



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA

**POLIMORFISMOS EN LOS GENES DEL SISTEMA INMUNE  
INNATO (MANNOSE-BINDING LECTIN, TOLL-LIKE) Y RIESGO  
DE INFECCIÓN EN PACIENTES CON TRASPLANTE  
AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS**

Ana Moretó Quintana

Tesis presentada para aspirar al grado de Doctor en Medicina, realizada bajo la dirección de los profesores:

M. Carmen Fariñas Álvarez  
Concepción Fariñas Álvarez  
Eulogio Conde García

Santander, mayo de 2014



*Este proyecto ha sido subvencionado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto Carlos III (FIS PDI 04/0492).*





Facultad de Medicina  
Departamento de Medicina y Psiquiatría

DÑA. MARÍA DEL CARMEN FARIÑAS ÁLVAREZ, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA Y JEFE DE SECCIÓN DEL SERVICIO DE MEDICINA INTERNA, UNIDAD DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA DE SANTANDER

CERTIFICO que la presente tesis doctoral titulada POLIMORFISMOS EN LOS GENES DEL SISTEMA INMUNE INNATO (MANNOSE-BINDING LECTIN, TOLL-LIKE) Y RIESGO DE INFECCIÓN EN PACIENTES CON TRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS, realizada bajo mi dirección por Dña. Ana Moretó Quintana, responde a las exigencias científicas de originalidad y rigor propias de un trabajo de esta índole y son fruto de la capacidad técnica e interpretativa del doctorando.

Santander, mayo de 2014.





Facultad de Medicina  
Departamento de Medicina y Psiquiatría

DÑA. CONCEPCIÓN FARIÑAS ÁLVAREZ, DOCTORA EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA, JEFE DE UNIDAD DE CALIDAD DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA DE SANTANDER

CERTIFICO que la presente tesis doctoral titulada POLIMORFISMOS EN LOS GENES DEL SISTEMA INMUNE INNATO (MANNOSE-BINDING LECTIN, TOLL-LIKE) Y RIESGO DE INFECCIÓN EN PACIENTES CON TRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS, realizada bajo mi dirección por Dña. Ana Moretó Quintana, responde a las exigencias científicas de originalidad y rigor propias de un trabajo de esta índole y son fruto de la capacidad técnica e interpretativa del doctorando.

Santander, mayo de 2014.







Facultad de Medicina  
Departamento de Medicina y Psiquiatría

D. EULOGIO CONDE GARCIA, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA Y JEFE DEL SERVICIO DE HEMATOLOGÍA-HEMOTERAPIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA DE SANTANDER

CERTIFICO que la presente tesis doctoral titulada POLIMORFISMOS EN LOS GENES DEL SISTEMA INMUNE INNATO (MANNOSE-BINDING LECTIN, TOLL-LIKE) Y RIESGO DE INFECCIÓN EN PACIENTES CON TRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS, realizada bajo mi dirección por Dña. Ana Moretó Quintana, responde a las exigencias científicas de originalidad y rigor propias de un trabajo de esta índole y son fruto de la capacidad técnica e interpretativa del doctorando.

Santander, mayo de 2014.



*A mis padres y hermanos, por todo lo que significan para mí y el apoyo incondicional que me han ofrecido siempre.*

*A Jon, por hacerme feliz en los momentos difíciles y estar a mi lado cuando le necesito.*



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los Doctores M. Carmen Fariñas Álvarez, Concepción Fariñas Álvarez y Eulogio Conde García, bajo cuya dirección he realizado esta tesis. Ésta no hubiera sido posible sin su apoyo y orientación. Agradecerles la plena confianza depositada en mí, así como la atención que siempre me han ofrecido.

Al Doctor José Daniel García-Palomo, por todo el trabajo que realizó, fundamental para la elaboración de esta tesis.

A los Doctores Francisco Leyva, Gonzalo Ocejo y Pablo Velasco del laboratorio de Inmunología por su colaboración en el estudio de los polimorfismos genéticos.

A todo el Servicio de Hematología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla por su ayuda, especialmente al Servicio de Enfermería.

A los pacientes de Hematología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, sin cuyo consentimiento este trabajo no habría sido posible.

A la Dra. María Puente Pomposo, por toda la ayuda que me ha prestado y su apoyo constante.

A mis compañeras, la Dra. Ana Batlle y la Dra. Carmen Montes, por su participación indispensable en la recogida de datos.

A todas las personas que, de un modo u otro, han colaborado a que este trabajo se haya podido realizar.



# TABLA DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS</b> .....	19
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	21
1.1 Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos .....	23
1.1.1. Indicaciones del TAPH .....	24
1.1.2. Técnica del TAPH .....	25
1.1.3. Reconstitución inmune .....	26
1.1.4. Complicaciones infecciosas del TAPH .....	27
1.2. Sistema Inmune .....	28
1.2.1. Inmunidad innata .....	29
1.2.1.1. Detección de microorganismos a través de PRRs .....	32
1.2.1.2. Células del sistema inmune innato .....	38
1.2.2. Mannose binding lectin (MBL) .....	41
1.2.2.1. Estructura de la proteína MBL .....	41
1.2.2.2. Variaciones genéticas del gen <i>MBL2</i> .....	42
1.2.2.3. Epidemiología de la MBL .....	44
1.2.2.4. MBL e infección .....	44
1.2.3. Receptores toll-like .....	47
1.2.3.1. Mecanismo de actuación de TLR4 y TLR2 .....	51
1.2.3.2. Polimorfismos de TLR .....	52

1.2.4. Variaciones del sistema inmune innato y TAPH .....	53
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>55</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>
<b>4. PACIENTES Y MÉTODOS</b> .....	<b>63</b>
4.1. Diseño del estudio.....	65
4.2. Periodo del estudio.....	65
4.3. Ámbito del estudio .....	65
4.4. Selección de la población de estudio .....	66
4.5. Seguimiento y recogida de la información .....	67
4.5.1. Seguimiento .....	67
4.5.2. Definición de variables.....	67
4.5.2.1. Variable resultado .....	67
4.5.2.2. Variables de exposición .....	69
4.5.2.3. Otras variables independientes .....	70
4.5.3. Fuentes de recogida de información .....	73
4.5.4. Procedimientos técnicos.....	73
4.6. Análisis de datos .....	76
4.7. Aspectos éticos.....	77



<b>5. RESULTADOS</b> .....	79
5.1. Características del trasplante.....	81
5.1.1. Características de los pacientes y del trasplante .....	81
5.1.2. Infecciones previas al trasplante .....	83
5.1.3. Profilaxis antiinfecciosa .....	85
5.1.4. Recuperación granulocitaria.....	86
5.1.5. Mortalidad .....	87
5.2. Infecciones .....	89
5.2.1. Descripción general.....	89
5.2.2. Diagnóstico microbiológico .....	90
5.2.2.1. Infecciones bacterianas .....	91
5.2.2.2. Infecciones víricas .....	91
5.2.2.3. Infecciones fúngicas .....	92
5.2.3. Infecciones según el periodo evolutivo.....	92
5.2.3.1. Periodo de neutropenia .....	93
5.2.3.2. Periodo intermedio.....	94
5.2.3.3. Periodo tardío.....	95
5.3. Inmunidad innata .....	97
5.3.1. Genotipo <i>MBL2</i> y su asociación con infecciones .....	97
5.3.2. Genotipo <i>MBL2</i> y su asociación con la tasa de mortalidad .....	104
5.3.3. Niveles de MBL y su relación con genotipos .....	104

5.3.3.1. Niveles medios de MBL pretrasplante .....	107
5.3.3.2. Niveles medios de MBL en el periodo de neutropenia.....	108
5.3.3.3. Niveles medios de MBL en el periodo intermedio .....	109
5.3.3.4. Niveles medios de MBL en el periodo tardío .....	110
5.3.4. Niveles de MBL e infecciones post-trasplante.....	111
5.3.5. Mortalidad en asociación a niveles de MBL.....	114
5.4. TLR .....	115
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>117</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>133</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>137</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>155</b>
9.1 Anexo 1.....	157
9.2 Anexo 2.....	169
9.3 Anexo 3.....	171

## **ABREVIATURAS**

Alo-TPH: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

BEAC: Carmustina-Etopósido-Citarabina-Ciclofosfamida

BEAM: Carmustina-Etopósido-Citarabina-Melfalán

CMV: Citomegalovirus.

CPH: Células progenitoras hematopoyéticas

CVC: Catéter venoso central

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EICH: Enfermedad injerto contra huésped.

G-CSF: Factor estimulador granulocitario.

HLA: Antígenos leucocitarios humanos.

ITU: Infección de tracto urinario

LBP: “Lipopolysaccharide binding protein”

MBL: “Mannose binding lectin”

MD2: Antígeno linfocitario 96

MDP: “Muramil dipeptide”

NAM: Neoplasia aguda mieloide

NK: Natural killer.

PAMs: Péptidos antimicrobianos

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PET: Tomografía por emisión de positrones

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones

RIG-I: “Retinoic acid-inducible gene I”

RNA: Ácido ribonucleico

RR: Riesgo relativo

SNPs: Polimorfismos nucleotídicos puntuales.

TAC: Tomografía axial computarizada.

TAPH: Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos

TLR: Toll like receptor.

VEB: Virus Epstein Barr.

VHS: Virus herpes simple.

VRS: Virus respiratorio sincitial.

VVZ: Virus varicela zóster.



# 1. INTRODUCCIÓN

---



## **1.1 TRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS**

El trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH) se puede definir como la transferencia de células progenitoras recogidas previamente a un paciente, tras la manipulación de las mismas y/o administración de quimioterapia a altas dosis. En los últimos 50 años ha evolucionado hasta llegar a ser una terapia curativa para una variedad de estados de fallo medular, neoplasias hematológicas, deficiencias inmunes etc. y continúa siendo investigado como una plataforma para la realización de terapia génica, por ejemplo en errores innatos del metabolismo. Esta técnica permite el uso de agentes antitumorales a dosis mucho más altas de lo que se podrían administrar en un ciclo de quimioterapia convencional. . El TAPH es especialmente útil en los pacientes con neoplasias quimiosensibles y cuando la toxicidad medular es un factor limitante de las dosis altas de los quimioterápicos (1).

En casos seleccionados, el TAPH puede tener ventajas sobre el trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico (alo-TPH). No es necesario identificar un donante HLA compatible, se evitan complicaciones inmunológicas como la enfermedad injerto contra huésped (EICH) y el rechazo del implante, no es necesario el uso de tratamiento inmunosupresor para la preparación del trasplante, profilaxis y tratamiento de la EICH, es mejor tolerado en pacientes mayores y la estancia hospitalaria, complicaciones y mortalidad son menores (1). A pesar de esto, tiene una serie de inconvenientes: el producto a infundir puede estar contaminado por células neoplásicas residuales, con el consiguiente riesgo de recaída, y además este tratamiento puede aumentar el riesgo de desarrollar una neoplasia secundaria, especialmente leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos (1). La toxicidad secundaria a la quimioterapia y

las infecciones contribuyen a la morbilidad y mortalidad asociadas al proceso, aunque en este procedimiento no ocurre generalmente morbilidad secundaria a la enfermedad del injerto contra huésped, como es habitual en el alo-TPH (2). Los pacientes sometidos a un TAPH experimentan una severa inmunodepresión en algún momento del procedimiento, la cual puede estar influida por varios factores, como son la edad, las comorbilidades y la exposición a infecciones previas al trasplante (3). Por tanto, los pacientes a los que se realiza un TAPH están sometidos a un alto riesgo de infecciones. Otros factores también tienen gran importancia en este aspecto, como son la fuente de progenitores hematopoyéticos empleada (existe una reconstitución inmune más rápida en los pacientes en los que se emplea progenitores hematopoyéticos de sangre periférica) y la dosis de CD34+ infundida, ya que niveles de células CD34+ de  $3 \times 10^6/\text{kg}$  o superior están asociados con una mejor recuperación hematopoyética, una incidencia disminuida de infecciones fúngicas y mejor supervivencia global (4).

### **1.1.1 INDICACIONES DEL TAPH**

Dado el riesgo que comporta el TAPH de administrar células neoplásicas residuales en el inóculo de médula ósea o sangre periférica, las principales indicaciones del mismo son aquellas enfermedades que cursan sin afección medular (enfermedad de Hodgkin, linfomas no hodgkinianos y tumores sólidos) (5). A pesar de ello, el TAPH se emplea como forma de intensificar el tratamiento en pacientes con leucemia aguda mieloblástica o linfoblástica, mieloma múltiple, u otras enfermedades linfoproliferativas crónicas que carecen de donante compatible y/o el alo-TPH supone una toxicidad no aceptable (5). Asimismo, se emplea en el tratamiento de la amiloidosis primaria y en enfermedades autoinmunes resistentes a tratamientos convencionales (esclerosis



múltiple, esclerosis sistémica, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide entre otras) (5).

