observamos que C3F se presentó como factor de riesgo independiente para las infecciones víricas. En nuestra cohorte, estas infecciones víricas están representadas en la mayoría por VHS, VVZ y CMV que requieren respuestas celulares más potentes y robustas para su control. En este sentido, reviste interés señalar que en diferentes modelos de infecciones virales por influenza y coriomeningitis linfocitaria se ha descrito una respuesta impedida de las células T en ratones deficientes para C3 [258, 259] y además, en pacientes portadores de esta misma deficiencia también ha sido reportada una respuesta tipo Th1 defectiva [260]. Estos resultados sugieren que la respuesta inmune mediada por las células T requiere de la participación del factor C3 del complemento, por lo que las diferencias funcionales entre las variantes alélicas C3S y C3F podrían influir en la potencia y amplitud de las consiguientes repuestas inmunológicas celulares.

La respuesta dual del alelo C3F, actuando por un lado como promotor de las infecciones virales y por otro lado protegiendo frente al rechazo del injerto que observamos en nuestros resultados, sugiere que esta variante se encuentra asociada con respuestas celulares reducidas y/o con un estado pro-tolerogénico de las mismas. De

acuerdo con los datos provenientes de estudios recientes en los que se ha identificado que la activación local de C3 se desencadena gracias a la formación de la convertasa de C3 a través de la vía alternativa de activación del complemento [161] o debido a la actividad intracelular de la catepsina L [160], es posible especular que existan diferencias en la eficiencia de la activación proteolítica entre las variantes C3F y C3S. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, apoyarían que la escisión del alelo C3F es menos eficiente y como consecuencia, se produciría una menor cantidad de los fragmentos C3a y C3b y por lo tanto una señal estimuladora más débil proveniente de la activación de los correspondientes receptores del complemento C3aR y CD46 en las células T efectoras. Además una menor generación de C3a favorecería la capacidad tolerogénica de las células Treg. Otras posibles explicaciones a estos resultados incluirían que el fragmento C3b proveniente del alelo C3F en comparación con el generado desde el alelo C3S, activaría con menor eficiencia el receptor CD46, o que el alelo C3F presentaría una capacidad superior de la transformación de células productoras de INF- γ en células que secretaran IL-10 con actividad supresora. Alternativamente a estas hipótesis, el fragmento C3b originado a partir del alelo C3F podría unirse con mayor eficiencia a la isoforma CYT-2 de CD46, la cual limitaría la producción de INF- γ frente a la activación de la isoforma CYT-1 de CD46 que promovería la producción de esta citoquina por parte de los linfocitos T CD4⁺ [160].

En nuestra cohorte de pacientes sólo un único receptor perdió el injerto hepático tras el rechazo del mismo. Los eventos trombóticos o isquémicos fueron la principal causa de la pérdida del injerto, el cual se vio favorecido por la presencia del alelo C3F. Asumiendo que la activación y el depósito intracelular de C3 pueden darse en las plaquetas o en células endoteliales, es posible especular que las variantes alélicas C3F desencadenaran en estos tipos celulares un estado pro-coagulatorio [160].

Hasta la fecha no se dispone de estudios en los que se analice de forma independiente el significado del genotipo de C3 del receptor del trasplante en la evolución del injerto, sino que en todos ellos se ha llevado a cabo el análisis de la compatibilidad entre donante y receptor. En este sentido, los resultados disponibles en previos estudios no han identificado resultados concluyentes. El grupo de Brown, así como los posteriores estudios de

Varaganam en trasplante renal [155, 156] y Dhillon en trasplante hepático [158], no identificaron diferencias en las tasas de rechazo al realizar las comparaciones entre diversas combinaciones de alelos de C3 de donantes y receptores. Debido a que esta producción y activación local de C3 por parte de las células del sistema inmune ha sido recientemente descrita, conviene profundizar y ampliar el estudio del efecto del genotipo de C3 del receptor sobre la evolución del trasplante. De confirmarse los resultados, la determinación de los alelos de C3 en el receptor del trasplante, previo a su ejecución, podría ser una herramienta útil para la clasificación precoz de los pacientes de acuerdo a su riesgo y facilitar un cuidado personalizado de los mismos.

2. Las variantes polimórficas de TLR4 Asp299Gly y Thr399Ile no influyen en la evolución del trasplante hepático ni en el desarrollo de complicaciones infecciosas

Si bien es cierto que desconoce con exactitud el efecto de la presencia de los SNPs Asp299Gly y Thr399Ile sobre la funcionalidad del receptor TLR4, las diversas hipótesis apuntan hacia una alteración en el plegamiento de la proteína y su expresión en superficie, y un impedimento en el reclutamiento de MyD88 y TRIF que conducirían a una síntesis disminuida de citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-8, TNF- α o INF- β [96-98]. En el contexto del trasplante, esta situación se traduciría por un lado, en una respuesta inmune innata disminuida frente al daño por isquemia-reperfusión, que reduciría los fenómenos de necrosis que conducen a la pérdida del injerto, y por otro lado la consiguiente respuesta adaptativa se presentaría atenuada, por lo que en principio, las variantes de TLR4-299 y -399 podrían proteger frente al rechazo del injerto. Sin embargo simultáneamente se vería favorecido el desarrollo de infecciones, particularmente las originadas por bacterias gram negativas, ya que el principal ligando de TLR4 es el LPS de la membrana celular de las mismas.

En este trabajo no identificamos ninguna influencia de los posibles genotipos de ambos polimorfismos de TLR4 en la supervivencia del paciente, en la supervivencia del injerto o rechazo del mismo, incluyendo el estudio independiente en pacientes

trasplantados por cirrosis por VHC, o bien en el desarrollo de infecciones tanto generales como específicamente bacterianas y víricas .

Los diversos estudios realizados sobre la influencia de los polimorfismos de TLR4 en el trasplante de órgano sólido, han sido abordados desde dos enfoques distintos. En el primero, se analizan las consecuencias de los SNPs sobre la expresión de TLR4 en la superficie celular y las consecuencias de los distintos niveles de expresión en la evolución del trasplante. En el segundo enfoque se analiza de forma directa la posible relación entre genotipos de TLR4 y evolución del trasplante.

Los resultados obtenidos en trasplante renal [261] y trasplante hepático [113, 114] en relación a la expresión de TLR4 como consecuencia de la presencia de los polimorfismos, describen una reducción de la expresión del receptor TLR4 portador de los polimorfismos en monocitos y neutrófilos circulantes, y como consecuencia una menor incidencia de rechazo del trasplante.

Sin embargo los trabajos focalizados en la influencia de los diversos genotipos de TLR4 en la evolución del trasplante, más similares al presente trabajo de tesis doctoral, presentan resultados más dispares. El grupo de Ducloux [116] describió en un estudio sobre 238 receptores de trasplante renal, que aquellos pacientes portadores de ambos polimorfismos presentaban un riesgo reducido de desarrollar eventos arterioscleróticos y rechazo del injerto, aunque a costa de un mayor riesgo de desarrollar infecciones bacterianas y oportunistas. Posteriormente el grupo de Palmer [262] únicamente identificó un menor riesgo en el desarrollo de rechazo del injerto renal cuando el donante era portador de uno o los dos SNPs de TLR4 en una cohorte de 235 pacientes. Finalmente el trabajo más reciente del grupo de Nogueira y colaboradores, no identificó diferencias en las tasas de rechazo del injerto para la presencia de los polimorfismos de TLR4 ni en receptores ni en donantes de 201 parejas de trasplante renal [263]. En trasplante hepático, recientemente el grupo de Oetting analizó la influencia de 37 polimorfismos de TLR4 en 738 donantes del injerto hepático. No identificó ninguna asociación entre la presencia de los polimorfismos de TLR4 Asp299Gly y Thr399Ile en la pérdida del injerto hepático a largo plazo [264].

La frecuencia descrita para población caucásica de los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile se estima en torno al 5-10% [91]. Estas frecuencias tan discretas implican la necesidad de estudiar amplias cohortes de pacientes en las que el número de pacientes portadores de los polimorfismos sea el adecuado y proporcione la suficiente potencia estadística. Por otro lado, estas bajas frecuencias han impedido el estudio del efecto de los SNPs de TLR4 homocigotos para la variante. Tanto en nuestro trabajo en receptores, como el de Oetting en donantes [264], probablemente el número de pacientes incluidos, 483 y 738 respectivamente, no fue suficiente para la obtención de asociaciones significativas. Para poder esclarecer el efecto de la presencia de estos SNPs en la evolución del trasplante se requiere incrementar el número de sujetos a estudio.

En relación a las infecciones, la situación es similar a la de la evolución del injerto. Aunque tradicionalmente se ha asociado la presencia de estos SNPs con una mayor predisposición a infecciones por bacterias gram negativas [94, 95], en un estudio reciente sobre 706 receptores de trasplante hepático no se ha confirmado esta asociación [265], del mismo modo que nuestros resultados sobre 515 receptores de trasplante hepático tampoco ha mostrado ninguna relación significativa en relación a la aparición de infecciones bacterianas, víricas o fúngicas. En este aspecto también se requeriría incrementar los pacientes incluidos en los estudios para poder esclarecer la relación entre los SNPs de TLR4 y las complicaciones infecciosas.

3. Bw4 es el único ligando HLA conocido para los receptores KIR protector frente al rechazo del injerto

Identificamos un efecto protector e independiente de las restantes variables de Bw4 frente al rechazo del injerto. Los receptores de trasplante con alelos serológicos Bw4 presentaron significativamente menor incidencia de rechazo del injerto y una mayor supervivencia libre de rechazo desde el segundo mes post-trasplante, respecto a los pacientes con el alelo serológico Bw6. Este hallazgo apunta hacia la existencia de un papel de las células NK del receptor frente al trasplante hepático, en el que podrían ser

importantes los procesos de educación de las células NK, ya que mientras que Bw4 es un ligando para KIR, Bw6 no lo es.

Existe escasa información acerca del efecto de Bw4 en el trasplante. En HSCT se ha identificado que los receptores negativos para Bw4 y para sus receptores KIR3DS1/KIR3DL1, que recibieron trasplantes positivos para estos receptores KIR presentaron la peor supervivencia, lo que sugiere un papel perjudicial de las células NK del donante KIR3DS1/3DL1 positivas en receptores Bw4-negativos en ausencia de un proceso de educación de células NK mediado por la interacción KIR3DL1/Bw4 [266]. Aunque en el presente trabajo no analizamos el efecto de las interacciones KIR/HLA individuales ni el de las interacciones entre donante y receptor, nuestros resultados, y los del trabajo citado sobre trasplante hematopoyético, sugieren un papel protector de las moléculas Bw4 del receptor para los trasplantes.