### 1.1.2 TÉCNICA DEL TRASPLANTE

- Evaluación del paciente: Una vez que se ha sentado la indicación del trasplante, el paciente debe ser evaluado para conocer, por un lado el estado de la enfermedad y, por otro, los riesgos posibles de que pueda presentar complicaciones graves durante el TAPH. En la práctica se limita a realizar una evaluación de la enfermedad y a conocer las comorbilidades que presenta. Se realiza una analítica de rutina, un estudio de la médula ósea, estudio de las serologías víricas, un ecocardiograma y unas pruebas de función respiratoria. Con estos datos se elabora el Índice de Comorbilidad que tiene repercusiones en las complicaciones y en la supervivencia de los pacientes trasplantados (6).
- Obtención de progenitores hematopoyéticos: éstos se pueden obtener de médula ósea o de sangre periférica:
  - De médula ósea: generalmente, las Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) se obtienen de las crestas ilíacas postero-superiores por punciones aspirativas de unos 3-5 ml cada una, en pacientes con anestesia general o raquianestesia. De esta forma se obtienen unos 800-1.200 ml de sangre medular, con un contenido de  $10-20 \times 10^9$  células nucleadas totales (entre  $1,5$  y  $3,5 \times 10^8$ /kg células nucleadas y  $2-3 \times 10^6$ /kg células CD 34+).
  - De sangre periférica: para conseguir una adecuada movilización de las CPH, es necesario administrar G-CSF solo o en combinación con quimioterapia. Mediante un separador celular, la sangre obtenida se

separa en sus diferentes componentes, almacenándose en una bolsa las células mononucleadas, que incluyen las células CD34+, y se devuelven al paciente el plasma, los eritrocitos y los leucocitos polimorfonucleares. En un proceso de aféresis circulan entre 10 y 20 litros de sangre, obteniéndose una mayor cantidad de células CD34+ que en una aspiración de médula ósea.

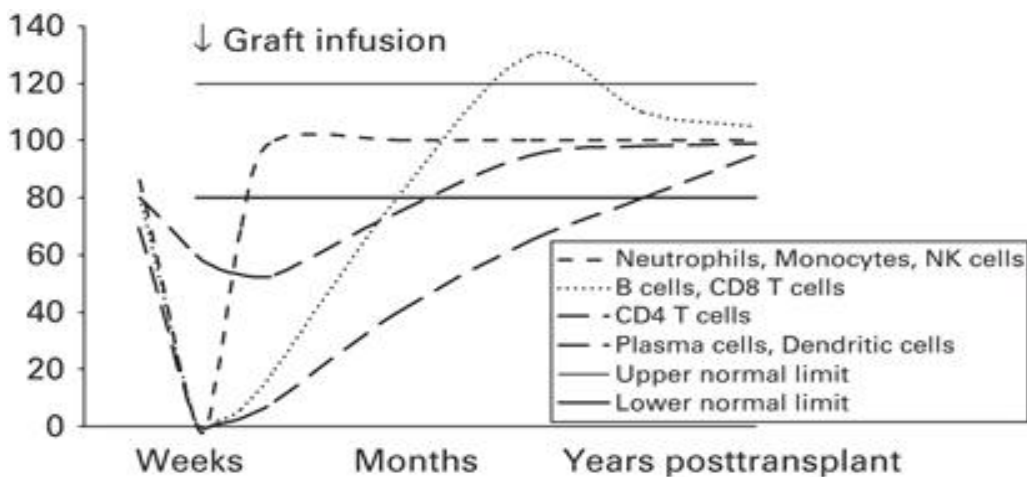
- Preparación del receptor: los días previos a la infusión de progenitores hematopoyéticos se administra el *tratamiento de acondicionamiento*. Por lo general se emplean esquemas de poliquimioterapia a dosis altas combinando diversos agentes citotóxicos (ciclofosfamida, busulfán, melfalán, etopósido...) que en ocasiones se complementan con irradiación corporal total.
- Administración de los progenitores: hoy en día es frecuente la criopreservación de los progenitores hematopoyéticos hasta su utilización. El día del trasplante (denominado día 0), se descongelan los progenitores de forma rápida y se administran inmediatamente. Una vez administrados los progenitores hematopoyéticos, anidan en las cavidades medulares e inician la reconstitución de la celularidad hematopoyética (5).

### **1.1.3 RECONSTITUCIÓN INMUNE**

Tras un acondicionamiento mieloablativo, los pacientes suelen experimentar un periodo de pancitopenia que puede durar desde días a semanas. La rapidez de la recuperación de neutrófilos varía en función del tipo de injerto: aproximadamente 2 semanas si se ha utilizado sangre periférica movilizada con G-CSF y 3 semanas si se ha empleado médula ósea. La recuperación de neutrófilos, monocitos y células NK es seguida por la

recuperación de plaquetas y hematíes, que son seguidos por la recuperación de los linfocitos B y T (Figura 1).

**Figura 1. Reconstitución inmune de progenitores hematopoyéticos.**



#### 1.1.4 COMPLICACIONES INFECCIOSAS DEL TAPH

- Periodo de neutropenia (días 0 a +30). En esta fase, el riesgo de infección está relacionado con la rapidez de instauración y duración de la neutropenia. Otros factores a tener en cuenta son la utilización de accesos venosos y la alteración de barreras naturales secundaria a la quimioterapia (mucositis, etc). Los patógenos más habituales son bacterias (en los últimos años hay un aumento de infecciones por cocos grampositivos, como resultado del aumento de utilización de accesos venosos centrales), *Candida* spp y virus herpes simple (VHS). En esta fase es necesario emplear tratamiento empírico precoz ante la sospecha de infección, con un antibiótico de amplio espectro, añadiendo un glucopéptido si hay

sospecha de que la infección pudiera estar causada por un coco grampositivo. Si a los 5 días hay persistencia de la fiebre sin documentación microbiológica, se debe añadir un antifúngico.

- Periodo intermedio (días +30 a +100): en este periodo, favorecido por la inmunodeficiencia postrasplante, se observan habitualmente infecciones por virus y hongos. Las infecciones más habituales son la infección citomegálica, cistitis hemorrágica por adenovirus o virus BK, neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, candidiasis diseminada y la aspergilosis con afectación pulmonar o de senos paranasales.
- Periodo tardío (a partir de día +100): Esta última etapa se caracteriza por el deterioro persistente de la inmunidad celular y humoral, así como la alteración en el funcionamiento del sistema reticuloendotelial. Este deterioro es más grave en receptores de alo-TPH y condiciona un riesgo elevado de infecciones como CMV, varicela zoster, virus Epstein–Barr, virus respiratorios y organismos encapsulados (*S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*), entre los más frecuentes. Actualmente y como consecuencia del mejor conocimiento de las complicaciones infecciosas del trasplante, se utiliza de manera generalizada profilaxis con aciclovir, fluconazol y trimetoprim/sulfametoxazol, con lo cual ha disminuido la frecuencia y gravedad de infecciones por herpes simple, *Candida* y *Pneumocystis jirovecii*; por otro lado, el uso de ganciclovir como profilaxis o tratamiento anticipado han tenido un efecto similar en la frecuencia de enfermedad por citomegalovirus en el periodo temprano después del trasplante (5).

## 1.2 SISTEMA INMUNE.

El **sistema inmune** surge durante la evolución para combatir las infecciones, para ello cuenta con dos tipos de mecanismos que actúan de manera coordinada:

- Inmunidad **innata** con dos efectores: uno humoral con el sistema del complemento, activado por la vía alternativa o de las lectinas y otro celular formado por: fagocitos, mastocitos, linfocitos NK, con receptores inespecíficos de reconocimiento del antígeno, que no tienen memoria y que actúan en las primeras fases de la infección (7).
- Inmunidad **adaptativa**, con la presencia de los linfocitos T y B, inducibles, caracterizados por su especificidad para reconocer los antígenos por selección clonal y por la memoria inmunológica. Las respuestas de inmunidad adaptativa son continuamente depuradas y ajustadas a lo largo de la vida del huésped. Cada linfocito B y T adquiere un receptor estructuralmente único durante el desarrollo, conllevando un vasto repertorio de receptores únicos. Desde este repertorio, las células expuestas a microorganismos u otros antígenos, se expanden como un clon de células dirigidas a su antígeno específico. Según se expande el clon, la afinidad y especificidad de su unión particular aumentan. Por tanto, los receptores más útiles son seleccionados y mejorados en el huésped a lo largo del tiempo. Sin embargo, las respuestas inmunes “aprendidas” no pueden ser transferidas a la descendencia de un individuo.

### 1.2.1 INMUNIDAD INNATA

La inmunidad innata hace referencia a las respuestas inmunes que están presentes desde el nacimiento y no son aprendidas, adaptadas o intensificadas como resultado de la

exposición a microorganismos, en contraposición con las respuestas de los linfocitos T y B en el sistema inmune adaptativo (8). La inmunidad innata protege al huésped en el intervalo de tiempo que transcurre entre la exposición microbiana y la respuesta adaptativa.

Los mecanismos mediante los cuales funcionan los sistemas inmunes innato y adaptativo (adquirido), son fundamentalmente diferentes: el sistema inmune innato reconoce microorganismos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que son receptores específicos para componentes moleculares de microorganismos que no son creados por el huésped. Algunas respuestas inmunes innatas son reguladas temporalmente como resultado de la exposición a microorganismos, pero los componentes del sistema inmune innato no cambian permanentemente durante la vida de un individuo. Sin embargo, estudios filogenéticos han mostrado que los genes de los PRRs y otros componentes se han modificado gradualmente a lo largo de generaciones mediante selección natural (7).

Los fallos del sistema inmune por exceso o por defecto generan enfermedades (autoinmunidad, alergia, inmunodeficiencia). Todavía no está claro por qué algunos receptores de trasplante desarrollan más infecciones o cuadros infecciosos más graves que otros pacientes con similar grado de inmunosupresión. En este sentido, el papel de la inmunidad innata en la respuesta a las infecciones en pacientes inmunodeprimidos alcanza especial importancia. Es muy probable que la integridad del sistema inmune innato no celular sea un factor importante en las infecciones en pacientes sometidos a TAPH. En estos pacientes los regímenes de acondicionamiento (quimioterapia y radioterapia) pretrasplante producen una ablación de la respuesta inmune adaptativa y de los efectores celulares de la respuesta inmune innata como los granulocitos, macrófagos y células NK. En consecuencia, en este periodo de mayor inmunosupresión,

es posible que la respuesta inmune innata no celular adquiriera una mayor relevancia. El sistema inmune innato humoral ha evolucionado para proteger al huésped en las fases iniciales de una amenaza infecciosa. Este sistema se basa en una serie de moléculas codificadas en la línea germinal que reconocen patrones moleculares altamente conservados (9).

Los componentes del sistema inmune innato incluyen:

- Barreras físicas
- Enzimas en células epiteliales y fagocíticas: lisozima...
- Proteínas relacionadas con la inflamación: complemento, proteína C reactiva, lectinas (como la MBL y ficolinas).
- Péptidos antimicrobianos: defensinas, catelicidinas... en las superficies celulares de las células y en los gránulos fagocíticos.
- Receptores celulares que reconocen la presencia de microorganismos y originan una respuesta defensiva: Receptores toll-like (TLRs).
- Células que liberan citoquinas y mediadores inflamatorios: macrófagos, mastocitos, células natural-killer.
- Fagocitos: neutrófilos, monocitos, macrófagos.

Funciones del sistema inmune innato:

- Detección de microorganismos y primera línea defensiva contra la invasión e infección.
- Regulación de la inflamación: los signos cardinales de la inflamación (tumor, rubor, calor y dolor) son productos de la acción protectora de la inmunidad innata.

- Mantenimiento de la homeostasis inmunológica.
- Activación e instrucción de las respuestas inmunes adaptativas.

### **1.2.1.1 Detección de microorganismos a través de patrones de reconocimiento**

Las respuestas del sistema inmune innato son mediadas en su mayoría por proteínas que reconocen e interaccionan con componentes que son específicos de los microorganismos. Como se ha comentado previamente, estas proteínas se agrupan como receptores de reconocimiento de patrones. Los compuestos moleculares de los microorganismos reconocidos por los PRRs se llaman patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (7).

#### **A) Receptores de reconocimiento de patrones (Tabla 1)**

Los PRRs se pueden dividir en dos grupos: proteínas y péptidos secretados y circulantes y receptores transductores de señales transmembrana.

##### ▪ PRRs secretados y circulantes:

Estos incluyen péptidos antimicrobianos, colectinas, lectinas y pentraxinas. Estas proteínas y péptidos median directamente la muerte microbiana, actúan como proteínas *helper* para los receptores transmembrana, y favorecen la fagocitosis de las células efectoras innatas y adaptativas:

- Péptidos antimicrobianos (PAMs): son un grupo de PRRs que son importantes para la protección de la piel y las membranas mucosas, y en la digestión de los organismos fagocitados. Los PAMs secretados sobre las superficies epiteliales en un lugar dañado crean una capa microbicida que daña a los microorganismos previamente al ataque e invasión. Son microbicidas frente a un amplio espectro de bacterias, hongos, clamidias,



parásitos y virus encapsulados. Los PAMs forman poros en las membranas externas de los microorganismos, con lo que se daña la integridad de la membrana y lleva al microorganismo a la muerte. Los PAMs existen en múltiples formas y estructuras diferentes, pero todas contienen racimos de aminoácidos hidrofóbicos catiónicos que se unen a los fosfolípidos de la cara externa de las membranas de las bacterias cargadas negativamente. Las membranas externas de las células de los animales contienen lípidos que difieren de los de los microorganismos, y por tanto no son atacadas por los PAMs.

- Colectinas: representan otro tipo de PRRs. Son proteínas colágeno-*like* que se unen a los carbohidratos o lípidos en las paredes celulares de los microorganismos. Pueden tener actividad microbicida directa o señalar el microorganismo para que sea reconocido por el sistema del complemento y la fagocitosis, y facilitan la destrucción de células apoptóticas (10).