Como se ha mencionado, los determinantes Bw4 son ligandos para aKIR3DS1 y para iKIR3DL1. Sin embargo, la afinidad de los ligandos por los receptores inhibidores es muy superior a la de los activadores, y en caso de que se encontraran ambos receptores KIR, la señal inhibidora anularía la activadora [205, 206]. La presencia de Bw4 interaccionaría preferencialmente con iKIR3DL1, inhibiendo la actividad citolítica de las células NK, limitando así la respuesta inmune desencadenada y protegiendo el injerto frente al rechazo. En coherencia con esta explicación, es preciso señalar que, aunque de forma no significativa, encontramos también que los pacientes con un mayor número de interacciones inhibitorias KIR/HLA (igual o superior a 4) presentaron menor tasa de rechazo y supervivencias libres de rechazo más prolongadas que los individuos con menos de 4 interacciones. Estos mismos resultados (los efectos protectores de Bw4 y de un mayor número de interacciones inhibitorias KIR/HLA) se observaron al analizar de forma individualizada el subgrupo de pacientes trasplantados por VHC. En nuestra cohorte, no se cuantificaron sin embargo las interacciones 3DS1/Bw4 de carácter activador, lo que podría suponer una limitación para una completa comprensión del papel de estas moléculas y sus interacciones sobre la evolución de los injertos hepáticos.

Por último es importante señalar que el efecto protector de Bw4 se observó en especial tras el segundo mes post-trasplante, cuando predominan los efectos característicamente inmunológicos, y comienzan a disminuir los resultantes del proceso quirúrgico.

4. Un repertorio KIR predominantemente activador potencia el rechazo del injerto

Para la identificación de la influencia del repertorio KIR en la evolución clínica del trasplante hepático, se realizaron diversos tipos de comparaciones: presencia de haplotipos KIR AA o Bx, número de receptores presentes (totales, aKIR, iKIR e interacciones de ambos con sus ligandos presentes simultáneamente en el receptor de trasplante) tanto en número absoluto como agrupados siguiendo criterios biológicos. De todas estas, únicamente identificamos que aquellos pacientes que desarrollaron rechazo del injerto tras el segundo mes post-trasplante, presentaron significativamente un número medio de receptores totales superior (9.11 receptores) al de los pacientes que no desarrollaron rechazo (7.76 receptores).

Previamente ya se habían descrito asociaciones en esta línea. En HSCT se identificó que los haplotipos B, con mayor número de receptores activadores reducían la recaída de Leucemia Mieloide Aguda [267, 268] y el grupo de Kunert describió que los perfiles predominantemente inhibitorios reducían la incidencia de rechazo en pacientes de trasplante renal [222]. Un mayor número de receptores totales, equivale a la presencia de mayor número de receptores activadores y correspondería a haplotipos B ya que, mientras los haplotipos A presentan únicamente 4 iKIR y uno o ningún aKIR, los haplotipos B pueden construirse por entre 2 y 6 de ambos tipos de receptores KIR [190]. A igualdad de receptores inhibidores, los haplotipos KIR B, siempre presentarían mayor número de receptores totales a costa de un mayor número de receptores aKIR, que potenciarían la respuesta citolítica de las células NK sobre el injerto trasplantado desencadenando una respuesta inmune frente al mismo y con esta, el rechazo del injerto.

Sin embargo, no observamos como cabría esperar, esta misma asociación en el análisis por haplotipos KIR, ni en el del número medio de receptores aKIR. En el primer caso, comparamos haplotipos homocigotos AA frente a los homocigotos BB y

heterocigotos AB (Bx). De esta forma al incluir en el grupo Bx los pacientes AB que presentan un haplotipo A con 1 o ningún aKIR, se ve reducido el número de receptores activadores en el cómputo global del grupo Bx, proporcionando una posible explicación sobre la ausencia de diferencias. En el segundo caso (ausencia de un efecto del número de receptores aKIR sobre el rechazo del aloinjerto), podría deberse a las diferencias en el conteo del receptor aKIR2DL4 entre los receptores totales y los receptores aKIR. El receptor KIR2DL4 constituye una excepción a los restantes receptores KIR. Puede desencadenar una función tanto activadora como inhibidora, si bien es cierto, que es predominante la activación, aunque también de una forma particular, ya que su actividad citolítica es minoritaria y promueve mayoritariamente la liberación de citoquinas proinflamatorias, por lo que se encuentra expresado principalmente en el subtipo de células NK CD56^{bright} y esta se reduce conforme la célula madura [269]. Cuando se determinó el número de receptores KIR2DL4, se incluyó en el conteo total pero no para los receptores aKIR, ya que no está claramente establecida su funcionalidad y esta es dependiente de la expresión de su ligando HLA-G. La inclusión diferencial de este receptor promotor de una respuesta proinflamatoria, que ha sido asociada recientemente con la modulación del rechazo del injerto [270, 271], explicaría por qué se identificó la asociación significativa únicamente en el análisis en el que se incluyó el receptor KIR2DL4 (número total de receptores) y no en el de los receptores aKIR.

5. En pacientes trasplantados por cirrosis por VHC la presencia de haplotipos Bx incrementa el desarrollo de recidiva por este virus

La cirrosis por infección por VHC es la causa mayoritaria del trasplante hepático. Del mismo modo, la recidiva por este virus, descrita prácticamente en el 100% de estos pacientes trasplantados a 5 años post-trasplante [272], supone una de las principales causas de la reducción en la funcionalidad del injerto conduciendo a la pérdida del mismo o incluso al fallecimiento del paciente [273].

Los resultados obtenidos mostraron que todos aquellos pacientes trasplantados por VHC, que durante el año de seguimiento desarrollaron recidiva por VHC, eran portadores de genotipos Bx. Estos resultados inicialmente podrían considerarse sorprendentes ya que los haplotipos Bx se asociarían funcionalmente con células NK con mayor activación y deberían en teoría facilitar una respuesta antiviral más potente y menores tasas de recidiva por VHC por su capacidad de control más eficiente en este tipo de infecciones. De hecho, aunque los datos del efecto del genotipo KIR sobre la infección por VHC son todavía muy escasos, López-Vázquez A y colaboradores reportaron un efecto protector del receptor activador KIR3DS1 sobre el desarrollo de carcinoma hepatocelular en pacientes con infección por VHC [274], y el grupo de Espadas de Arias describió, en una serie de 151 trasplantes hepáticos, una correlación positiva entre la presencia del receptor inhibidor KIR2DL3 en los receptores y la progresión hacia fibrosis en los pacientes con recidiva por VHC [229].

Sin embargo, también existen datos en la literatura en sentido opuesto. Así, en el reciente estudio de Umemura y colaboradores se describe que la interacción inhibidora KIR3DL1/HLA-Bw4, es un factor independiente que predice los individuos con respuesta antiviral mantenida en pacientes infectados con VHC de genotipo 1b, que han sido tratados con combinaciones de telaprevir/interferón pegilado/ribavirina o de éstos dos últimos componentes [275]. De forma similar, el grupo de Vidal-Castiñeira describe que en pacientes infectados por VHC y tratados con la combinación interferón pegilado/ribavirina, los genotipos centroméricos AA (teóricamente más inhibitorios) fueron significativamente más frecuentes entre los pacientes que hicieron respuestas antivirales sostenidas mientras que los genotipos centroméricos BB (teóricamente más activadores) fueron más frecuentes entre los pacientes no respondedores [276].

Es importante recordar que en nuestro estudio, en el grupo de pacientes trasplantados por VHC el genotipo Bx se presentó con una frecuencia muy superior al genotipo AA (41 pacientes Bx frente a 5 pacientes con haplotipos AA), lo que ayuda a comprender la asociación que encontramos. El enriquecimiento de genotipos Bx, que en teoría proporcionarían mayor protección antiviral, en pacientes que se han sometido a trasplante

hepático por infección por VHC, podría reflejar que la infección fue más severa en pacientes con genotipos AA y por tanto, estos pacientes podrían haber fallecido antes de poderse someter al trasplante. El diseño de estudios para comprobar esta hipótesis sería muy oportuno y permitiría, de confirmarse, contar con una herramienta importante de estratificación del riesgo, priorización en el tratamiento y predicción de respuesta en pacientes con infección y trasplante por VHC.

6. El desarrollo de eventos infecciosos está determinado por el repertorio genético del sistema KIR-HLA

En el análisis de la correlación entre haplotipos KIR y de sus ligandos, receptores KIR e interacciones activadoras e inhibitoras, con la susceptibilidad a infecciones post-trasplante, no se encontró que ninguna de esas variables genotípicas fuera un factor de riesgo independiente. Este resultado no es sorprendente y sugiere, por un lado, una posible falta de potencia estadística del tamaño muestral y frecuencia de eventos en nuestra cohorte. Por otro lado, y de mayor importancia, revela que la susceptibilidad para sufrir infecciones en un paciente trasplantado y sometido a inmunosupresión depende de una constelación muy compleja de factores. Considerando únicamente el estudio del papel defensivo de las células NK, nuestro estudio queda limitado, por ejemplo, por la falta de información sobre las interacciones entre los KIR del receptor y las moléculas HLA presentes en los hígados trasplantados, o la falta de información sobre el impacto de la expresión de distintos KIR en las células NK en la aparición de la infección. No obstante se discuten a continuación las asociaciones y tendencias más significativas que se han encontrado.

En primer lugar se observó que en los pacientes cuya primera infección fue de etiología vírica, el haplotipo KIR AA fue mayoritario, en comparación con los pacientes que no se infectaron. El haplotipo KIR AA se encontró en una frecuencia superior al doble que el haplotipo KIR Bx en los pacientes que sufrieron infecciones por virus, fueran estas primarias o de repetición. Además, los pacientes KIR AA que sufrieron una infección de

cualquier tipo, una infección bacteriana o una infección vírica, lo hicieron antes que los pacientes con genotipo KIR Bx. Estas observaciones se explican fácilmente si recordamos que los haplotipos KIR AA tienen una composición predominantemente inhibitoria. En la escasa literatura existente al respecto, dos trabajos recientes, que reportan que los haplotipos B protegen a los pacientes trasplantados de la infección por CMV [277, 278], apoyan en cierto modo nuestros datos.