\* Mannose binding lectin (MBL): es una lectina antimicrobiana, una colectina bien caracterizada, y un reactante de fase aguda producida en el hígado. La MBL reconoce residuos de carbohidratos terminales de bacterias grampositivas y gramnegativas, hongos, virus y parásitos. Puede opsonizar microorganismos para que sean fagocitados mediante el receptor C1q y activar el sistema del complemento, originando lisis microbiana, quimioatracción de neutrófilos y fagocitosis.

-Lectinas: son proteínas que unen carbohidratos. La MBL es el prototipo de lectina de defensa del huésped, pero las ficolinas 1/2/3 y las galectinas son otras lectinas importantes de defensa (11, 12). La MBL y las ficolinas pueden unirse directamente a los microorganismos y desencadenar la activación de la vía de las lectinas independientemente de anticuerpos. Algunas galectinas humanas pueden unirse directamente a las bacterias, alterar sus membranas y destruirlas sin participación del

complemento, así como inhibir la replicación del virus influenza e inducir la apoptosis de algunas células (12-14).

-Pentraxinas: son una gran familia de proteínas, muy conservadas a lo largo de la evolución, y caracterizadas por un dominio C-terminal que contiene 5 subunidades (15-17). Todas son reactantes de fase aguda secretadas en respuesta a la activación del TLR o de citoquinas proinflamatorias.

**Tabla 1. Receptores de reconocimiento de patrones en humanos: secretados y circulantes (18).**

<b>PRRs</b>	<b>Reconocen</b>	<b>Funciones</b>
<b>Péptidos antimicrobianos</b>		
Defensinas	Membranas microbianas	Lisis celular microbiana
Catelicidina		Opsonización  Quimioatracción  Nexo de la inmunidad adaptativa
<b>Colectinas</b>		
MBL	Manano microbiano	Activación del complemento, lisis microbiana y opsonización
Proteínas surfactantes A y D	Membranas microbianas	Opsonización, lisis de bacterias y hongos
<b>Lectinas</b>		
MBL	Carbohidratos microbianos	Activación de la vía de las lectinas del complemento, con lisis y opsonización bacteriana
Ficolinas 1,2,3		
Galectina		
<b>Pentraxinas</b>		
Proteína C Reactiva	Carbohidratos microbianos	Activación de la vía clásica del complemento, con lisis y opsonización bacteriana
Pentraxina (PTX3)		

▪ PRRs asociados a células

Los PRRs unidos a membranas se expresan constitutivamente en muchos tipos de células inmunes y en las células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, monocitos y linfocitos B). En todas estas células, los PRRs señalizadores transmembrana actúan como centinelas. Tras la activación, inducen una rápida respuesta de otros PRRs.

Los principales PRRs transmembrana y señalizadores intracelulares son los siguientes (19-23):

- Receptores toll-like (TLRs): son PRRs transmembrana que se encuentran en las células del sistema inmune (especialmente monocitos, macrófagos, células epiteliales y neutrófilos), así como en células dendríticas y en muchos otros tipos celulares.

Los TLRs reconocen una variedad de PAMPs, que incluyen componentes de la pared celular microbiana, proteínas y ácidos nucleicos. Las señales de los TLRs originan cambios en la transcripción de factores que regulan una multitud de genes, incluidos los que codifican importantes citoquinas proinflamatorias.

- PRRs asociados a fagocitosis: los fagocitos expresan PRRs unidos a membrana en su superficie celular, que a menudo funcionan asociados a los PRRs secretados. Cuando estos PRRs de superficie celular se unen a los PAMPs, inician la fagocitosis, liberación de oxidantes tóxicos y trasladan los patógenos a los lisosomas que contienen productos microbicidas. En los macrófagos, las proteínas derivadas de los patógenos son también procesadas a péptidos y presentados mediante las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en la superficie celular para atraer e instruir linfocitos T específicos de antígeno.

- PRRs intracelulares: incluyen algunos de los TLRs, los receptores *NOD-like*, y la familia del receptor *RIG-T-like* (Tabla 2).

**Tabla 2. PRRs asociados a células (18).**

<b>RRP</b>	<b>Reconocen</b>	<b>Funciones</b>
<b>Unidos a membranas plasmáticas</b>		
TLRs 1, 2, 4, 5, 6	Variedad de PAMPs s microbianos	Liberación de citoquinas, activación de células inmunes
Receptor de macrófagos	Bacterias grampositivas y gramnegativas	Liberación de citoquinas, activación de células inmunes
Receptor de manosa de macrófagos	Manano microbiano	Opsonización de bacterias, hongos
Dectina- 1	Glucano $\beta$ fúngico	Opsonización de bacterias, hongos
<b>Intracelular (citoplásmico o endolisosomal)</b>		
TLR3, 7, 8, 9, 10	Variedad de PAMPs s microbianos	Liberación de citoquinas, activación de células inmunes
Receptores NOD-like	Peptidoglicano de la pared celular microbiana, MDP	Liberación de citoquinas, activación de células inmunes
Receptores RIG-I-like	RNA vírico	Eliminación de virus RNA y DNA
MDA5	RNA vírico	Eliminación de virus RNA
LGP2	RNA vírico	Eliminación de virus RNA

## **B) Patrones moleculares asociados a patógenos**

Los PRRs son capaces de distinguir entre tejidos propios y microorganismos mediante el reconocimiento de PAMPs muy conservados. Cada tipo de PAMP es característico de un grupo específico de microorganismos.

Las estructuras PAMP tienen algunas características en común:

- Se producen sólo por microorganismos
- Habitualmente son estructuras compartidas por clases enteras de patógenos y que no varían.

- Generalmente son fundamentales para la integridad, supervivencia y patogenicidad de los microorganismos, e incluso un microorganismo no puede mutar sus PAMPs para evitar los mecanismos de defensa del huésped.

Un prototipo de PAMP es la endotoxina bacteriana (lipopolisacárido), un componente de la membrana externa de todas las bacterias gramnegativas. La endotoxina contiene Lípido A, una estructura altamente conservada de la membrana lipídica externa que confiere muchas de las actividades biológicas de la endotoxina (24).

### **1.2.1.2 Células del sistema inmune innato**

Los fagocitos profesionales (neutrófilos, monocitos, macrófagos) son el componente efector del sistema inmune innato (25-27). Otros tipos de células expresan PRRs como ya se ha mencionado previamente, que juegan un papel importante en la defensa del huésped. Las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígenos, y sirven de enlace entre la inmunidad innata y adaptativa (28, 29).

**Neutrófilos:** son los fagocitos circulantes más abundantes en los seres humanos, siendo las primeras células reclutadas en los sitios de infección e inflamación. Son atraídos por una variedad de factores quimiotácticos generados en estos sitios. Ciertos péptidos antimicrobianos también son quimiotácticos para los neutrófilos (30). Todos estos quimioatrayentes se difunden desde el sitio de infección o lesión para proporcionar un gradiente quimiotáctico para la migración y posterior activación de los neutrófilos.

Al llegar al sitio infectado, los neutrófilos fagocitan los microorganismos invasores que están opsonizados por procesos inmunes innatos y adquiridos, tales como la fijación de fragmentos del complemento C3 e IgG.

Tras la fagocitosis, los microorganismos ingeridos son destruidos por mecanismos

microbicidas mediante la fusión del fagosoma que contiene los microorganismos con gránulos intracelulares que contienen productos microbicidas como alfa defensinas y oxidantes altamente reactivos generados por la NADPH oxidasa de los fagocitos.

Las proteasas de los gránulos citoplásmicos de los neutrófilos (elastasa de neutrófilos y catepsina G) también son importantes para la función microbicida de los neutrófilos.

**Monocitos:** son los precursores circulantes de los macrófagos, se desarrollan en la médula ósea y permanecen más tiempo en la circulación que los neutrófilos. Entran en tejidos en los que se someten a diferenciación en macrófagos, que son característicos del tejido en el que residen, por ejemplo, los macrófagos intersticiales y alveolares en el pulmón, células de Kupffer en el hígado, osteoclastos en el hueso, y las células microgliales en el cerebro y la retina

Los macrófagos expresan una alta densidad de PRRs de superficie y, como los neutrófilos, responden rápidamente a la presencia de microorganismos. Estos dos tipos de células se complementan y cooperan, pero difieren en varios aspectos importantes. Entre éstos, los macrófagos tienen un papel importante en la digestión de los microorganismos y la presentación de antígenos microbianos a los linfocitos para iniciar una respuesta inmune adaptativa para el microorganismo. Además, los macrófagos secretan más de 100 proteínas que median la inflamación y la defensa del huésped, incluyendo potentes citoquinas (26).

Sin embargo, la inflamación es una "espada de doble filo". La microglía del sistema nervioso central ilustra este punto: estas células evolucionaron para proteger al cerebro de agresiones microbianas, pero la activación inmune en la cual la microglía es clave, es una característica común de las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y

el Parkinson, la encefalopatía viral, derrame cerebral, lesión cerebral traumática, y la esclerosis múltiple (31-33).

**Células Natural Killer (NK):** son un tipo de célula inmune innata con características únicas. Son células linfoides que no expresan receptores de antígenos específicos derivados de la exposición a antígenos específicos, tales como receptores de células T o inmunoglobulinas de superficie. Sin embargo, estudios en ratones han sugerido que las células NK pueden alterar su comportamiento en función de la exposición previa a antígenos, por un mecanismo que es diferente del de las células T y B (34-38).

**Otros tipos de células:**

- Células epiteliales y mastocitos. Al igual que los macrófagos, estas células residen en tejidos de alta exposición antigénica y expresan PRRs que les permiten reconocer PAMPs y responder con rapidez. Las células epiteliales proporcionan una barrera física continua, así como mecanismos de limpieza (como el sistema mucociliar y de revestimiento de superficie con péptidos antimicrobianos) que protegen al anfitrión del ambiente externo.

- Plaquetas: expresan PRRs, producen citoquinas, reclutan leucocitos a los lugares de daño tisular e interaccionan con los leucocitos y las células endoteliales a través de P-selectina para mediar en eventos proinflamatorios. Sin embargo, igual que otros componentes del proceso inflamatorio, en ocasiones juegan un papel patológico en casos tales como la aterosclerosis y la sepsis (39).



### **1.2.2 MANNANOSE BINDING LECTIN (MBL)**

La vía de la mannanose-binding lectin (MBL) del complemento es parte del sistema inmune innato, como hemos mencionado previamente, y parece que puede influir en el riesgo de padecer infecciones en pacientes con cáncer durante el tratamiento quimioterápico. La MBL se produce por los hepatocitos y se encuentra en la circulación como oligómeros de cadenas polipeptídicas idénticas. La unión de las regiones reconocedoras de carbohidratos de los oligómeros del MBL a estructuras específicas de carbohidratos de la membrana de los microorganismos inicia un proceso de activación (40-42). Este proceso conduce a la activación del complemento con la formación del complejo de ataque de membrana, lisis de microorganismos y formación de moléculas coadyuvantes de la fagocitosis como las opsoninas, así como la formación de anafilotoxinas quimiotácticas y activadoras de células. Así, niveles bajos de MBL se asocian a una susceptibilidad incrementada de infecciones especialmente recurrentes o graves en niños y adultos. Sin embargo, la presencia de niveles bajos de MBL de forma aislada no suele producir enfermedad, sino que ésta aparece cuando al déficit se asocian otros defectos inmunes, como puede ser un TAPH.

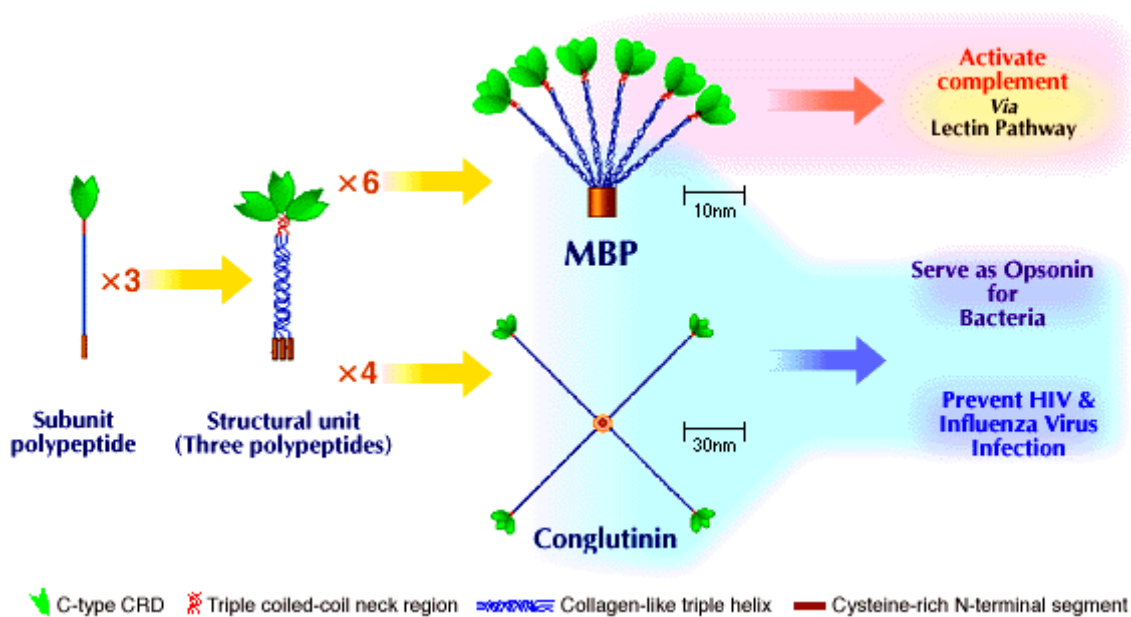
#### **1.2.2.1 Estructura de la proteína MBL**

La MBL es un complejo de estructuras de triple hélice, y cada cadena polipeptídica contiene cuatro dominios: una región *N-terminal*, rica en cisteína, de 21 aminoácidos, que está involucrada en la oligomerización mediante la formación de enlaces disulfuro intra e inter-subunidades, un dominio colágeno-*like* de 59 aminoácidos compuesto por 20 repeticiones en tándem de Glicina-Xaa-Yaa (excepto la repetición 8, que sólo consiste en Glicina-Glutamina), una  $\alpha$ -hélice de 30 aminoácidos, crucial para iniciar la

polimerización, y un dominio C terminal reconocedor de carbohidratos de 188 aminoácidos.