Cuando se evaluó el significado de los ligandos HLA de KIR sobre la infección, no se identificó efecto alguno para Bw4, pero se encontró una tasa superior de genotipos HLA-C1C2 entre los pacientes que sufrieron cualquier tipo de infección en comparación con los que no se infectaron, y en particular entre los pacientes que sufrieron infecciones de etiología bacteriana. Se observó además, en los individuos cuya primera infección fue viral, que ésta sucedió mucho antes en receptores HLA-C1C1 (0.56 meses de media), y que el genotipo C2C2 triplicaba el tiempo de aparición (1.61 meses de media), mientras que el genotipo “intermedio” C1C2 mostró una supervivencia libre de infección vírica intermedia entre las de ambos genotipos homocigotos (1.19 meses). Este aparente papel protector de las moléculas C2 contrasta con los datos de un estudio previo que, en un modelo in vitro de infección por virus influenza A, mostró que las células NK de individuos HLA-C1C1 respondían más rápida y robustamente con secreción de IFN- γ y degranulación de CD107a que las de individuos HLA-C2C2 [279]. Las diferencias en el diseño entre el trabajo citado y el que se presenta en esta tesis, pueden explicar los distintos resultados obtenidos. Entre esas diferencias es importante subrayar, por ejemplo, que el modelo de esos investigadores utiliza el virus influenza A, mientras que en nuestra cohorte de pacientes trasplantados hepáticos las infecciones víricas más frecuentes fueron causadas por Herpesvirus, en particular VHS, VVZ y CMV. Por otro lado existen dos trabajos muy recientes que proponen un papel de HLA-C en la defensa frente a infección por CMV en individuos trasplantados. El primero de ellos estudió el significado de HLA-C en la reactivación de la infección por CMV tras el trasplante hematopoyético en pacientes HLA idénticos [280]. En el segundo trabajo se demostró, en pacientes trasplantados con órganos sólidos, que los receptores positivos para KIR2DL3 y KIR2DS2 que sólo expresaban

antígenos HLA-C1 (tanto en el receptor como en el donante) tuvieron unas viremias por CMV significativamente reducidas durante el primer año post-trasplante, y este efecto desaparecía si el receptor recibía un órgano que no fuera HLA-C1C1 [281]. Estos resultados junto con los del presente trabajo sugieren que las moléculas HLA-C pueden jugar un papel importante en la defensa principalmente antiviral en los pacientes trasplantados. Sería necesario realizar más estudios para profundizar en su comprensión.

En el análisis del significado de las interacciones KIR-HLA inhibitoras o activadoras sobre la aparición de infecciones en trasplantados, se observó, en primer lugar, que en los pacientes cuya primera infección fue vírica, el número medio de interacciones aKIR-HLA fue superior en comparación con los pacientes que no se infectaron. Además, la presencia de una o más interacciones activadoras en el receptor del trasplante, se asoció con una frecuencia significativamente aumentada de infecciones de etiología vírica (primeras o de repetición) en comparación con la ausencia de estas interacciones. Los sujetos que sufrieron una primera infección vírica lo hicieron mucho más tarde si tenían 3 o más interacciones iKIR-HLA que los que tenían menos de 3. Para entender la aparente contradicción de que individuos con células NK teóricamente más capacitadas de forma basal, tengan mayor tendencia a sufrir infecciones virales y que las interacciones inhibitorias retrasen su aparición, debe recordarse que los virus de la familia Herpes modulan la expresión de las moléculas HLA de la superficie celular como mecanismo de escape, lo que deriva en la pérdida de la señalización correspondiente en la población celular de NK. Por tanto las asociaciones descritas, de ser confirmadas en otros estudios, no pueden explicarse atendiendo a la funcionalidad de las interacciones de forma directa. La validez de las interacciones aKIR-HLA o iKIR-HLA, como marcadores de riesgo o protección de infección viral, debería confirmarse en estudios epidemiológicos más amplios.

Por último se observó que en los pacientes cuya primera infección fue bacteriana, aquéllos con 3 o más interacciones KIR-HLA inhibitorias, se infectaron significativamente antes que los pacientes con menos de tres. Este resultado resulta llamativo si atendemos a que la principal capacidad defensiva de las células NK es de carácter antiviral. Sin

embargo, hace ya algún tiempo se sabe que las células NK expresan en particular TLR3 y TLR9, que tras reconocer sus ligandos microbianos poli I:C y CpG ODN respectivamente, favorecen la síntesis de citoquinas y aumentan de la citotoxicidad de las NK. En este mecanismo, el receptor inhibitor KIR3DL2 es el responsable de la captación y traslado de CpG ODN hacia los compartimentos intracelulares donde se encuentra TLR9. Resulta llamativo que la interacción entre KIR3DL2 y este PAMP deriven en la activación de la célula NK y no en su inhibición, a pesar de ser el mencionado KIR un receptor de carácter inhibitor tras el reconocimiento de su ligando HLA correspondiente. Aunque otros receptores KIR pueden ligar CpG ODN, KIR3DL2 es el único con capacidad para dirigirlo hacia los reservorios de TLR9 y generar una respuesta de IFN- γ de forma eficiente. Además, KIR3DL2 se encuentra en todos los haplotipos y por tener una capacidad inhibitoria reducida tras el encuentro con sus ligandos HLA-A3 y -A11, suele acompañarse de otros receptores KIR inhibidores [282]. Todas las células NK cuentan por tanto con un mecanismo para captar la amenaza bacteriana. La capacidad de modular la respuesta inflamatoria y adaptativa por parte de las células NK podría depender, posteriormente, de su grado de activación o inhibición de base, que permitiría mayor o menor capacidad de producción de citoquinas y quimioquinas y de amplificación de la respuesta antimicrobiana. Estos recientes conocimientos sobre la biología de las células NK resultarían coherentes con nuestra observación de que los pacientes con mayor número de interacciones KIR-HLA inhibitorias sufren infecciones bacterianas de manera más precoz, en un escenario de pacientes trasplantados y sometidos a inmunosupresión dirigida sobre todo a la inmunidad adaptativa.

VI. Conclusiones

1. La identificación de los alelos del factor C3 del sistema del complemento mediante la metodología RT-PCR-HRM es una alternativa de mayor sensibilidad y capacidad resolutoria frente a la técnica tradicional de referencia t-ARMS.

2. Las variantes genéticas del factor C3 del complemento del receptor del injerto, independientemente del genotipo del hígado donado, modifican la evolución del injerto:

2.a) Los genotipos homocigotos C3FF y la variante alélica C3F se asociaron a una mayor pérdida del injerto, así como a un desarrollo más temprano del mismo, comportándose como variables de riesgo independientes.

2.b). La homocigosis C3FF y la presencia de la variante alélica C3F ejercieron un efecto protector independiente frente al rechazo del injerto, reduciendo la incidencia del mismo y prolongando el tiempo libre de este evento.

2.c) El genotipo C3FF del sistema del complemento es un factor de riesgo independiente para la aparición de infecciones víricas, representadas en la mayoría por VHS, VVZ y CMV.

Por tanto el genotipado de C3 del receptor del trasplante hepático podría ser útil para estratificar el riesgo y personalizar las medidas terapéuticas y preventivas.

3. Las variantes genéticas de TLR4-299 y -399 no influyen en la supervivencia del paciente o del injerto, ni en el rechazo del injerto o la aparición de infecciones.

4. Los polimorfismos de TLR4 y C3 no influyen en la recidiva de la infección por VHC en el primer año en la cohorte de pacientes trasplantados por esta causa, ni en la supervivencia de los pacientes, injertos y tasas de rechazo.

5. En el estudio de los efectos del sistema KIR y sus ligandos HLA:

5.a) La presencia del alelo Bw4 en los receptores hepáticos es un factor protector independiente para la aparición de rechazo y este efecto es especialmente visible a partir del 2º mes post-trasplante.

5.b) No se encuentran otros factores en el sistema KIR-HLA de susceptibilidad o protección para supervivencia, rechazo o infecciones que sean independientes. No obstante las asociaciones estadísticas sugieren que los antígenos HLA-C y el número de interacciones de carácter activador o inhibidor presentes en el genotipo del receptor, podrían jugar un papel relevante en la aparición de infecciones víricas y bacterianas durante el primer año tras el trasplante.

VII. Bibliografía

1. Sleisenger MH. et al. *Gastrointestinal and Liver Disease* 7ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2004.
2. Townsend CM. et al. *Sabiston Tratado de Cirugía* 18 ed. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences, 2009.
3. Gomes-da-Silveira PA. et al. *Fisiología Hepática. Capítulo 2: Anatomía y Fisiología Hepática*. In. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2006.
4. Biblioteca diagnóstica. [Fecha de acceso: Junio 2013]; Available from: <http://www.bibliotecagnostica.net>
5. Starlz TE. et al. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117 (6):659-676.
6. Starlz TE. et al. Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg* 1968;168(3):392-415.
7. In: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Liver transplantation; 1983 June 20-23, 1983: *Hepatology*; Suppl: 107S-110S 1983.
8. Margarit C. et al. Orthotopic hepatic transplant in a patient with hepatocarcinoma. *Rev Esp Enf Apar Dig* 1984;66(3):234-239.
9. Organización Nacional de Trasplantes. Ministerio de sanidad, Servicios sociales e Igualdad. Gobierno de España. [Fecha de acceso Junio de 2013]; Available from: <http://www.ont.es>.
10. Varma V. et al. Indications and contraindications of liver transplantation. *Int J Hepatol* 2011;doi: 10.4061/2011/121862.
11. Abrahamson O. et al. Current status of pediatric liver transplantation. *Clin Liver Dis* 2000;4:533-552.
12. Lucey M. et al. Minimal criteria for placement of adults on the liver transplant waiting list: a report of a national conference organized by the American Society of Transplant Physicians and the American Association for the Study of Liver Diseases. *Liver Transpl Surg* 1997;3(6):628-637.
13. United Network for Organ Sharing [Fecha de acceso Junio de 2013]; Available from: <http://www.unos.org>.
14. Eurotransplant Manual 5ed .Eurotransplant National Foundation. [Fecha de acceso Junio de 2013]; Available from: <http://www.eurotransplant.org>.
15. Pine JK. et al. Liver Transplantation Following Donation After Cardiac Death: An Analysis Using Matched Pairs. *Liver Transpl Surg* 2009;15(9):1072-1082.

16. Bar ML. et al. A report of the Vancouver forum on the care of the live organ donor: lung, liver, pancreas and intestine data and medical guidelines. *Transplantation* 2006;81:1373-1385.
17. Gralnek JM. et al. Development and evaluation of the liver disease quality of life instrument the LDQOL. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3552-3656.
18. Arroyo V. et al. Treatment of liver diseases. In. Barcelona: Grupo Ars XXI de Comunicación S.L, 2009.
19. Zarrinpar A. et al. Immunomodulating options for liver transplant patients. *Expert Rev Clin Immunol* 2012;8(6):565-578.
20. Zhai Y. et al. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptative immune-mediated tissue inflammation. *Am J Transplant* 2011;11(8):1563-1569.
21. Weigand K. et al. Ischemia/reperfusion injury in liver surgery and transplantation: pathophysiology. *HPB Surgery* 2012;doi: 10.1155/2012/176723.
22. Hines JN. et al. Regulation of postischemic liver injury following different durations of ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284 (3):G536-545.
23. Husted TL. et al. The role of cytokines in pharmacological modulation of hepatic ischemia/reperfusion injury. *Curr Pharm Des* 2006;12 (23):2867-2873.
24. Andrukhiv A. et al. Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H2067-H2074.
25. Phillips L. et al. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009;22 (1):46-55.
26. Jaeschke H. et al. Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *J Invest Surg* 2003;16 (3):127-140.
27. Abu-Amara M. et al. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks-a review. *Liver Transpl Surg* 2010;16(9):1016-1032.
28. Jaeschke H. et al. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1993;264:G801-G809.
29. Schwabe RF. et al. Mechanisms of liver injury. TNF- α induced liver injury: Role of JKK, JNK and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G583-G589.

30. Wang H. et al. Endogenous danger signals trigger hepatic ischemia/reperfusion injury through toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa beta pathway *Chin Med J (Engl)* 2007;120(6):509-514.
31. Bamboat ZM. et al. Toll-like Receptor 9 inhibition confers protection from liver ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2010;51: 621-632.
32. Zeng S. et al. Blockade of receptor for advanced glycation end product (RAGE) attenuates ischemia and reperfusion injury to the liver in mice. *Hepatology* 2004;39:422-432.
33. Zeng S. et al. Receptor for advanced glycation end product (RAGE)-dependent modulation of early growth response-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Hepatol* 2009;50: 929-936.
34. Hanschen M. et al. Reciprocal activation between CD4+ T cells and Kupffer cells during ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2008;86(5):710-718.
35. Jaeschke H. et al. Mechanisms of liver injury II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(6):G1083-G1088.
36. Martinu T. et al. Acute Allograft Rejection: Cellular and Humoral Processes. *Clin Chest Med* 2011;32(2):295–310.
37. Desai M. et al. Chronic liver allograft dysfunction. *Transplant Proc* 2009;41:773–776.
38. Bert F. et al. Microbial epidemiology and outcome of bloodstream infections in liver transplant recipients: an analysis of 259 episodes. *Liver Transpl Surg* 2010;16:393-401.
39. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2007;357:2601-2614.
40. Salavert M. et al. Role of viral infections in immunosuppressed patients. *Med Intensiva* 2011;35(2):117-125.
41. Romero F. et al. Infections in liver transplant recipients. *World J Hepatol* 2011; 3(4):83-92.
42. del-Pozo J. Update and actual trends on bacterial infections following liver transplantation *World J Gastroenterol* 2008;14: 4977-4983.
43. Levitsky J. et al. Viral hepatitis in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9(Suppl 4): S116-S130.

44. Proia L. et al. Endemic fungal infections in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9 (Suppl 4):S199-S207.
45. Steininger C. Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(10):953-963.
46. Razonable R. Cytomegalovirus infección after liver transplantation: current concepts and challenges. *World J Gastroenterol* 2008;14 (31):4869-4860.
47. Gerna G. et al. Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *J Gen Virol* 2008;89: 853–865.
48. La-Rosa C. et al. The immune response to human CMV. *Future Virol* 2012;7(3):279–293.
49. Gamadia L. et al. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN–producing CD4T cells in protection against CMV disease. *Blood* 2003;101:2686-2692.
50. Miller-Kittrell M. et al. Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Virol J* 2009;6:4.
51. Loenen WA. et al. Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology. *Semin Immunol* 2001;13:41-49.
52. Razonable R. et al. Infections and allograft rejection-interwined complications of organ transplantation. *Swiss Med Wkly* 2005;135:571-573.
53. Pastacaldi S. et al. Hepatic artery thrombosis after liver orthotopic transplantation: a review of nonsurgical cases. *Liver Transpl Surg* 2001;7: 294-297.
54. Akbulut S. et al. Graft-versus-host disease after liver transplantation: a comprehensive literature review. *World J Gastroenterol* 2012;18:5240-5248.
55. Chaib E. et al. Graft-versus-host disease after liver transplantation. *Clinics* 2011;66:1115-1118.
56. Taylor AL. et al. Acute graft versus host disease following liver transplantation: the enemy within *Am J Transplant* 2004;4:466-474.
57. Transplant Pathology Internet Services.University of Pittsburg. [Fecha de acceso Febrero 2013]; Available from: <http://tpis.upmc.com>
58. Walling HW. et al. Lichenoid graft vs. host disease following liver transplantation. *J Cutan Pathol* 2004;31:179-184.
59. Maddrey WC. et al. *Transplantation of the liver* 3ed. Philadelphia, PA, 2001.

60. Macedo C. et al. Contribution of naïve and memory T cells populations to human alloimmune response. *Am J of Transplant* 2009;9:2057-2066.
61. Brennan T. et al. Innate pathways of Immune Activation in Transplantation. *J Transplant* 2010;doi:10.1155/2010/826240.
62. Murphy K. et al. *Inmunobiología de Janeway 7ed.* Santa Fe, México: McGraw-Hill Interamericana, 2009.
63. Abbas AK. et al. *Cellular and molecular immunology 7ed.* Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2012.
64. Stitaya S. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2011;29:1-14.
65. Oberbamscheidt MH. et al. The innate immune system in transplantation. *Semin Immunol* 2011;23(4):264-272.
66. Takenuchi O. et al. MDA/RIG-1 and virus recognition. *Curr Opin Immunol* 2008;20:17-22.
67. Brown GD. et al. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 2001;413:36-37.
68. Bottazzi B. et al. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol* 2010;28:157-183.
69. Netea MG. et al. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol* 2012;13:535-542.
70. Medzhitov R. et al. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-397.
71. Iwasaki A. et al. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987-995.
72. Meyer LR. et al. The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2013. *Nucleic Acids Res* 2013;41(Database issue):D64-69.
73. Akashi-Takamura S. et al. Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. *J Infect Chemother* 2006;12:233-240.
74. Kim H. et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 2007;130: 906-917.
75. Kumar H. et al. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int Rev Immunol* 2011;30:16-34.

76. Kang Y. et al. Regulation of 4-1BBL-mediated inflammation at the late phase of TLR response (P1228). *J Immunol* 2013;190:138.112.
77. Yamamoto M. et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301(5633):640-643.
78. Wesche H. et al. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997;7:837-847.
79. Li S. et al. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5567–5572.
80. Wang C. et al. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001;412:346-351.
81. Hacker H. et al. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006;357:re13.
82. Zandi E. et al. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 1997;91:243–252.
83. Chang L. et al. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001;410:37-40.
84. Kagan JC. et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta *Nat Immunol* 2008;9:361–368.
85. Guo B. et al. Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *J Biol Chem* 2007;282:11817-11826.
86. Fitzgerald KA. et al. IKK epsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4:491-496.
87. Sharma S. et al. Triggering the interferon antiviral response through an IKK related pathway. *Science* 2003;300:11488-11151.
88. Thanos D. et al. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 1995;83:1091-1100.
89. Vandenabeele P. et al. The role of the IAP E3 ubiquitin ligases in regulating pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2012;12(12):833-844.
90. Smirnova I. et al. Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics* 2001;158:1657-1664.

91. Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. [Fecha de acceso Mayo 2013]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
92. Stenson PD. et al. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): 2008 Update. *Genome Med* 2009;1(1):13.
93. Ohto M. et al. Structural Analyses of Human Toll-like Receptor 4 Polymorphisms D299G and T399L. *J Biol Chem* 2012;287:40611-40617.
94. Arbour NC. et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-191.
95. Schröder NWJ. et al. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet* 2005;5(3):156-164.
96. Ferwerda B. et al. Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms. *Mol Med* 2008;14:346-352.
97. Rallabhandi P. et al. Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/ MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol* 2006;177:322-332.
98. Figueroa L. et al. The Asp299Gly Polymorphism Alters TLR4 Signaling by Interfering with Recruitment of MyD88 and TIR domain containing adapter inducing IFN- β 1. *J Immunol* 2012;188(9):4506-4515.
99. Lorenz E. et al. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with Gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002;162:1028-1032.
100. Tal G. et al. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis* 2004;189:2057–2063.
101. Pulido I. et al. The TLR4 Asp299Gly polymorphism is a risk factor for active tuberculosis in Caucasian HIV-infected patients. *Curr HIV Res* 2010;8:253-258.
102. Franchimont D. et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299Gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004;53:987–992.
103. Vogel SN. et al. Mutations in TLR4 signaling that lead to increased susceptibility to infection in humans: an overview. *J Endotoxin Res* 2005;11:333-339.
104. Schnare M. et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001;2(10):947-950.
105. Seki E. et al. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 2008;48(1):322-335.

106. Howell J. et al. Role of toll-like receptors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2014;20(3):270-280.
107. Alegre M. et al. Toll-like receptor signaling in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13(4):358-365.
108. Chen L. et al. TLR engagement prevents transplantation tolerance. *Am J Transplant* 2006;6(10):2282-2291.
109. Thornley T. et al. TLR agonists abrogate costimulation blockade-induced prolongation of skin allografts. *J Immunol* 2006;176(3):1561-1570.
110. Tesar B. et al. TH1 immune responses to fully MHC mismatched allografts are diminished in the absence of MyD88, a toll-like receptor signal adaptor protein. *Am J Transplant* 2004;4(9):1429-1439.
111. Peng G. et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 2005;309(5739):1380-1384.
112. Pasare C. et al. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003;299(5609):1033-1036.
113. Deng J. et al. The role of toll-like receptors 2 and 4 in acute allograft rejection after liver transplantation. *Transplant Proc* 2007;39(10):3222-3224.
114. Testro A. et al. Acute allograft rejection in human liver transplant recipients is associated with signaling through toll-like receptor 4. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26(1):155-163.
115. Palmer S. et al. The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(6):628-632.
116. Ducloux D. et al. Relevance of Toll-like receptor 4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int* 2005;67(6):2454-2461.
117. Eid A. et al. Association between toll-like receptor polymorphisms and the outcome of liver transplantation for chronic hepatitis C virus. *Transplantation* 2007;84(4):511-516.
118. Dhillon N. et al. A single nucleotide polymorphism of Toll-like receptor 4 identifies the risk of developing graft failure after liver transplantation. *J Hepatol* 2010;53:67-72.
119. Citores M. et al. Toll-like receptor 3 L412F polymorphism may protect against acute graft rejection in adult patients undergoing liver transplantation for hepatitis C-related cirrhosis. *Transplant Proc* 2011;43(6):2224-2226.
120. Tsung A. et al. Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells. *J Immunol* 2005;175(11):7661-7668.