Aunque la MBL sérica se caracteriza por una compleja mezcla de oligómeros, actualmente se acepta generalmente que la mayor parte de la MBL sérica consiste en trímeros y tetrameros de 3 y 4 triples hélices de subunidades funcionales de MBL, pero que también es posible encontrar otras formas oligoméricas mayores (pentámeros, hexámeros) y formas oligoméricas menores (43-45) (Figura 2).

**Figura 2. Estructura molecular y actividad biológica de las colectinas**

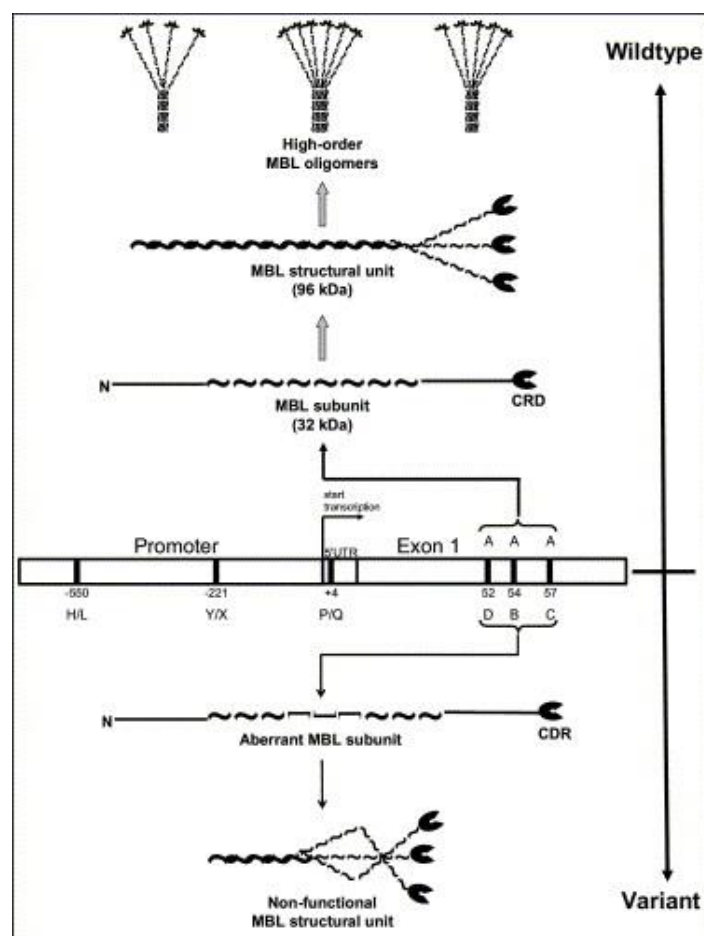


### 1.2.2.2 Variaciones genéticas del gen *MBL2*

Al gen que codifica la MBL se le conoce como *MBL2*. El exón 1 del gen *MBL2*, localizado en el cromosoma 10, contiene tres polimorfismos nucleotídicos puntuales (SNPs) en el codón 52 (CGT a TGT; Arg→Cys, llamado alelo “D”), codón 54 (GGC a

GAC: Gly→Asp, alelo “B”) y codón 57 (GGA a GAA; Gly→Glu, alelo “C”) (46). Colectivamente se denomina a estos alelos “O”, y “A” al alelo salvaje. Estos SNPs tienen como consecuencia regiones de colágeno alteradas que interfieren con la formación de oligómeros de alto orden. Esta alteración en la polimerización causa bajas concentraciones séricas de MBL de alto peso molecular y una disfunción de la misma (Figura 3). Aparte de estos polimorfismos del exón 1, hay otras muchas regiones polimórficas situadas en la región del promotor del *MBL2*, incluyendo las posiciones -550 (variante H/L) y -221 (variante X/Y), ambas sustituciones de nucleótido G a C (47).

**Figura 3. Estructura y mutaciones del MBL**



### **1.2.2.3 Epidemiología de la MBL**

Se ha descrito una gran variedad en la frecuencia de los diferentes alelos del gen *MBL2* en varios grupos étnicos en todo el mundo. La frecuencia de alelos B en algunas áreas de indios sudamericanos llega al 80%. En algunas áreas al oeste de África las variantes C llegan al 32%. En cambio, en la población aborigen de Australia no se han hallado variantes alélicas, y los alelos C y D están ausentes en esquimales y ciertas poblaciones de Sudáfrica. La alta frecuencia de variantes alélicas de *MBL2* en los diferentes grupos étnicos y áreas demográficas sugiere que las obvias desventajas inmunológicas de los niveles bajos de MBL, de alguna manera podrían tener algún beneficio (48).

Actualmente, hay dos hipótesis fundamentales que sugieren cuál podría ser la ventaja de las variantes alélicas del gen *MBL2*. Una sugiere que los niveles bajos de MBL son beneficiosos en los niños, ya que la activación del complemento mediada por la MBL podría intervenir promoviendo respuestas inmunes agresivas. La otra hipótesis sugiere que la MBL facilita la absorción de microorganismos intracelulares; por tanto, niveles bajos de MBL tendrían un efecto protector.

### **1.2.2.4 MBL e infección**

Cuando la respuesta inmune adaptativa es inmadura o está comprometida, el sistema inmune innato constituye la principal defensa contra las infecciones. Se ha observado un aumento en la incidencia de infecciones en pacientes con déficit de MBL pediátricos e inmunocomprometidos. Asimismo, se ha visto que pacientes adultos con infecciones recurrentes tienden a presentar concentraciones de MBL insuficientes (49-51).

## **MBL e infecciones bacterianas**

Un estudio británico de 266 pacientes pediátricos que padecían enfermedad meningocócica, demostró asociación entre los alelos variantes de *MBL2* y la enfermedad, sugiriendo que las variantes genéticas del gen de la MBL podrían ser responsables de un tercio de los casos (52). Asimismo, el déficit de MBL se ha asociado a infecciones bacterianas graves tras la utilización de quimioterapia o de la realización de trasplantes de progenitores hematopoyéticos (53, 54). La presencia de variantes alélicas del *MBL2* en pacientes con fibrosis quística se asocia a mal pronóstico y reducción de la supervivencia estimada en 8 años. Se ha demostrado que la causa de esta reducción de supervivencia se debe al curso más agresivo de la enfermedad pulmonar causada por la infección crónica de *Pseudomonas aeruginosa* y un mayor riesgo de adquirir una infección por *Burkholderia cepacia*, la cual se asocia a menudo con mayor mortalidad que la colonización crónica por *Pseudomonas aeruginosa*. En caucásicos, se ha sugerido que los individuos homocigotos para variantes de codones del exón 1 podrían tener un riesgo aumentado de enfermedad invasiva por neumococo (55-57). Sin embargo, una enfermedad concomitante es un factor de riesgo independiente para adquirir una infección invasiva por neumococo en estos estudios. Los pacientes con niveles bajos de MBL a los que se realiza resecciones electivas gastrointestinales por enfermedad neoplásica del tracto gastrointestinal, presentan también de forma significativa un aumento en las infecciones postoperatorias (58, 59). En contraste con las propiedades protectoras de la MBL contra las infecciones por bacterias extracelulares, se ha observado que las infecciones por micobacterias ocurren más frecuentemente en pacientes con niveles elevados de MBL. Se ha sugerido que el aumento de fagocitosis mediado por el complemento como resultado de la opsonización facilitaría estas infecciones intracelulares (60).

### **MBL e infecciones víricas**

Se ha descrito la asociación entre la infección persistente por virus de hepatitis B con alelos variantes de *MBL2*, así como una supervivencia superior en pacientes con hepatitis B y altos niveles de MBL (61-63). Sin embargo, la asociación de la MBL con la infección por el virus de la hepatitis C es menos concluyente (64-67). El papel de la MBL en relación con la enfermedad por VIH se ha estudiado ampliamente. Hay estudios que demuestran un aumento de las concentraciones séricas de la MBL durante la infección por VIH, indicando un papel de la MBL en la patogénesis y progresión de la infección por VIH (68, 69).

### **MBL e infecciones fúngicas**

El manano es un componente fundamental de las paredes fúngicas, y la MBL se une con gran avidez a *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*, así como a *Cryptococcus neoformans* (70-72).

En un modelo murino se comprobó que la MBL juega un papel protector en la aspergilosis pulmonar invasiva (73). Este hallazgo también se ha comprobado en pacientes inmunocomprometidos, y de la misma forma se ha observado que influye en el resultado de pacientes sometidos a alotrasplante de progenitores hematopoyéticos, presentando un aumento de infecciones fúngicas invasivas los pacientes con disfunción en la vía de la MBL (74-76).

### **MBL e infección por protozoos**

Niños hospitalizados de Gabón con malaria severa presentaron niveles inferiores de MBL, comparado con niños con malaria moderada (77). Un estudio mayor de niños de Gambia no mostró aumento global en los alelos variantes de *MBL2* en pacientes con

malaria severa. Hubo un aumento de pacientes O/O entre aquellos con malaria cerebral, pero éste no fue estadísticamente significativo (78).

### **MBL e infecciones en pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos**

Como se ha expuesto previamente, los polimorfismos del gen *MBL2* y los niveles bajos de la MBL se han asociado con un aumento de las infecciones graves en pacientes inmunodeprimidos. Esto se ha puesto de manifiesto en varios estudios que comparan la incidencia de infecciones graves en pacientes sometidos a la realización de un alo-TPH en función de los polimorfismos del *MBL2* o los niveles de MBL (75, 76, 79, 80), aunque en un estudio de Chaudhry (81), en el que se comparaban las infecciones en niños sometidos a alo-TPH, la baja concentración de MBL sérica no se asoció con aumento de la susceptibilidad de ningún tipo de infección post- trasplante.

Respecto a la incidencia de infecciones en pacientes que reciben un TAPH, en un estudio de Mølle (82) se comprobó que los pacientes homocigotos para el alelo salvaje de *MBL2* tenían un riesgo menor de padecer una septicemia, comparado con los pacientes que presentaban el alelo variante de *MBL2*; asimismo, en el estudio de Horiuchi et al (83), se observó que los genotipos que producen bajos niveles de MBL se asocian con un aumento de infecciones bacterianas graves.

### **1.2.3 RECEPTORES TOLL-LIKE (TLR)**

Los Toll-like receptors (TLRs) son proteínas transmembrana tipo I con ectodominios que contienen repeticiones ricas en leucina, que median en el reconocimiento de PAMPs. Hasta el momento actual, se han identificado 10 TLRs funcionales en el hombre (Tabla 3) y 12 en el ratón, estando presentes los TLR1 a TLR9 en ambos (84).

**Tabla 3. Receptores Toll- Like**

<b>PRRs</b>	<b>Localización</b>	<b>Ligando</b>	<b>Origen microbiano del ligando</b>
TLR1	Membrana plasmática	Lipoproteína	Bacterias
TLR2	Membrana plasmática	Lipoproteína	Bacterias, virus, parásitos
TLR3	Endolisosoma	RNA	Virus
TLR4	Membrana plasmática	Lipopolisacárido	Bacterias, virus
TLR5	Membrana plasmática	Flagelina	Bacterias
TLR6	Membrana plasmática	Lipoproteína	Bacterias, virus
TLR7/8	Endolisosoma	RNA	Virus, bacterias
TLR9	Endolisosoma	DNA	Virus, bacterias, protozoos
TLR10	Endolisosoma	Desconocido	Desconocido