121. Bordet J. et al. Sur l'existence des substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. *Ann Inst Pasteur* 1901;15(289-302).
122. Sahu A. et al. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev* 2001;180:35-48.
123. Janssen BJ. et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature* 2005;437:505-511.
124. Sarma JV. et al. The Complement System. *Cell Tissue Res* 2011;343(1):227-235.
125. Bally I. et al. Identification of the C1q binding sites of human C1r and C1s: a refined three-dimensional model of the C1 complex of complement. *J Biol Chem* 2009;284(19340-19348).
126. Krishnan V. et al. The crystal structure of C2a, the catalytic fragment of classical pathway C3 and C5 convertase of human complement. *J Mol Biol* 2007;367:224-233.
127. Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:346-353.
128. Davis A. et al. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol* 2008;45(16):4057-4063.
129. Torreira E. et al. 3D structure of the C3bB complex provides insights into the activation and regulation of the complement alternative pathway convertase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:882-887.
130. Narayana Y. et al. Structural biology of the alternative pathway convertase. *Immunol Rev* 2001;180:123-135.
131. Hegger PS. et al. Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *J Exp Med* 2005;201:1523-1530.
132. Seya T. et al. Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and functions. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1255-1260.
133. Turnberg D. et al. The regulation of the complement system: insights from genetically-engineered mice. *Mol Immunol* 2003;40:145-153.
134. Morgan B. et al. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin Exp Immunol* 1997;107:1-7.
135. Wu J. et al. Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nat Immunol* 2009;10:728-733.
136. Gál P. et al. Serine proteases of the classical and lectin pathways: similarities and differences. *Immunobiology* 2007;212:267-277.

- 137.Dobo J. et al. MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J Immunol* 2009;183:1207-1214.
- 138.Jack DL. et al. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 2001;180(86–99.).
- 139.Lu J. et al. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:387–400.
- 140.Rawal N. et al. Structure/function of C5 convertases of complement. *Int Immunopharmacology* 2001;1:415-422.
- 141.Hadders MA. et al. Assembly and Regulation of the Membrane Attack Complex Based on Structures of C5b6 and sC5b9. *Cell Rep* 2012;1(3):200–207.
- 142.Lovelace LL. et al. Structure of human C8 protein provides mechanistic insight into membrane pore formation by complement. *J Biol Chem* 2011;286:17585–17592.
- 143.Huang Y. et al. Defining the CD59-C9 binding interaction. *J Biol Chem* 2006;281(37):27398–27404.
- 144.Ricklin D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010;11:785-797.
- 145.Alper CA. et al. Genetic polymorphism of the third component of human complement (C₃). *J Clin Invest* 1968;47:2181-2191.
- 146.Wieme RJ. et al. Genetically determined electrophoretic variant of the human complement component C3. *Nature* 1967;214:1042-1043.
- 147.Botto M. et al. Molecular basis of polymorphisms of human complement component C3. *J Exper Med* 1990;172:1011-1017.
- 148.Heurich M. et al. Common polymorphisms in C3, factor B and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108 (21):8761-8766.
- 149.Finn JE. et al. Molecular analysis of C3 allotypes in patients with systemic vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9(11):1564-1567.
- 150.Finn JE. et al. Molecular analysis of C3 allotypes in patients with nephritic factor. *Clin Exp Immunol* 1993; 91:410-414.
- 151.Brönnestam R. Studies of the C3 polymorphism: relationship between C3 phenotypes and rheumatoid arthritis. *Hum Hered* 1973;23:206-213
- 152.Papiha S. et al. C3 and Bf complement types in chronic renal failure. *Hum Genet* 1968;72:260-261.

- 153.Park KH. et al. Complement component 3 (C3) haplotypes and risk of advanced age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(7):3386-3393.
- 154.Gigante PR. et al. Polymorphism in complement component 3 (C3F) and complement factor H (Y402H) increase the risk of postoperative neurocognitive dysfunction following carotid endarterectomy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82:247-253.
- 155.Brown KM. et al. Influence of donor C3 allotype on late renal-transplantation outcome. *N Engl J Med* 2006;354(19):2014-2023.
- 156.Varaganam M. et al. C3 polymorphisms and allograft outcome in renal transplantation. *N Engl J Med* 2009;360(9):874-880.
- 157.Bazyar N. et al. Complement C3 Gene Polymorphism in Renal Transplantation (an Iranian Experience). *Gene* 2012;498(2):254-258.
- 158.Dhillon N. et al. Complement Component C3 Allotypes and Outcomes in Liver Transplantation. *Liver Transplantation* 2010;16:198-203.
- 159.Liszewski M. et al. Intracellular Complement Activation Sustains T Cell Homeostasis and Mediates Effector Differentiation. *Immunity* 2013;39(6):1143-1157.
- 160.Strainic M. et al. Locally Produced Complement Fragments C5a and C3a Provide Both Costimulatory and Survival Signals to Naive Cd4+ T Cells. *Immunity* 2008;28(3):425-435.
- 161.Cravedi P. et al. Immune Cell-Derived C3a and C5a Costimulate Human T Cell Alloimmunity. *Am J Transplant* 2013;13(10):2530-2539.
- 162.Heeger P. et al. Novel Roles of Complement in T Effector Cell Regulation. *Immunobiology* 2012;217(2):216-224.
- 163.Pavlov V. et al. Donor Deficiency of Decay-Accelerating Factor Accelerates Murine T Cell-Mediated Cardiac Allograft Rejection. *J Immunol* 2008;181(7):4580-4589.
- 164.Cravedi P. et al. Complement Regulation of T-Cell Alloimmunity. *Semin Nephrol* 2013;33(6):565-574.
- 165.Kwan W. et al. Signaling through C5a Receptor and C3a Receptor Diminishes Function of Murine Natural Regulatory T Cells. *J Exp Med* 2013;210(2):257-268.
- 166.Strainic M. et al. Absence of Signaling into Cd4(+) Cells Via C3ar and C5ar Enables Autoinductive Tgf-Beta1 Signaling and Induction of Foxp3(+) Regulatory T Cells. *Nat Immunol* 2013;14(2):162-171.
- 167.Kemper C. et al. Activation of Human Cd4+ Cells with Cd3 and Cd46 Induces a T-Regulatory Cell 1 Phenotype. *Nature* 2003;421(6921):388-392.

168. Cardone J. et al. Complement Regulator Cd46 Temporally Regulates Cytokine Production by Conventional and Unconventional T Cells. *Nat Immunol* 2010;11(9):862-871.
169. Gallo RL. et al. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:823–831.
170. Dale DC. et al. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 2008;112:935-945.
171. Mekori YA. et al. Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev* 2000;173:131-141.
172. Caligiuri MA. et al. Human Natural killer cells. *Blood* 2008;112:461-469.
173. Rajalingam R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol* 2011;46(4):216-228.
174. Kumar V. et al. A new self: MHC-class-I-independent Natural-killer-cell self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 2005;5:363-374.
175. Robertson MJ. et al. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990;76:2421-2438.
176. Vivier E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331:44-49.
177. Lanier RR. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225-274.
178. McQueen KL. et al. Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol* 2002;14:615-621
179. Harel-Bellan A. et al. Natural Killer Susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5688-5692.
180. Liu WR. et al. Genomic organization of the human leukocyte immunoglobulin-like receptors within the leukocyte receptor complex on chromosome 19q13.4. *Immunogenetics* 2000;51:659–669.
181. Wilson MJ. et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(9):4778–4783.
182. Middleton D. et al. The extensive Polymorphism of KIR genes. *Immunology* 2010;129:8-19.
183. IPD-KIR Database. Cambridgeshire: European Molecular Biology Laboratory. [Fecha de acceso Junio 2013]; Available from: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>

184. Long E. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol Rev* 2008;224:70–84.
185. Martin AM. et al. The genomic organization and evolution of the natural Killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics* 2000;51:268-280.
186. Maureen PM. et al. Cutting Edge: Expansion of the KIR Locus by Unequal Crossing Over. *J Immunol* 2003;171:2192–2195.
187. Hsu KC. et al. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: Evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 2002;169:5118–5129.
188. Williams T. et al. Killer Cell Immunoglobulin-like receptors. *Mol Interv* 2005;5(4):227-240.
189. Garcia CA. et al. Human KIR sequences 2003. *Immunogenetics* 2003;55:227-239.
190. Jiang W. et al. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors. *Genome Res* 2012;22(10):1845-1854.
191. Yawata M. et al. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006;203:633-645.
192. Parham P. et al. Variable NK cell receptors exemplified by human KIR3DL1/S1. *J Immunol* 2011;187:9-11.
193. Norman PJ. et al. Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nat Genet* 2007;39:1092-1099.
194. Shilling HG. et al. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol* 2002; 168:2307-2315.
195. Santourlidis S. et al. Crucial Role of DNA Methylation in Determination of Clonally Distributed Killer Cell Ig-like Receptor Expression Patterns in NK Cells. *J Immunol* 2002;169 (8):4253-4261.
196. Höglund P. et al. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat Rev Immunol* 2010;10:724-734.
197. Williams AP. et al. Hanging in the balance: KIR and Their Role in Disease. *Mol Interv* 2005;5(4):226-240.
198. Marsh SG. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 2010;75:291-455.

- 199.Holdsworth R. et al. The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens* 2008;73:95-170.
- 200.Stewart CA. et al Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating Killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13224-13229.
- 201.Galandrini R. et al. The adaptor protein shc is involved in the negative regulation of NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2001;31:2016-2025.
- 202.Lanier L. Natural Killer Cell Receptor Signaling. *Curr Opin Immunol* 2003;15:308-314.
- 203.Lanier L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008;9(5):495-502.
- 204.Moretta LA. et al. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO* 2004;23(2):255-259.
- 205.Goulder PJ. et al. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature* 2001;412:334-338.
- 206.Betts MR. et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 2006;107:4781-4789.
- 207.Qi Y. et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog* 2006;2(8):e79.
- 208.Jiang Y. et al. KIR3DS1/L1 and HLA-Bw4-80I are associated with HIV disease progression among HIV typical progressors and long-term nonprogressors.*BMC Infectious Diseases* 2013;13:405-416.
- 209.Khakoo SI. et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004;305:872-874.
- 210.Romero V. et al. Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in Hepatitis C virus infection outcome. *Mol Immunol* 2008;45:2429-2436.
- 211.Carrington M. et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med* 2005;201:1069-1075.
- 212.Naumova E. et al. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:172-178.

- 213.Mańczak M. et al. Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol* 2004;65:758-766.
- 214.Slik ARVd. et al. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes* 2003;52:2639-2642.
- 215.Momot T. et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004;50:1561-1565.
- 216.Levinson RD. et al. Combination of KIR and HLA gene variants augments the risk of developing birdshot chorioretinopathy in HLA-A*29-positive individuals. *Genes Immun* 2008;9: 249-258.
- 217.Levinson RD. et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene-cluster 3DS1-2DL5-2DS1-2DS5 predisposes susceptibility to Vogt-Koyanagi- Harada syndrome in Japanese individuals. *Hum Immunol* 2010;71:192-194.
- 218.Levinson RD. et al. Killer Cell Immunoglobulin- like receptors in HLA-B27-associated acute anterior uveitis, with and without axial spondyloarthritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1505-1510.
- 219.Ruggeri L. et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295(5562):2097-2100.
- 220.Ruggeri L. et al. NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40(1):84-90.
- 221.Rajalingam R. Variable interactions of recipient cell immunoglobulin-like receptors with self and allogeneic human leucocyte antigen class one ligands may influence the outcome of solid organ transplants. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13:430-437.
- 222.Kunert K. et al. KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation. *Transplantation* 2007;84(11):1527-1533.
- 223.Hanvesakul R. et al. Donor HLA-C genotype has a profound impact on the clinical outcome following liver transplantation. *Am J Transplant* 2008;8:1931-1941.
- 224.Tran T. et al. Analysis of KIR ligand incompatibility in human renal transplantation. *Transplantation* 2005;80(8):1121-1123.
- 225.Tran T. et al. Reassessing the impact of donor HLA-C genotype on long-term liver transplant survival. *Am J Transplant* 2009;9:1674-1678.

226. Van-Bergen J. et al. KIR-Ligand Mismatches Are Associated With Reduced Long-Term Graft Survival in HLA-Compatible Kidney Transplantation. *Am J Transplant* 2011;11 (9):1959-1964.
227. Tran T. et al. No Impact of KIR-Ligand Mismatch on Allograft Outcome in HLA-Compatible Kidney Transplantation. *Am J Transplant* 2013;13(4):1063-1068.
228. Nowak I. et al. Does the KIR2DS5 gene protect from some human diseases? . *PLoS One* 2010:e12381.
229. Espadas-de-Arias A. et al. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genotype and Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor–Human Leukocyte Antigen C Ligand Compatibility Affect the Severity of Hepatitis C Virus Recurrence After Liver Transplantation. *Liver Transpl* 2009;15:390-399.
230. Moroso V. et al. Donor and recipient HLA/KIR genotypes do not predict liver transplantation outcome. *Transpl Int* 2011;24:932-942.
231. Legaz I. et al. KIR gene mismatching and KIR/C ligands in liver transplantation: consequences for short-term liver allograft injury. *Transplantation* 2013;95(8):1037-1044.
232. Jonsson A. et al. Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms. *Adv Immunol* 2009;101:27-79.
233. Campbell K. et al. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 2013;132(3):536-544.
234. Kim S. et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 2005;436:709-713.
235. Fernández N. et al. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* 2005;105(11):4416-4423.
236. Brodin P. et al. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Blood* 2009;30(4):143-149.
237. Chalifour A. et al. A Role for cis Interaction between the Inhibitory Ly49A receptor and MHC class I for natural killer cell education. *Immunity* 2009;30(3):337-340.
238. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997;25(3):658-663.
239. Demetris A. et al. Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An International Panel. *Hepatology* 2000;31(3):792-799.

240. Fernández-Ruiz M. et al. Pretransplant lymphocyte count predicts the incidence of infection during the first two years after liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 2009;15(10):1209-1216.
241. PCR Manual. Roche Diagnostics 2 ed. 1999;2:52-58.
242. Dujols V. et al. High-resolution melting analysis for scanning and genotyping in real time PCR Tefvik D. ed. Abingdon 2006.
243. Valero-Hervás DM. et al. Complement C3 genotyping of Slow and Fast variants by real time PCR–High Resolution Melting. *Eur J Inflammation* 2012;10(3):329-334.
244. Peruzzi B. et al. Easy genotyping of complement C3 'slow' and 'fast' allotypes by tetra-primer amplification refractory mutation system PCR. *Mol Cell Probes* 2010;24:401-402.
245. Terasaki PI. et al. Microdroplet testing for HLA A, B, C and D antigens. *Am J Clin Pathol* 1978;69:103-120.
246. Zmijewski C. Detection and identification of HLA antibodies. *ASHI Laboratory Manual* 2ed. American Society of Histocompatibility and Immunogenetics. Lenexa eds. 1990.
247. Terasaki PI. *Histocompatibility Testing*. UCLA Tissue Typing Laboratory Los Angeles 1980.
248. Bamstable C. et al. The structure and evolution of the HLA-Bw4 and Bw6 antigens. *Tissue Antigens* 1979;13:334-341.
249. Colonna M. et al. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* 1993;260:1121-1124.
250. Gómez-Lozano N. et al. Genotyping of Human Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genes by Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers: An Update. *Tissue Antigens* 2002;59:184-193.
251. Hsu KC. et al. Killer Ig-Like Receptor Haplotype Analysis by Gene Content: Evidence for Genomic Diversity with a Minimum of Six Basic Framework Haplotypes, Each with Multiple Subsets. *The Journal of Immunology* 2002;169:5118-5129.
252. Moesta A. et al. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol* 2008;180:3969-3979.
253. Graef T. et al. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med* 2009;206:2557-2572.

254. Gumperz J. et al. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med* 1995;181:1133-1144.
255. Thananchai H. et al. Cutting edge: allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J Immunol* 2007;178:33-37.
256. Hansasuta P. et al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol* 2004;34:1673-1679.
257. Regueiro J. et al. C3 polymorphism, HLA and chronic renal failure in Spaniards. *Hum Genet* 1984;67:437.
258. Kopf M. et al. Complement Component C3 Promotes T-Cell Priming and Lung Migration to Control Acute Influenza Virus Infection. *Nat Med* 2002;8(4):373-378.
259. Suresh M. et al. Complement Component 3 Is Required for Optimal Expansion of CD8 T Cells During a Systemic Viral Infection. *J Immunol* 2003;170(2):788-794.
260. Ghannam A. et al. Human C3 Deficiency Associated with Impairments in Dendritic Cell Differentiation, Memory B Cells, and Regulatory T Cells. *J Immunol* 2008;181(7):5158-5166.
261. Nogueira E. et al. Expression of TLR-4 and -2 in peripheral mononuclear cells in renal transplant patients with TLR-4 gene polymorphism. *Int Immunopharmacol* 2010;10:1481-1485.
262. Palmer S. et al. Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation. *Clin Transplant* 2006;20:30-36.
263. Nogueira E. et al. Incidence of donor and recipient toll-like receptor-4 polymorphisms in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2007;39:412-414.
264. Oetting W. et al. Donor polymorphisms of toll-like receptor 4 associated with graft failure in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2012;18(12):1399-1405.
265. Lee S. et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and the risk of gram-negative bacterial infections after liver transplantation. *Transplantation* 2011;27(92):690-696.
266. Gagne K. et al. Donor KIR3DL1/3DS1 gene and recipient Bw4 KIR ligand as prognostic markers for outcome in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:1366-1375.
267. Cooley S. et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 2009;113:726-732.

- 268.Cooley S. et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 2010;116:2411–2419.
- 269.Presnell S. et al. Differential Transcription Factor Use by the KIR2DL4 Promoter Under Constitutive and IL-2/15-Treated Conditions. *J Immunol* 2012;188(9):4394-4404.
- 270.Brugière O. et al. Immunohistochemical study of HLA-G expression in lung transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9:1427-1438.
- 271.Sheshgiri R. et al. Myocardial HLA-G reliably indicates a low risk of acute cellular rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:522-527.
- 272.Neumann U. et al. Long-term outcome of liver transplants for chronic hepatitis C: a 10-year follow-up. *Transplantation* 2004;77:226-231
- 273.Watt K. et al. A Practical Guide to the Management of HCV Infection Following Liver Transplantation. *Am J Transplant* 2009;2009(9):1707-1713.
- 274.López-Vázquez A. et al. Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2005;192(1):162-165.
- 275.Umemura T. et al. KIR3DL1-HLA-Bw4 combination and IL28B polymorphism predict response to Peg-IFN and ribavirin with and without telaprevir in chronic hepatitis C. *Hum Immunol* 2014;75(8):822-826.
- 276.Vidal-Castiñeira J. et al. Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotypes and KIR2DL2/3 variants in HCV treatment outcome. *PLoS One* 2014;9(6):e99426.
- 277.Stern M. et al. Telomeric rather than centromeric activating KIR genes protect from cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2011;11(6):1302-1307.
- 278.González A. et al. KIR-associated protection from CMV replication requires pre-existing immunity: a prospective study in solid organ transplant recipients. *Genes Immun* 2014;10.1038.
- 279.Ahlenstiel G. et al. Distinct KIR / HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. *J Clin Invest* 2008;118:1017-1026.
- 280.Behrendt C. Donor killer immunoglobulin-like receptor genes and reactivation of cytomegalovirus after HLA-matched hematopoietic stem-cell transplantation: HLA-C allotype is an essential cofactor. *Front Immunol* 2013;4(36):10.3389.

281. Van-Duin D. et al. KIR and HLA interactions are associated with control of primary CMV infection in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2014;14(1):156-162.

282. Sivori S. et al. Extending killer Ig-like receptor function: from HLA class I recognition to sensors of microbial products. *Trends Immunol* 2010;31(8):289-294.

VIII. Publicaciones

- **Artículos en revisión:**

DM Valero-Hervás, E Sánchez-Zapardiel, MJ Castro-Panete, F Gallego-Bustos, F Cambra, I Justo, R Laguna-Goya, C Jimenez-Romero, E Moreno, F López-Medrano, R San Juan, M Fernández-Ruiz, JM Aguado, E Paz-Artal. **Complement C3F allotype synthesized by liver recipient modifies transplantation outcome independently from donor hepatic C3.** Liver Transplantation 2014.

Complement component 3 (C3) presents both slow (C3S) and fast (C3F) variants, which can be locally-produced and activated by immune system cells. We studied C3 recipient variants in 483 liver transplant patients by RT-PCR-HRM to determine their effect on graft outcome during the first year post-transplantation. Allograft survival was significantly decreased in C3FF recipients (C3SS 95% vs. C3FS 91% vs. C3FF 83%; $p=0.01$) or C3F allele carriers (C3F-absence 95% vs. C3F-presence 90%, $p=0.02$). C3FF genotype or presence of C3F allele independently increased risk for allograft loss (OR: 2.38, $p=0.005$ and OR: 2.66, $p=0.02$ respectively). C3FF genotype was more frequent among patients whose first infection was of viral etiology (C3SS 13% vs. C3FS 18% vs. C3FF 32%; $p=0.04$) and independently increased risk for post-transplant viral infections (OR: 3.60, $p=0.008$). On the other hand, C3FF and C3F protected from rejection events (OR: 0.54, $p=0.03$ and OR: 0.63, $p=0.047$ respectively). Differences were not observed in hepatitis C virus-recurrence or patient survival.