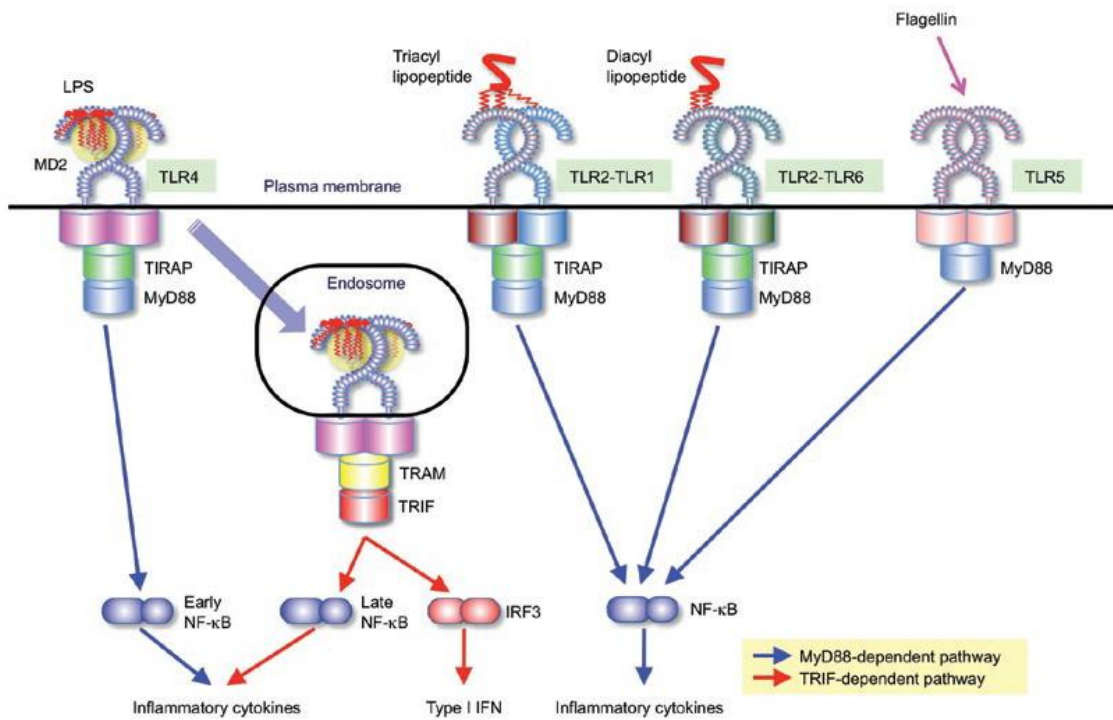
Los PAMPs reconocidos por los TLRs incluyen lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos provenientes de una amplia variedad de microorganismos como bacterias, virus, parásitos y hongos. El reconocimiento de los PAMPs por los TLRs se lleva a cabo en varios compartimentos celulares que incluyen la membrana plasmática, endosomas, lisosomas y endolisosomas. Los estudios realizados indican que hay vías de señalización específicas según el tipo celular que definen las propiedades inmunológicas de los TLR. Por ejemplo, las células dendríticas plasmocitoides y los monocitos inflamatorios tienen una vía de señalización única que gobierna las respuestas antivíricas que probablemente está ausente en otros tipos celulares (85, 86). Aunque los TLRs son esenciales para inmunidad protectora contra las infecciones, las respuestas inapropiadas de los TLRs contribuyen a la inflamación aguda y crónica, así como a la aparición de enfermedades sistémicas autoinmunes. De hecho, los ratones con defectos en la regulación negativa de la respuesta mediada por TLRs desarrollan este tipo de enfermedades. Más aún, existe evidencia creciente que indica que moléculas endógenas producidas por células muertas, o en ciertas condiciones patológicas,



estimulan los TLRs, teniendo como resultado el desarrollo o aceleración de enfermedades inflamatorias o autoinmunes.

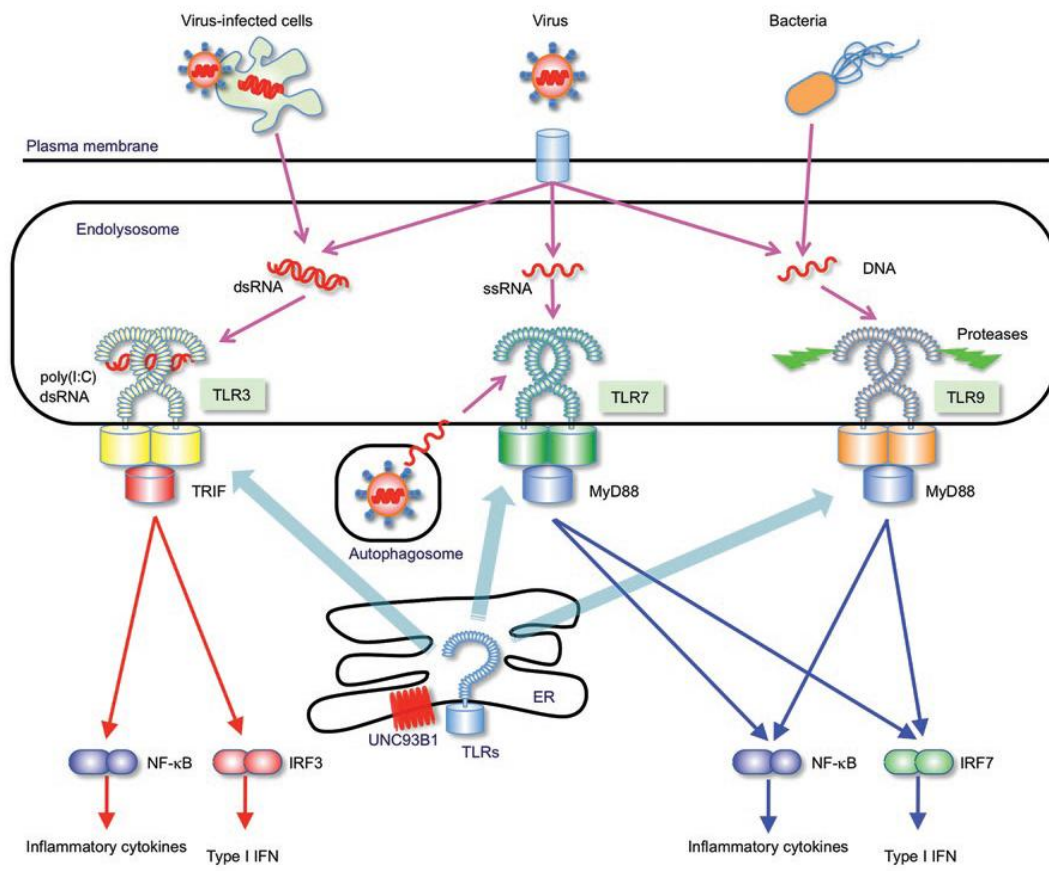
Los TLRs se dividen en dos subgrupos dependiendo de su localización celular y los ligandos PAMP. Un grupo contiene TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 y TLR11, que se expresan en las superficies celulares y reconocen principalmente componentes de las membranas de los microorganismos como lípidos, lipoproteínas y proteínas (Figura 4).

**Figura 4. Reconocimiento de PAMP por TLRs de superficie celular.**



El otro grupo está compuesto por TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, los cuales se expresan exclusivamente en vesículas intracelulares como el retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas y endolisosomas, donde reconocen ácidos nucleicos (Figura 5).

**Figura 5. Reconocimiento de PAMPs mediante TLRs intracelulares.**



### **1.2.3.1 Mecanismo de actuación de TLR4 y TLR2**

TLR4 responde al lipopolisacárido (LPS) bacteriano, un componente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas que puede causar shock séptico (87). TLR4 forma un complejo con MD2 en la superficie celular, y juntos constituyen el componente principal de unión al LPS. La formación resultante, consistente en un receptor multimérico compuesto por dos copias del complejo TLR4-MD2-LPS inicia la transducción de señales mediante el reclutamiento de moléculas adaptadoras intracelulares. Otras proteínas adicionales, como la “Lipopolysaccharide binding protein” (LBP) y CD14, también están involucradas en la unión a lipopolisacáridos. LBP es una proteína plasmática soluble que se une al lipopolisacárido y CD14 es una proteína glicosilfosfatidilinositol que se une a la membrana celular sin tener dominio intracelular. Se expresa en monocitos, macrófagos y polimorfonucleares. Tiene alta afinidad por el lipopolisacárido de bacterias gramnegativas aunque también interactúa con otros productos microbianos como: lipoarabinomanano, componentes de pared celular, peptidoglicanos, antígeno W-1 y lipoproteínas de espiroquetas.

Los receptores CD14 son fundamentales para el reconocimiento del lipopolisacárido, pero al no tener dominio intracelular tienen que interactuar con un receptor que lo tenga para poder enviar información transmembrana. De esta manera CD14 se une a TLR4, formando el complejo CD14-TLR4 que es de gran importancia en la inmunidad innata y en la generación de respuesta inflamatoria.

El TLR2 se encuentra involucrado en el reconocimiento de una amplia variedad de PAMPs derivados de bacterias, hongos, parásitos y virus (87).

Estos incluyen lipopéptidos de las bacterias, peptidoglicano y ácido lipoteicoico de bacterias grampositivas, lipoarabinomanano de micobacterias, zimosano de los hongos etc. Generalmente forma heterodímeros con el TLR1 o TLR6. En concreto, el

heterodímero TLR2-TLR1 reconoce lipopéptidos triacilados de bacterias gramnegativas y micoplasma, y el heterodímero TLR2-TLR6 reconoce lipopéptidos diacilados de bacterias grampositivas y micoplasma.

### **1.2.3.2 Polimorfismos de TLR**

Muchos grupos de investigación han intentado identificar la existencia de asociación entre los SNPs y riesgo de infección.

Los TLR2 reconocen el peptidoglicano de la pared bacteriana de las bacterias grampositivas, hongos y micobacterias. Los ratones con defectos en los TLR2 son altamente susceptibles de presentar infecciones por *S. aureus* y determinados polimorfismos de los TLR2 podrían predisponer a ciertos individuos a presentar infecciones graves por *S. aureus* (88).

Se ha descrito que el CMV activa la respuesta inflamatoria interaccionando con los TLR2 (89). También se ha encontrado asociación entre polimorfismos de TLR2 y riesgo de infección CMV en pacientes con trasplante hepático (90).

El TLR4 reconoce el lipopolisacárido de la pared bacteriana de las bacterias gramnegativas. En humanos se han identificado varios polimorfismos que afectan al gen de TLR4, por ejemplo, las mutaciones que afectan a al dominio extracelular de los TLR4 parecen asociarse con una incidencia aumentada y una mayor gravedad de sepsis en enfermos críticos, y se ha observado que en los pacientes que presentan mutaciones del TLR4, pero no del CD14, hay un aumento de la incidencia de infecciones por gramnegativos en pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos (91-93).

Los dominios citoplasmáticos de los distintos TLR no son equivalentes, y en determinadas ocasiones se precisa la interacción entre varios dominios para obtener una respuesta frente a un determinado microorganismo. Así, los dominios citoplasmáticos

de TLR2 y TLR6 interaccionan en el reconocimiento del peptidoglicano de gérmenes grampositivos. En cambio, TLR4 es capaz de activar la vía del factor de transcripción kappa B como homodímero, sin precisar la interacción con otros receptores. Por tanto, es posible que estas moléculas formen un repertorio de combinaciones para el reconocimiento inmunológico.

La detección de polimorfismos de los genes TLR2 y TLR4 en pacientes sometidos a un TAPH permitiría identificar grupos de pacientes con riesgo aumentado de infecciones graves que serían candidatos de medidas preventivas más específicas.

El papel de estos receptores en la destrucción celular, daño orgánico crónico diferenciación así como neoplásico es todavía desconocido.

#### **1.2.4 VARIACIONES DEL SISTEMA INMUNE INNATO Y TAPH**

Como se ha expuesto previamente, en los pacientes sometidos a TAPH existe una mayor incidencia de determinadas infecciones oportunistas, y en algunos casos éstas cursan con mayor gravedad. Este hecho podría estar relacionado no sólo con la inmunodeficiencia debida al trasplante, sino también con la presencia de variantes genéticas del sistema inmune innato (MBL y TLR) que predisponen a presentar infecciones frecuentes y/o graves en situación de inmunodepresión, como se ha publicado en recientes artículos, en los que se ha asociado mayor predisposición de infecciones y más graves en aquellos pacientes con polimorfismos y niveles bajos de MBL (75, 93). Sin embargo en otras publicaciones no se encuentra dicha predisposición, quedando importantes dudas por resolver (81, 95). De todo ello se deduce el interés de conocer si existe relación entre los polimorfismos del sistema inmune innato y el riesgo de infección en pacientes a los que se realiza un TAPH.



## 2. HIPÓTESIS

---





En los pacientes sometidos a un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos existe una mayor incidencia de determinadas infecciones oportunistas, y en algunos casos éstas cursan con mayor gravedad. Este hecho podría estar relacionado no sólo con la inmunodeficiencia debida al trasplante sino también con la presencia de variantes genéticas en receptores del sistema inmune innato como la MBL y los TLRs, que predisponen a presentar infecciones frecuentes y/o graves en situación de inmunodepresión.

El conocimiento de subgrupos de pacientes con predisposición genética a infecciones causadas por determinados microorganismos podría contribuir a mejorar el manejo clínico de estos pacientes.



### **3. OBJETIVOS**

---



## **A. OBJETIVO PRINCIPAL**

Analizar la posible asociación entre la incidencia y gravedad de determinadas infecciones oportunistas en pacientes con TAPH y la presencia de variantes polimórficas en los genes de la MBL, responsables de niveles bajos de MBL y de los TLR2 y 4.

## **B. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Estudiar en los pacientes con TAPH la presencia de polimorfismos en los genes de la MBL.
2. Estudiar en los pacientes a los que se realiza un TAPH la asociación entre los polimorfismos en los genes de la MBL y los niveles de MBL.
3. Analizar la relación entre los polimorfismos genéticos del *MBL2* con la incidencia y gravedad de las infecciones oportunistas de los pacientes sometidos a un TAPH.
4. Analizar si existe relación entre los polimorfismos en los genes de la MBL con la mortalidad secundaria a infección en los pacientes con TAPH.
5. Analizar si hay asociación entre los niveles bajos de MBL y la evolución de los pacientes sometidos a TAPH.
6. Determinar si existe una relación entre los polimorfismos en los genes de los TLR2 y 4 y la incidencia de infecciones oportunistas en pacientes con TAPH.



## **4. PACIENTES Y MÉTODOS**

---





#### **4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Con el fin de responder a los objetivos detallados con anterioridad se eligió un estudio de cohortes prospectivo.