In conclusion, we show that, independently from C3 variants produced by donor liver, C3F variant from recipient diminishes allograft survival, increases susceptibility to viral infections and protects from rejection after transplantation. C3 genotyping of liver recipients may be useful to stratify risk.

- **Artículos publicados:**

DM Valero-Hervás, P Morales, P Varela, M Castillo-Rama, E Moreno, JC Meneu, E Paz-Artal. **Complement C3 typing of Slow and Fast variants by Real Time PCR-High Resolution Melting.** European Journal of Inflammation 2012; 10(3): 329-334.

"Slow" and "Fast" C3 complement variants (C3S and C3F) result from a g.304C>G polymorphism that changes arginine to glycine at position 102. C3 variants are associated with complement-mediated diseases and outcome in transplantation. In this work C3 genotyping is achieved by a Real Time PCR - High Resolution Melting (RT-PCR-HRM) optimized method. In an analysis of 49 subjects, 10.2% were C3FF, 36.7% were C3SF and 53.1% were C3SS. Allelic frequencies (70% for C3S and 30% for C3F) were in Hardy-Weinberg equilibrium and similar to those published previously. When comparing RT-PCR-HRM with the currently used Tetraprimer-Amplification Refractory Mutation System PCR (T-ARMS-PCR), coincidence was 93.8%. The procedure shown here includes a single primer pair and low DNA amount per reaction. Detection of C3 variants by RT-PCR-HRM is accurate, easy, fast and low cost, and it may be the method of choice for C3 genotyping.

COMPLEMENT C3 GENOTYPING OF SLOW AND FAST VARIANTS BY REAL TIME PCR-HIGH RESOLUTION MELTING

D.M. VALERO-HERVÁS^{1,2}, P. MORALES^{1,2}, M.J. CASTRO^{1,2}, P. VARELA¹,
M. CASTILLO-RAMA¹, E. MORENO³, J.C. MENEU³, S. MORA-DÍAZ¹,
P. TALAYERO^{1,2} and E. PAZ-ARTAL^{1,2}

¹*Department of Immunology, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain;*

²*Immunodeficiencies and Transplant Immunology, Institute for Research Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain;* ³*Digestive and Abdominal Transplant Surgery, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain*

Received January 10, 2012 – Accepted June 4, 2012

“Slow” and “Fast” C3 complement variants (C3S and C3F) result from a g.304C>G polymorphism that changes arginine to glycine at position 102. C3 variants are associated with complement-mediated diseases and outcome in transplantation. In this work C3 genotyping is achieved by a Real Time PCR – High Resolution Melting (RT-PCR-HRM) optimized method. In an analysis of 49 subjects, 10.2% were C3FF, 36.7% were C3SF and 53.1% were C3SS. Allelic frequencies (70% for C3S and 30% for C3F) were in Hardy-Weinberg equilibrium and similar to those published previously. When comparing RT-PCR-HRM with the currently used Tetraprimer-Amplification Refractory Mutation System PCR (T-ARMS-PCR), coincidence was 93.8%. The procedure shown here includes a single primer pair and low DNA amount per reaction. Detection of C3 variants by RT-PCR-HRM is accurate, easy, fast and low cost, and it may be the method of choice for C3 genotyping.

C3 is the central and most abundant component in the complement system. All three activation pathways of the complement cascade converge in C3, and fragments of C3 generated after its cleavage display critical biologic activities. These include opsonization of microorganisms, chemoattraction, activation of leukocytes and clearance of immunocomplexes and apoptotic cells. In addition, C3 activation products link innate and adaptive immunity by enhancing antibody responses and B cell memory (1, 2).

Human C3 allotypes were first described at the protein level by identifying two codominantly

inherited variants, C3 fast (C3F) and C3 slow (C3S) in prolonged agarose gel electrophoresis of fresh serum (3). The molecular basis of the F/S polymorphism was assigned to a C to G nucleotide change at genomic position 304 that results in the substitution of arginine (positively charged) in C3S for glycine (neutral) in C3F (4).

The association of C3 variants with immune-mediated diseases has been demonstrated in a considerable number of studies. Finn et al. showed that C3F was associated with predisposition to systemic vasculitis (5) and with the development of nephritic factor in patients with type II

Key words: C3 complement factor polymorphism, C3 variants genotyping, Amplification Refractory Mutation System, Real Time PCR-High Resolution Melting

Mailing address:

Dr Diana María Valero Hervás,
University Hospital 12 de Octubre,
Av. Andalucía s/n, 28041,
Madrid, Spain
Tel.: +34 917792756
e-mail: dianavalerohervas@gmail.com

1721-727X (2012)

Copyright © by BIOLIFE, s.a.s.

This publication and/or article is for individual use only and may not be further reproduced without written permission from the copyright holder. Unauthorized reproduction may result in financial and other penalties

mesangiocapillary glomerulonephritis (6). In rheumatoid arthritis patients, Brönnestam et al. observed an increased frequency of C3F allele, significantly higher in the seropositive group (7). C3F frequency was found augmented also in patients on hemodialysis (8), while in patients with membranous nephritis, C3S allele was significantly increased (9). More recently, a study on 439 age-related macular degeneration patients confirmed the association between the disease and the C3F allele (10), and this variant was also shown to increase the probability of neurocognitive dysfunction development after carotid endarterectomy (11). In the transplant setting the role of C3 variants remains controversial, as the initial result of increased patient and graft survival in SS homozygous kidney recipients who received an FS or FF donor graft (12) could not be replicated in larger renal transplant cohorts (13) or in liver recipients (14).

The meaning of the C3 polymorphism and disease association found in epidemiology studies has been recently clarified by the demonstration that C3S and C3F variants exhibit different functional properties. It has been reported that C3F binds the complement regulator factor H with less affinity resulting in a more potent amplification of the alternative pathway (15). This observation provides an explanation about the role of C3F in the etiology of complement-dependent diseases, and reinforces the idea that C3 genotyping could be of help in defining susceptibility or severity in diseases involving complement dysregulation.

C3 genotyping for S and F variants is currently performed by T-ARMS-PCR (16). In the present work we aimed at achieving the definition of C3 variants by RT-PCR-HRM, a newer method with improved capacity of polymorphism identification.

MATERIALS AND METHODS

Population

This study was carried out under informed consent and approval of the institutional review board of Hospital 12 de Octubre. C3S and C3F variants were analyzed in a cohort of 49 healthy subjects.

Analysis of genetic polymorphisms

DNA was obtained from whole blood by DNAzol method and stored at -30°C until later use for T-ARMS-PCR, C3 sequencing and RT-PCR-HRM.

Genotyping by T-ARMS-PCR was performed

as described in the literature (16). Briefly, two pairs of primers were used to allow the simultaneous amplification of a C3 control and the specific F and/or S alleles fragments. After amplification, the product was electrophoretically separated on 2% agarose gel and observed with an UV light source. PCR amplification for C3 fragment sequencing was carried out with primers C3 sense 5'-AAGAATAATGGGCAGGCAAG-3' and C3 antisense 5'-CCAGGGGTGTAGATGCTCTT-3'. Cycling conditions included an initial denaturalization of 5 minutes at 95°C, 40 cycles of 95°C 15 seconds, 60°C 15 seconds and 72°C 30 seconds and a final extension at 72°C during 10 minutes. Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit was used for sequencing reaction and the final product was analyzed on an AbiPrism-3100 Avant Genetic Analyzer capillary instrument (Applied Biosystems, Foster City, California).

RT-PCR-HRM was carried out by amplifying a 93 bp C3 fragment that contains the S/F polymorphism. Primers used were C3 Forward (C3-F) 5'-TGGAACAGACCCCTGACAAT-3' and C3 Reverse (C3-R) 5'-CACCACCTTCTCCACCACTT-3. PCR was conducted using the LightCycler@480 High Resolution Melting Master protocol. For each 20 µl reaction, MgCl₂ concentration was optimized at 2.5 mM, and 10 ng of each DNA was added. The cycling protocol included steps described in Table I. After amplification, HRM analysis was performed by the Gene Scanning application of LightCycler@480 Instrument (Roche, Mannheim, Germany).

Statistics

Marginal homogeneity of frequencies obtained by T-ARMS-PCR and RT-PCR-HRM techniques was compared by the non-parametric McNemar's test for symmetry.

RESULTS

C3S and C3F variants were first analyzed in the whole cohort (n=49) by T-ARMS-PCR. Twenty-seven subjects were C3SS (55.1%), four subjects were C3FF (8.2 %) and eighteen subjects were C3SF (36.7%) (Fig. 1). We next aimed at analyzing C3S and C3F variants in the same individuals by RT-PCR-HRM. In order to obtain unambiguous, control DNA samples to guide the assignation of C3 genotypes by this method, C3 polymorphic fragment was sequenced in six subjects (two C3S homozygous, two C3F homozygous and two C3SF heterozygous), included in the 49 individuals previously analyzed by T-ARMS-PCR. Sequencing

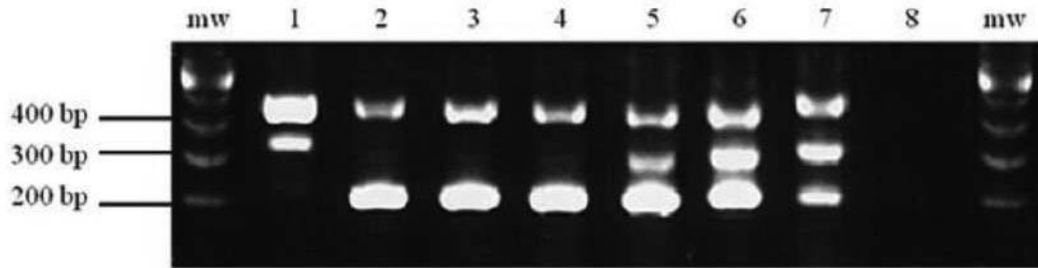


Fig. 1. Representative T-ARMS-PCR for C3F and S polymorphisms. C3 control amplification band appears at 429 bp, C3F allele band at 278 bp and C3S at 185 bp. Molecular weight marker (mw) employed was 100 bp ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Lane 1 represents an FF homozygous sample, lanes 2-4 correspond to SS homozygous samples and lanes 5-7 to FS heterozygous individuals. Negative control ran in channel 8.

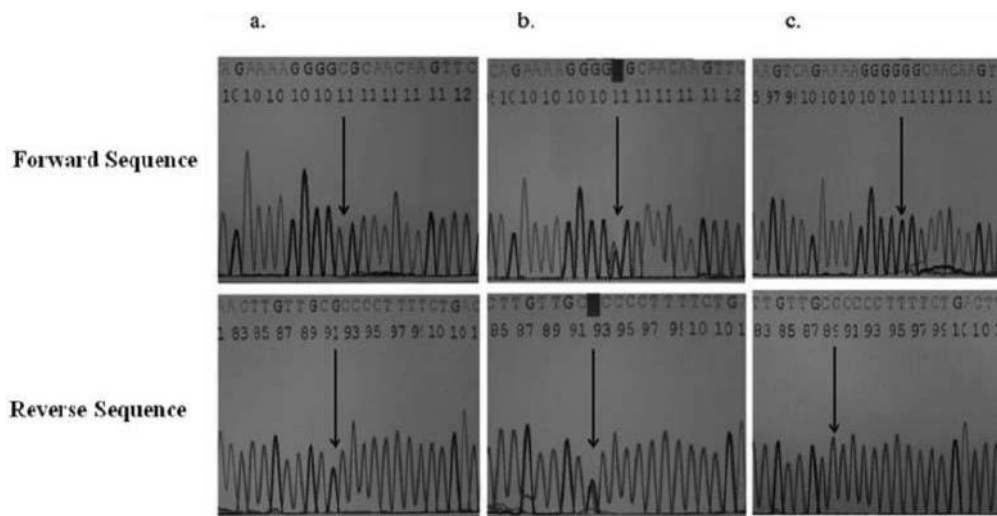


Fig. 2. Forward and reverse sequences for C3SS (a), C3FS (b) and C3FF (c). Black arrow indicates the shift position with Cytosine in C3S allele (a) while Guanine in C3F allele (c). Heterozygote allele (b) appears as a double peak and an undetermined nucleotide in the shift position.

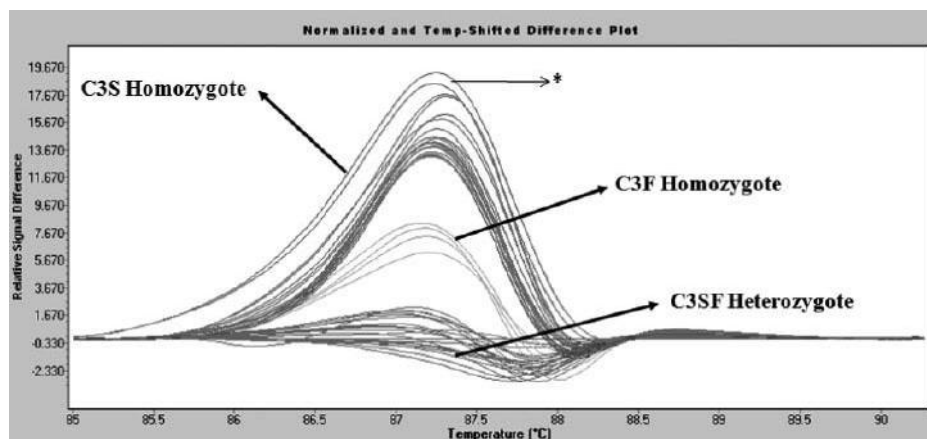


Fig. 3. Normalized RT-PCR-HRM curves and temperature-shifted difference plot for C3 polymorphism. Samples ($n = 49$) are automatically grouped depending on their melting temperature and the fluorescence signal. The asterisk indicates the curve corresponding to the incorrectly genotyped individual.

Table I. Real Time PCR-HRM cycling conditions.

<i>Program</i>	<i>Ramp Rate (° C/s)</i>	<i>Acquisition Mode</i>	<i>Analysis Mode</i>
Preincubation: 1 cycle.			NONE
- 95°C 10 minutes	4.40	NONE	
Amplification: 45 cycles.			QUANTIFICATION
- 95°C 10 seconds	4.40	NONE	
- 62°C 10 seconds	2.20	NONE	
- 72°C 10 seconds	4.40	SINGLE	
Amplification: 45 cycles.			MELTING CURVE
- 95°C 1 minute	4.40	NONE	
- 50°C 1 minute	2.20	NONE	
- 68°C 1 second	4.40	NONE	
- 95°C	0.02	CONTINUOUS ¹	
Cooling: 1cycle			NONE
- 40°C 30 seconds	2.20	NONE	

¹ 25 acquisitions per °C

results confirmed the genotypes obtained by T-ARMS-PCR. Representative electropherograms are depicted in Fig. 2.

Next, the 6 control together with the remaining 43 DNA samples were subjected to RT-PCR-HRM for analysis of C3 polymorphism. The Gene Scanning software analyzed the melting curves fluorescence and generated a normalized plot grouping samples by genotypes (Fig. 3). C3 genotyping by HRM

resulted into 5 (10.2%) C3FF homozygotes, 18 (36.7%) C3SF heterozygotes and 26 (53.1%) C3SS homozygotes.

C3 typing by T-ARMS-PCR and RT-PCR-HRM was discordant in 3 samples. To elucidate the real genotype these samples were sequenced following the procedure previously described. Sequences confirmed C3 HRM typing in 2 samples (C3FF and C3FS, which had been assigned C3SS by ARMS)

Table II. C3 genotypes and alleles frequencies.

	T-ARMS-PCR	RT-PCR-HRM	p *
C3 SS	(27/49) 55.1%	(26/49) 53.1%	
C3 FS	(18/49) 36.7%	(18/49) 36.7%	0.89
C3 FF	(4/49) 8.2%	(5/49) 10.2%	
C3 S allele	(72/98) 73%	(69/98) 70%	0.51
C3 F allele	(26/98) 27%	(29/98) 30%	

*The p value was obtained comparing by 2 test genotypes and alleles frequencies obtained from both T-ARMS-PCR and RT-PCR-HRM techniques. No differences between ARMS and HRM were observed.

and T-ARMS-PCR typing in the third sample (C3FS, assigned C3SS by HRM). Resolution of C3 genotyping was 98% for RT-PCR-HRM and 96% for T-ARMS-PCR. When comparing T-ARMS-PCR and RT-PCR-HRM by McNemar test (symmetry analysis), results coincidence was 93.8% and there were no significant statistical differences between either techniques ($p = 0.41$). Allelic frequencies obtained by RT-PCR-HRM, 70% for S allele and 30% for F allele, were distributed according to Hardy-Weinberg equilibrium ($p=0.006$) and were consistent with data published in the literature for the Spanish population ($p = 0.83$) (8). Table II shows genotype and allele frequencies obtained by the two methods, the differences are not statistically significant.

DISCUSSION

In the present work, we have used a saturating double-stranded DNA binding dye for the real time amplification of the C3 fragment containing the SNP of interest. In this method, PCR design and set up is simple as only one pair of primers is needed. The

technique has been optimized to give unique melting profiles and precise resolution of homo- (C3SS and C3FF) and heterozygous (C3SF) samples by the LightCycler® 480 instrument and Gene Scanning® software, and accurate C3 genotyping is achieved by the inclusion of control DNA samples with known genotypes in the experiment. RT-PCR-HRM C3 genotyping uses only 10 ng of DNA per test and results are obtained in 100 minutes. In contrast T-ARMS-PCR include a more complex PCR mixture as two pairs of primers are needed and a bigger amount of DNA (30 ng per reaction) is used. After amplification, T-ARMS-PCR C3 typing interpretation requires 2% agarose electrophoresis during time enough to adequately separate fragments with similar sizes. Preparation of gel, electrophoresis run and final interpretation take approximately an extra hour, whereas obtaining C3 genotypes after RT-PCT-HRM is straightforward. Detection of C3 S/F polymorphism by RT-PCR-HRM is an easy, fast and low cost procedure with good sensitivity and specificity. These features make it an excellent alternative to T-ARMS-PCR for complement C3 genotyping.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for this study was obtained from projects EPES 161853 (Roche) and FIS PI 10/02199 (Spanish Ministry of Health).

Conflict of interest: A Roche LightCycler@480 Instrument was used for the RT-PCR-HRM analyses. This work was partially funded by Roche.

REFERENCES

- Walport J. Complement. First of two Parts. *N Engl J Med* 2001; 344(14):1058-66.
- Walport J. Complement. Second of two Parts. *N Engl J Med* 2001; 344(15):1140-44.
- Alper CA, Propp P. Genetic polymorphism of the third component of human complement (C'3). *J Clin Invest* 1968; 47:2181-91.
- Botto M, Fong KY, So AK, Koch C, Walport MJ. Molecular basis of polymorphisms of human complement component C3. *J Exp Med* 1990; 172:1011-17.
- Finn JE, Mathieson PW. Molecular analysis of C3

- allotypes in patients with nephritic factor. *Clin Exp Immunol* 1993; 91:410.
6. Finn JE, Zhang L, Agrawal S, Jayne DRW, Oliveira DBG, Mathieson PW. Molecular analysis of C3 allotypes in patients with systemic vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9(11):1564-7.
 7. Brönnestam R. Studies of the C3 polymorphism: relationship between C3 phenotypes and rheumatoid arthritis. *Hum Hered* 1973; 23:206-13.
 8. Regueiro JR, Amaiz-Villena A. C3 polymorphism, HLA and chronic renal failure in Spaniards. *Hum Genet* 1984; 67:437-40.
 9. Papiha S, Rodger RSC. C3 and Bf complement types in chronic renal failure. *Hum Genet* 1986; 72:260-1.
 10. Park KH, Fridley BL, Ryu E, Tosakulwong N, Edwards AO. Complement component 3 (C3) haplotypes and risk of advanced age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(7):3386-93.
 11. Gigante PR, Kotchetkov IS, Kellner CP, et al. Polymorphism in complement component 3 (C3F) and complement factor H (Y402H) increase the risk of postoperative neurocognitive dysfunction following carotid endarterectomy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82:247-53.
 12. Brown KM, Kondeatis E, Vaughan RW, et al. Influence of donor C3 allotype on late renal-transplantation outcome. *N Engl J Med* 2006; 354(19):2014-23.
 13. Varaganam M, Yaqoob MM, Döhler B, Opelz G. C3 polymorphisms and allograft outcome in renal transplantation. *N Engl J Med* 2009; 360 (9):874-80.
 14. Dhillon N, Walsh L, Krüger B, et al. Complement Component C3 Allotypes and Outcomes in Liver Transplantation. *Liver Transplantation* 2010; 16:198-203.
 15. Heurich M, Martínez-Barricarte R, Francis NJ, Roberts DL, Rodríguez de Córdoba S, Morgan BP, Harris CL. Common polymorphisms in C3, factor B and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. *PNAS* 2011; 108 (21):8761-66.
 16. Peruzzi B, Serra M, Pescucci C, et al. Easy genotype of complement C3 'slow' and 'fast' allotypes by tetra-primer amplification refractory mutation system PCR. *Mol CellProbes* 2010; 24:401-2.