#### **4.2 PERIODO DE ESTUDIO**

Desde febrero 2005 hasta junio 2007.

#### **4.3 ÁMBITO DEL ESTUDIO**

El presente estudio se realizó en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) situado en Santander (Cantabria). Es un Hospital de tercer nivel, de 1.000 camas y pertenece al Servicio Cántabro de Salud. Es el centro de referencia de la Comunidad Autónoma de Cantabria y da cobertura a una población aproximada de 535.000 habitantes. Está dotado de un programa de trasplante de progenitores hematopoyéticos, de una Unidad de Enfermedades Infecciosas, y de Servicios de Microbiología y de Inmunología. Para la especialidad de Hematología es además centro de referencia de alo-TPH convencional, de intensidad reducida, emparentado y no emparentado. Durante el periodo de referencia de este estudio no se realizaban trasplantes de cordón umbilical, pero en el momento actual también se realizan este tipo de trasplantes.

El servicio de Hematología está formado por 18 médicos especialistas de plantilla y 8 médicos especialistas en formación. Se realizan aproximadamente 80 trasplantes de progenitores hematopoyéticos al año, de los que el 40% son autólogos.

Durante la realización del presente trabajo, disponíamos de una planta completa, la 9ª Sur, para el tratamiento de los pacientes con neoplasias hematológicas, en la que había 16 habitaciones individuales y otras 2 habitaciones con flujo laminar.

#### **4.4 SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO**

La población de referencia la constituyeron los pacientes sometidos a TAPH en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, en el periodo indicado.

- Criterios de elegibilidad: Todos los pacientes trasplantados durante el periodo de estudio.
- Criterios de exclusión: Pacientes menores de 13 años, existencia de otras inmunodeficiencias (neoplasias, infección por VIH o inmunodeficiencias congénitas).
- Población de estudio: Todos los pacientes que cumplieron los criterios de elegibilidad/exclusión, que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

Se formó una sola cohorte de pacientes en la que los sujetos se clasificaron en distintas categorías según su nivel de exposición (presencia de polimorfismos genéticos y/o niveles de MBL). La inclusión de pacientes se hizo prospectivamente a lo largo del periodo de estudio (población dinámica).

## **4.5 SEGUIMIENTO Y RECOGIDA DE INFORMACIÓN**

Una vez que el paciente era incluido en el estudio se monitorizaba prospectivamente. Para la recogida de información se diseñó un cuestionario de recogida de datos (Anexo 1). Todas las variables se recogieron siguiendo las definiciones y criterios previamente acordados y no se han modificado a lo largo del estudio.

### **4.5.1 SEGUIMIENTO**

Los pacientes fueron seguidos durante 6 meses para detectar y recoger los episodios de infección intercurrente. Se obtuvieron muestras de sangre para analizar los polimorfismos genéticos citados antes del trasplante. La concentración sérica de MBL se determinó antes y después del trasplante.

En los pacientes se realizaron determinaciones seriadas de niveles séricos de MBL de la siguiente forma: previa al trasplante, semanalmente durante el primer mes post-trasplante, quincenal y mensualmente durante los 5 meses siguientes post-trasplante. Si existió episodio de infección se determinaron niveles bisemanales hasta resolución de la misma en los casos en los que fue factible, desestimándose por ejemplo en pacientes de otras comunidades autónomas por problemas en la recogida de la muestra.

### **4.5.2 DEFINICIÓN DE VARIABLES**

#### **4.5.2.1 Variable resultado**

Presencia de infecciones intercurrentes.

Se recogieron todas las infecciones que tuvieron lugar tanto en el acondicionamiento, como en el periodo de neutropenia (30 días post-trasplante), periodo intermedio (días 31-100 post-trasplante) y periodo tardío (101-180 días post-trasplante).

Las medidas preventivas de infección en el momento del estudio consistieron en la utilización durante la fase neutropénica de habitaciones con flujo laminar y aislamiento inverso.

El diagnóstico de infección se realizó conforme al protocolo de prevención y manejo de las infecciones en estos pacientes del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, el cual se ajusta a las normas clínicas de la Infectious Diseases Society of America (IDSA) (96).

Las infecciones objeto de vigilancia (siguiendo las definiciones de los protocolos habituales), se recogieron como sucesivos episodios de infección de forma cronológica, con la siguiente información:

1. Tipo de infección.

- Confirmada: Existencia de documentación microbiológica.
- No confirmada: Ausencia de documentación microbiológica con datos clínicos y/o analíticos de infección.

2. Manifestaciones clínicas.

- Fiebre sin foco evidente.

- Fiebre con foco: Infección respiratoria/neumonía; infección urinaria, infección de vía central; infección abdominal entre otras.
3. Documentación microbiológica (Anexo 1): se recogieron los microorganismos para cada episodio, pudiendo existir varias documentaciones microbiológicas para un mismo episodio de infección, que se denominaron infecciones polimicrobianas.
4. Gravedad.
- Infección leve: Datos clínicos de infección y analítica sin parámetros de sepsis, ni datos de inestabilidad hemodinámica.
  - Infección moderada: Datos clínicos de infección y analítica con parámetros de sepsis, sin datos de inestabilidad hemodinámica.
  - Infección grave: Infección moderada con datos de inestabilidad hemodinámica que remonta con sueroterapia.
  - Shock séptico: Infección grave que precisa inotrópicos.
  - Éxito: Shock séptico que condiciona el fallecimiento del paciente.

#### **4.5.2.2 Variables de exposición**

Existencia de polimorfismos en los genes de la MBL y en los TLR2 y TLR4.

También se analizaron los niveles séricos de MBL antes del trasplante y de forma periódica durante el seguimiento con el fin de describir la curva de concentración sérica en los pacientes con y sin infección intercurrente y relacionarla con los polimorfismos subyacentes.

Para el análisis secuencial de las variantes genéticas del *MBL2* y de los TLR2 y TLR4 se realizó una extracción de una muestra de sangre del antes del trasplante.

Se realizó una extracción de suero antes de iniciar el acondicionamiento pretrasplante, una muestra semanal durante el primer mes, quincenal durante los tres siguientes meses y mensual hasta la conclusión del seguimiento. En caso de sospecha de infección oportunista se extrajo suero dos veces por semana hasta la resolución del cuadro

#### **4.5.2.3 Otras variables independientes**

- Datos demográficos del receptor y del donante: sexo, edad, raza.
- Datos relativos al trasplante.
  - Enfermedad hematológica de base: leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda, síndromes mieloproliferativos crónicos, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, síndromes linfoproliferativos crónicos, linfoma no Hodgkin y enfermedad de Waldstrom.
  - Fecha de diagnóstico de la enfermedad hematológica.
  - Fecha de trasplante: Día de infusión, es el día 0.
  - Tratamiento de acondicionamiento
  - Profilaxis reglada de infecciones oportunistas: se recogieron los antibióticos, antifúngicos y antivíricos utilizados para cada periodo.
  - Fechas de inicio y final de la neutropenia: desde la cifra de <500 neutrófilos hasta la recuperación granulocitaria, cifra de granulocitos >500.
  - Duración de la neutropenia febril.
  - Fármacos administrados: antimicrobianos utilizados para cada episodio de infección, así como la duración.
  - Actividad de la enfermedad, enfermedad activa versus no activa, definiendo enfermedad activa como aquella que no cumple criterios de remisión completa y enfermedad no activa la que si cumple los criterios.

Se definió remisión completa en linfomas la desaparición de toda evidencia de enfermedad, con desaparición de masas nodales en TAC (en caso de presentar un PET positivo previo, se permitió la presencia de masas de cualquier tamaño si el PET era negativo). Bazo e hígado debían no ser palpables, con desaparición de nódulos, y en caso de infiltración de la médula ósea, debían desaparecer los infiltrados en una biopsia posterior (97). En el caso de los pacientes diagnosticados de mieloma múltiple, los criterios de remisión que debían cumplirse eran presentar una inmunofijación negativa en suero y orina, desaparición de plasmocitomas y una presencia  $\leq 5\%$  de células plasmáticas en médula ósea (98). Los criterios de remisión completa en pacientes diagnosticados de leucemia mieloblástica aguda consistieron en una morfología normal del aspirado de médula ósea, con presencia de  $< 5\%$  de blastos medulares, una citogenética y biología molecular normales (99). En el caso de los pacientes diagnosticados de amiloidosis, se consideró respuesta hematológica completa la presencia de una inmunofijación negativa en suero y orina, con una ratio de cadenas ligeras libres normal, una respuesta del péptido pronatiurético *N*-terminal tipo B  $>30\%$  y disminución  $> 300$  ng/L si el basal  $\geq 650$  ng/L, y una: disminución  $\geq 2$  clases de la New York Heart Association si clase basal 3 o 4 (100).

- Otros factores de riesgo de infecciones oportunistas.
  - Enfermedades de base: diabetes, EPOC, hipertensión arterial, hepatopatía, insuficiencia renal crónica, neoplasia sólida.
  - Desarrollo de mucositis y gravedad (I-IV): grado I (dolor y eritema), grado II (eritema y úlceras pero no impiden la ingesta de sólidos), grado III (eritema

extenso y úlceras, sólo tolera dieta líquida) y grado IV (imposibilidad para dieta oral, precisa nutrición parenteral).

- Accesos venosos: central, periférico, central de inserción periférica y duración de los mismos.
- Otras maniobras invasivas: colocación de sondaje urinario, nutrición parenteral.

- Datos microbiológicos.

Además de las pruebas de diagnóstico microbiológico que se realizaron de forma protocolizada en estos pacientes en el Servicio de Hematología de nuestro centro, basadas en las normas clínicas de la Infectious Diseases Society of America (IDSA, 96), en los pacientes se realizó la determinación del galactomanano bisemanalmente durante los seis meses post-trasplante, tanto si existió fiebre como si existió sospecha de aspergilosis pulmonar y se relacionó con la clínica del paciente. El diagnóstico de IFI se estableció en base a los criterios de EORTC/MSG (101).

También se determinó de manera establecida semanalmente, la antigenemia CMV desde el prendimiento granulocitario y en aquellos pacientes con sospecha de CMV.



### **4.5.3 FUENTES DE RECOGIDA DE LA INFORMACIÓN**

La información se recogió mediante revisión prospectiva de la historia clínica de cada paciente hasta el alta hospitalaria con una última revisión final tras el alta. En aquellos casos en los que no se recogieron todos los datos de esta forma se revisó la historia posteriormente.

La recogida de información sobre la existencia de infecciones intercurrentes se realizó de forma enmascarada sobre la presencia o no de polimorfismos genéticos y/o niveles de MBL.

El análisis de las muestras para el procesamiento de los polimorfismos genéticos y la determinación de MBL se hizo de forma enmascarada sobre la presencia o no de infecciones en los pacientes

### **4.5.4. Procedimientos técnicos**

- Muestras: Las muestras de suero se obtuvieron a partir de muestras de sangre de 2-5 ml sin anticoagulante para su posterior extracción y almacenamiento hasta su uso.

Para la obtención de DNA genómico, se utilizaron tubos EDTA de 5 ml y se guardaron congelados a -20° en alícuotas de 1,5 ml. Se utilizó una técnica estándar de extracción de DNA (QuiaAmp blood DNA isolation kit) de los tubos de 1,5 ml, siguiendo las recomendaciones del kit.

- Análisis de secuencia de las variantes alélicas del gen MBL: Mediante secuenciación se asignaron las distintas de combinaciones de los haplotipos previamente identificados (LXPA, LYPA, LYPB, HYPA, HYPD, LYQA, LYQC). Estos haplotipos se basaron en

las combinaciones de varias posiciones polimórficas establecidas en la región del promotor y en el exón 1 del gen MBL. Mediante PCR se amplificó un fragmento de 900 pb utilizando los cebadores MBLProm.Fw (5'GGGGAATTCCTGCCAGAA3') y MBLEx1.Rv (5'CATATCCCCAGGCAGTTTCCTC3') localizados en la región 5' y en el exón 1 del gen MBL respectivamente. La PCR se realizó en tubos con un volumen final de 50 microlitros conteniendo de 100-500 ng de DNA, 2 pmol/ml de los cebadores específicos en presencia de 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM dNTPs, 10 mM tris-Hcl (ph 9,5) y 0,5-2 unidades de Taq expand DNA polymerase (Boehringer Mannheim). Las condiciones de termociclación son un paso previo de desnaturalización a 94° de 8 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°, 30 segundos a 58° y 90 segundos a 72°, con una extensión final de 10 minutos a 72°. El producto de la amplificación se purificó usando el QIAquick PCR purification kit siguiendo instrucciones del kit. La reacción de secuenciación se realizará utilizando terminadores marcados con rodamina (dRhodamine sequencing kit) en un secuenciador automático Beckman Systems 8 capilares.

Se utilizó la sub-clasificaron según las mutaciones del exón y la mutación X/Y del promotor: YA/YA, XA/YA, XA/XA (A/A, homocigotos para el alelo no mutado, no deficientes) YA/O, XA/O (A/O; heterocigotos, deficientes) y O/O (homicigotos para el alelo mutado, deficientes).

- Cuantificación sérica de MBL: Los niveles de MBL en suero fueron medidos mediante el Mannan-binding lectin ELISA kit (Antibodyshop, DK) siguiendo instrucciones del kit. En resumen 100 ml de suero diluido 1:10 y 1:50 es inicialmente incubado en placas con anticuerpos anclados en sus pocillos. El MBL en los pocillos se

unirá al anticuerpo y el resto de componentes se eliminó por lavado. Un anticuerpo anti MBL marcado con biotina se añadió en la segunda incubación con la lectina. La estreptavidina peroxidasa formó un complejo con la biotina en la tercera incubación. La actividad del enzima se cuantificó mediante la adicción de peróxido de hidrógeno y tetrametil benzidina. Después de detener la reacción enzimática con ácido sulfúrico, el coeficiente de extinción a 450 nm es proporcional a la concentración de MBL. Se construyó una curva de calibración utilizando los estándares del kit y la concentración de MBL en la muestra se calculó en ng/ml. El límite inferior de detección fue de 5 ng/ml y el rango óptimo de medida está entre 50-2.500 ng/ml.

En este estudio se han analizado los niveles medios de MBL para cada periodo y estos niveles se han asociado con los genotipos y las infecciones. La deficiencia de MBL, no está claramente definida. En este trabajo se utilizaron como puntos de corte en asociación a infecciones los niveles de MBL <500 ng/ml (niveles muy bajos) y <1.000 ng/ml (niveles bajos) (102).

- Análisis de secuencia de las variantes génicas TLR2 y TLR4: Mediante secuenciación se identificaron combinaciones homo o heterocigóticas de los polimorfismos previamente identificados en el gen TLR2 (Arg677Trp,Arg753) y TLR4 (Asp299Gly,Thr399 y Asp299Gly,Thr399Ile). Todos los polimorfismos TLR2 y TLR4 descritos hasta la fecha residen dentro del exón 3 de sus respectivos genes, los cuales codifican para las proteínas maduras TLR2 y TLR4 (la mayor parte de su región extracelular, transmembranal y citoplasmática). Se utilizaron cebadores específicos para amplificar un fragmento de 2.5 Kb que cubre desde el comienzo del exón 3 hasta el codón de terminación de ambos genes TLR2 y TLR4. El kit PCR-optimizer (invitrogen)

se utilizó para establecer las condiciones idóneas de PCR. El producto de la amplificación se purificó usando el QIAquick PCR purification kit siguiendo instrucciones del kit. La reacción de secuenciación se realizó utilizando terminadores marcados con rodamina (dRhodamine sequencing kit) en un secuenciador automático Beckman Systems 8 capilares. La reacción de secuenciación se realizó usando los cebadores utilizados en la PCR además de una serie de cebadores internos para designar específicamente las posiciones polimórficas que definen las variantes alélicas de estos genes. De esta manera toda la región codificante del exón 3 de los genes TLR2 y TLR4 fue cubierta. La técnica de secuenciación propuesta es ventajosa en aras de la detección de nuevas mutaciones codificantes o silentes no detectadas mediante técnicas de SSP-PCR o RFLP-PCR.

#### **4.6 ANÁLISIS DE DATOS**

La información se codificó e introdujo en una base de datos creada para tal fin en el programa Acces-2000 de Microsoft Office. Toda la depuración y análisis de la información se realizó con el programa SPSS 17.0 y STATA SE 10.1. Inicialmente se procedió a la depuración de los datos utilizando diversas pruebas lógicas y de rango y la distribución de los valores perdidos (missing).

Los datos cualitativos se expresaron en porcentajes. Los datos cuantitativos se expresaron en forma de media y desviación estándar. Las proporciones se compararon mediante un test de chi-cuadrado o un test exacto de Fisher cuando fue necesario. El Test de Fisher se estimó mediante el método de Monte Carlo en el caso de tablas  $m \times n$ . Las medias se compararon utilizando el test de ANOVA de 1 y 2 vías o un test de

Kruskall-wallis si la muestra no tuvo una distribución normal y cuando correspondió con un análisis Post-hoc de Bonferroni o Tamhane.

Se calcularon Riesgos Relativos (RR) y sus Intervalos de Confianza (IC) al 95% para analizar la asociación entre la presencia de polimorfismos genéticos y/o niveles de MBL y el riesgo de infecciones intercurrentes (globalmente y por microorganismos), siendo la variable dependiente los pacientes con infección.

Se realizó análisis multivariable mediante regresión logística para estimar la relación anterior ajustando por posibles factores de confusión. Los factores de confusión por los que ajustar se identificaron según la información de estudios previos y mediante análisis estratificado ( $p < 0,2$  en el univariante). Se construyeron modelos de regresión para cada tipo de infección utilizando como variable resultado las variables relacionadas con la infección y como variable independiente el tipo de genotipos MBL2, ajustando por los factores de confusión identificados.

#### **4.7 ASPECTOS ÉTICOS**

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio **(Anexo 2)**.

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético de la Comunidad Autónoma de Cantabria.



## **5. RESULTADOS**

---





## **5.1 CARACTERÍSTICAS DEL TRASPLANTE**

### **5.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y DEL TRASPLANTE**

Desde el 28 de Febrero de 2005 hasta el 30 de Junio de 2007, se llevaron a cabo 150 trasplantes de progenitores hematopoyéticos en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV); de éstos, 76 fueron alo-TPH y 74 TAPH. Fueron excluidos cuatro pacientes a los que se realizó un alotrasplante porque no cumplían los criterios de inclusión del protocolo, y dos pacientes a los que se realizó un trasplante autólogo porque habían sido trasplantados por enfermedades de base que no eran hematológicas. Los pacientes fueron seguidos durante 6 meses tras el trasplante.

Se incluyeron por tanto 72 pacientes con TAPH (Tabla 4). La mediana de edad en el momento del trasplante fue de 54 años (19-74). Cuarenta y dos pacientes eran hombres. Treinta y un pacientes (43,1%) no presentaban ninguna enfermedad de base previa distinta a la hematológica, 7 eran hipertensos (9,7%), 6 (6,9%) eran diabéticos, 2 (2,8%) presentaban una EPOC, 1 (1,4%) tenía asma bronquial, 4 (5,6%) tenían insuficiencia cardiaca, 3 (4,2%) tenían antecedentes de una neoplasia sólida, 2 (2,8%) pacientes presentaban pluripatología y 18 (25,2%) otras patologías.

Las enfermedades hematológicas que motivaron el trasplante fueron: linfoma no Hodgkin en 29 (40,3%), mieloma múltiple en 20 (27,8%), enfermedad de Hodgkin en 13 (18,1%), neoplasia aguda mieloide en 8 (11,1%), leucemia prolinfocítica en 1 (1,4%) y amiloidosis en 1 (1,4%). Dieciocho pacientes (25%) presentaban enfermedad activa en el momento del trasplante, mientras que 54 (75%) estaban en remisión completa.

**Tabla 4. Características de 72 pacientes sometidos a TAPH**

<b>Variables Categóricas</b>	<b>Número</b>	<b>(N=72) (%)</b>
<b>Paciente</b>		
Edad mediana al trasplante	54	(19,74)
Sexo (varones/mujeres)	42/30	(58/42)
<b>Enfermedad hematológica</b>		
Linfoma no Hodgkin	29	(40,3)
Mieloma múltiple	20	(27,8)
Linfoma de Hodgkin	13	(18,1)
Neoplasia aguda mieloide	8	(11,1)
Leucemia Prolinfocítica	1	(1,4)
Amiloidosis	1	(1,4)
<b>Líneas de tratamiento previas</b>		
Ninguna	1	(1,4)
1	19	(26,4)
2	36	(50)
3	14	(19,4)
4	2	(2,8)
Radioterapia	15	(18,8)
<b>Situación de la enfermedad</b>		
Remisión completa	54	(75)
Remisión parcial/progresión	18	(25)
<b>Acondicionamiento</b>		
Busulfán + Ciclofosfamida	8	(11,1)
Radioterapia + ciclofosfamida	2	(2,8)
BEAC	19	(26,4)
BEAM	21	(29,2)
Melfalán	20	(27,8)
Otros	2	(2,8)

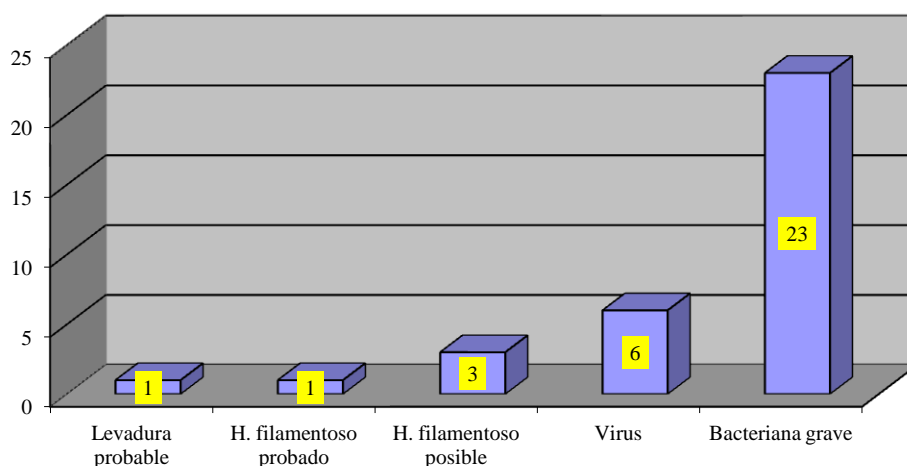
En relación a las líneas de tratamiento que recibieron previas al trasplante: 1 paciente (1,4%) no había recibido ninguna, 19 (26,4%) una línea previa de tratamiento, 36 (50%) dos líneas, 14 (19,4%) 3 líneas de tratamiento y 2 (2,8%) 4 líneas de tratamiento. A destacar que 15 (18,8%) pacientes habían sido tratados con radioterapia.

Se utilizaron los siguientes esquemas en el acondicionamiento: busulfán + ciclofosfamida en 8 (11,1%), radioterapia + ciclofosfamida en 2 (2,8%), BEAC en 19 (26,4%), BEAM en 21 (29,2%), melfalán en 20 (27,8%) y en 2 pacientes (2,8%) se utilizaron otros esquemas.

### 5.1.2 INFECCIONES PREVIAS AL TRASPLANTE

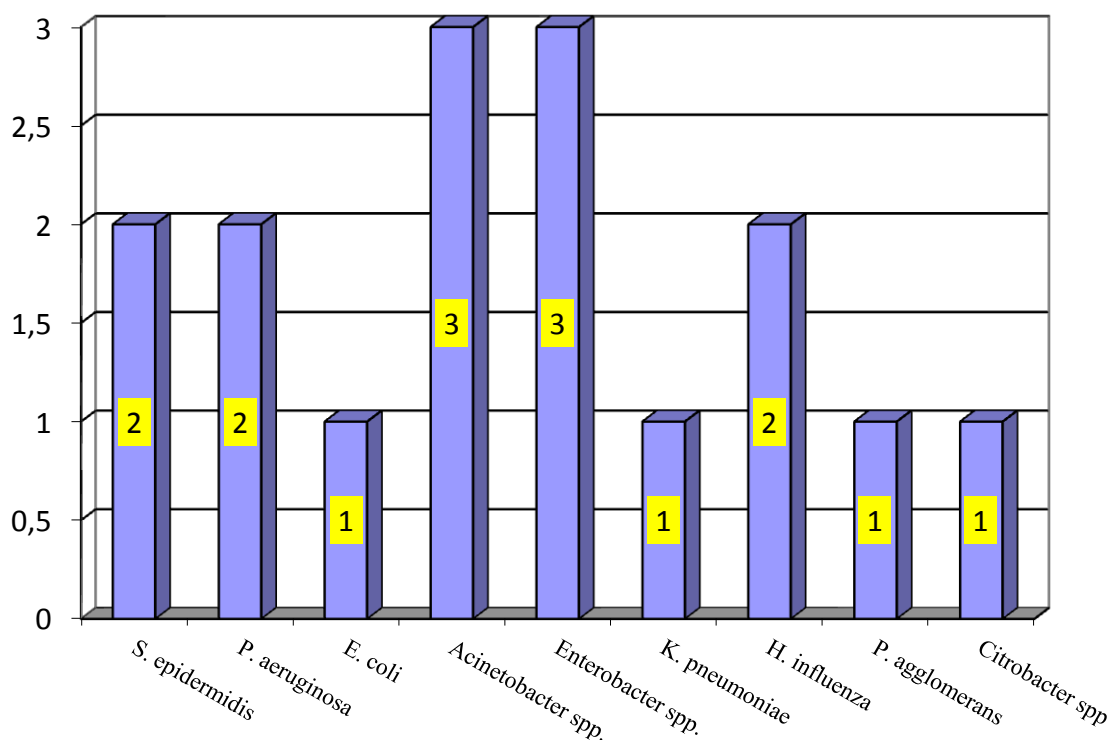
Cuarenta y siete (65,3%) pacientes no tenían antecedentes de infecciones graves previas. En 25 pacientes (34,7%) había un total de 34 episodios de infección previo. Había 23 (67,6%) episodios de infección bacteriana grave, una (2,9%) infección fúngica probable por levaduras, una (2,9%) infección fúngica probada por hongos filamentosos, 3 (8,8%) infecciones posibles por hongos filamentosos y 6 (17,6%) infecciones víricas (Figura 6).

**Figura 6. Número de infecciones pretrasplante en 25 pacientes:**



Durante el acondicionamiento, 16 pacientes (22,2%) presentaron al menos una infección, de los cuales 15 (93,8%) presentaron fiebre. En 14 (87,5%) pacientes hubo 16 episodios con documentación microbiológica, siendo el 87,5% de las infecciones con documentación microbiológica por microorganismos gramnegativos: *P. aeruginosa* 2 (12,5%), *E. cloacae* 3 (18,6%), *K. pneumoniae* 1 (6,3%), *Acinetobacter* spp 3 (18,6%), *H. influenzae* 2 (12,5%), *E. coli* 1 (6,3%), *Pantoea agglomerans* 1 (6,3 %) y *Citrobacter* spp 1 (6,3%), y el 12,5% infecciones por microorganismos grampositivos: 2 infecciones (12,5%) por *S. epidermidis* (Figura 7).

**Figura 7. Número de episodios de infección con documentación microbiológica durante el acondicionamiento**



### 5.1.3 PROFILAXIS ANTIINFECCIOSA

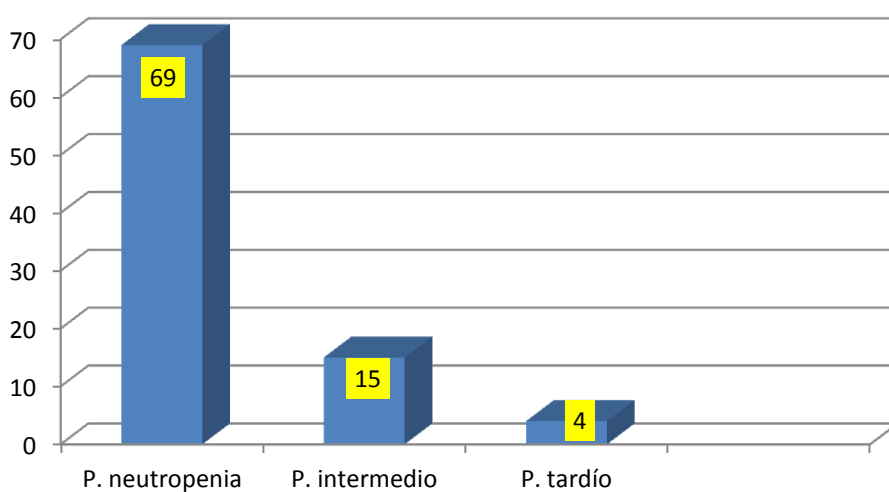
Durante el periodo de neutropenia, 69 (95,8%) pacientes recibieron profilaxis antivírica con aciclovir. Sesenta y seis (91,7%) recibieron profilaxis antifúngica (62 con fluconazol, uno con caspofungina y uno con voriconazol).

En el periodo intermedio hasta el día 100 post-trasplante: 15 (20,8%) pacientes recibieron profilaxis antiviral con aciclovir. Cinco (6,9%) recibieron profilaxis antifúngica con fluconazol y 2 (2,8%) con voriconazol. Dos pacientes (2,8%) recibieron profilaxis para *Pneumocystis jirovecii* con cotrimoxazol.

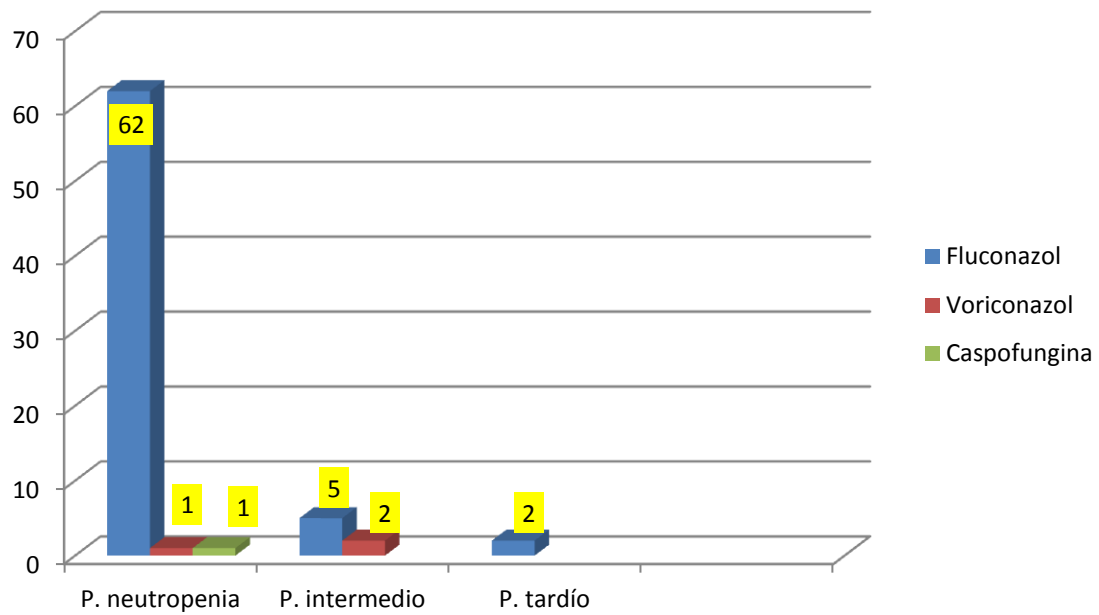
En el periodo tardío, a partir del día 100 y durante el seguimiento de 6 meses: 4 pacientes (5,6%) recibieron profilaxis antiviral con aciclovir. Dos (2,8%) profilaxis antifúngica con fluconazol (2,8%). Un paciente (1,4%) recibió profilaxis para *Pneumocystis jirovecii* con cotrimoxazol (Figuras 8 y 9).

No se administró profilaxis antibacteriana.

**Figura 8. Número de pacientes sometidos a TAPH que recibieron profilaxis antivírica con Aciclovir.**



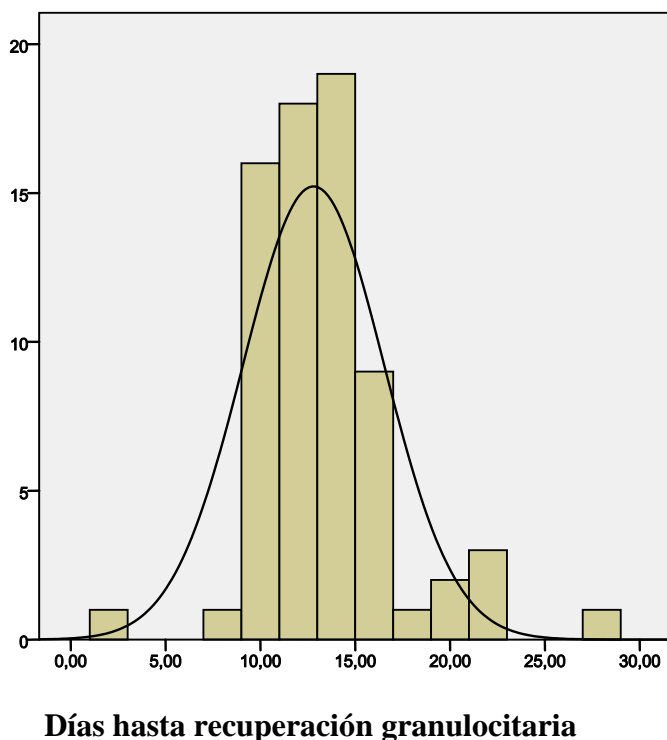
**Figura 9. Número de pacientes sometidos a TAPH que recibieron profilaxis antifúngica.**



#### **5.1.4 RECUPERACIÓN GRANULOCITARIA**

La media de la recuperación granulocitaria tras la infusión de los progenitores hematopoyéticos fue de 12,8 días (DE: 3,7), con un mínimo de 2 días y un máximo de 27 días (Figura 10).

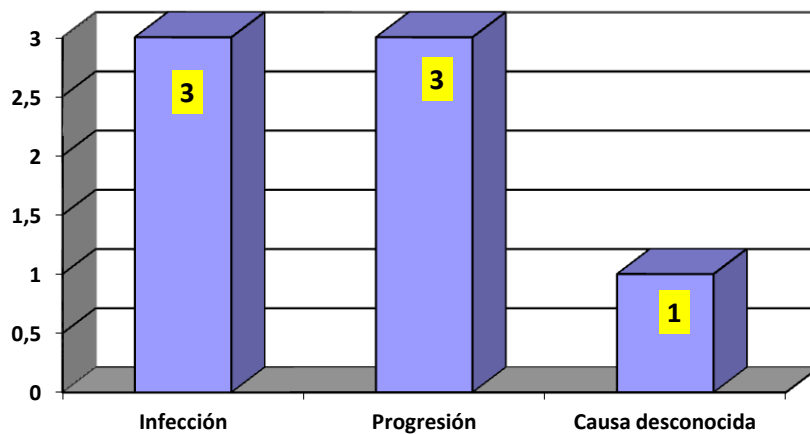
**Figura 10: Recuperación granulocitaria**



### 5.1.5 MORTALIDAD

De los 72 pacientes sometidos a TAPH, 7 (9,7%) fallecieron durante el seguimiento: 3 (4,2%) como consecuencia de una infección, 3 (4,2%) por progresión, y 1 (1,4%) por causa desconocida (Figura 11). Dentro de las muertes relacionadas con infección, 2 fueron como consecuencia de una infección por hongos (una por *Aspergillus* spp. y otra por un *Mucor*), y la tercera fue por una enterobacteria. Dentro de las muertes por progresión, en una se aisló una *Turicella otitidis* y en la otra no hubo documentación microbiológica, pero había clínica de infección respiratoria.

**Figura 11. Causas de mortalidad de 7 pacientes sometidos a TAPH**



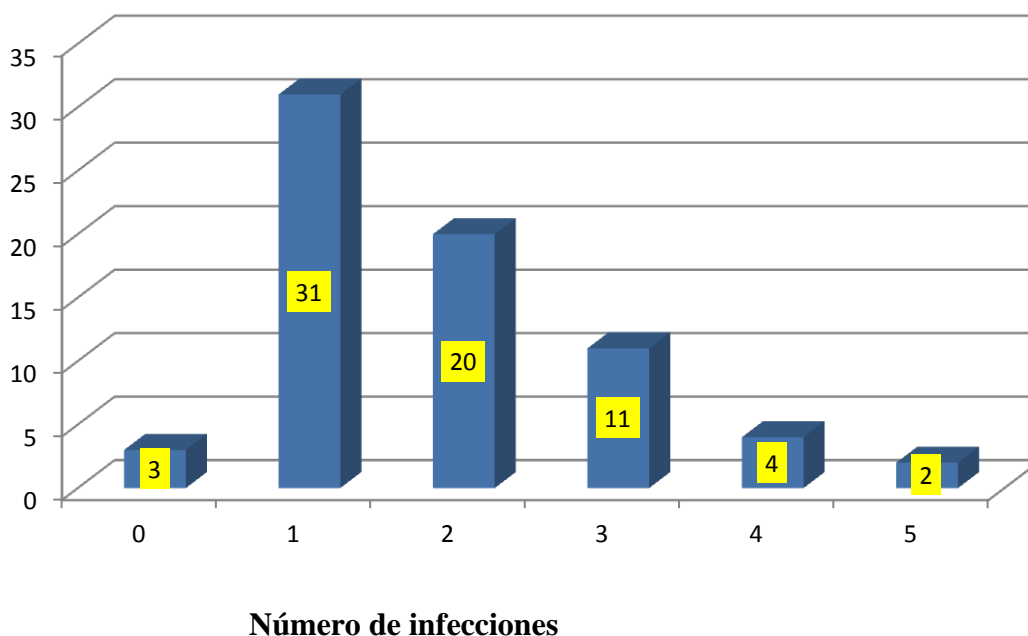


## 5.2 INFECCIONES

### 5.2.1. DESCRIPCIÓN GENERAL

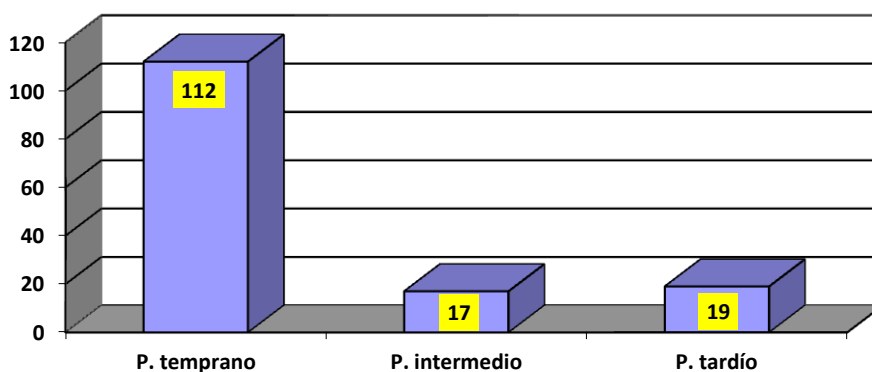
Se recogieron los episodios de infección ocurridos a partir del primer día tras el trasplante (+1) hasta el sexto mes. La media de episodios de infección por paciente fue de 2 (DE=1,3) con un mínimo de 0 y un máximo de 8 (un paciente). Tres pacientes no tuvieron ninguna infección durante el seguimiento. En total, se recogieron 138 episodios de infección en 69 pacientes: 31 pacientes (43,1%) tuvieron un episodio único, 20 (27,8%) 2 episodios, 11 (15,3%) 3 episodios, 4 (5,6%) 4 episodios, 2 (2,8%) 5 episodios y un paciente (1,4%) tuvo 8 episodios de infección. Tres pacientes (4,2%) no presentaron ninguna infección (Figura 12).

**Figura 12. Número de pacientes y episodios de infección a lo largo del TAPH**



Hubo 112 infecciones en el periodo temprano (día +1 a +30), 17 en el intermedio (día +31 a +100) y 19 en el tardío (día +101 hasta el final del estudio) (Figura 13).

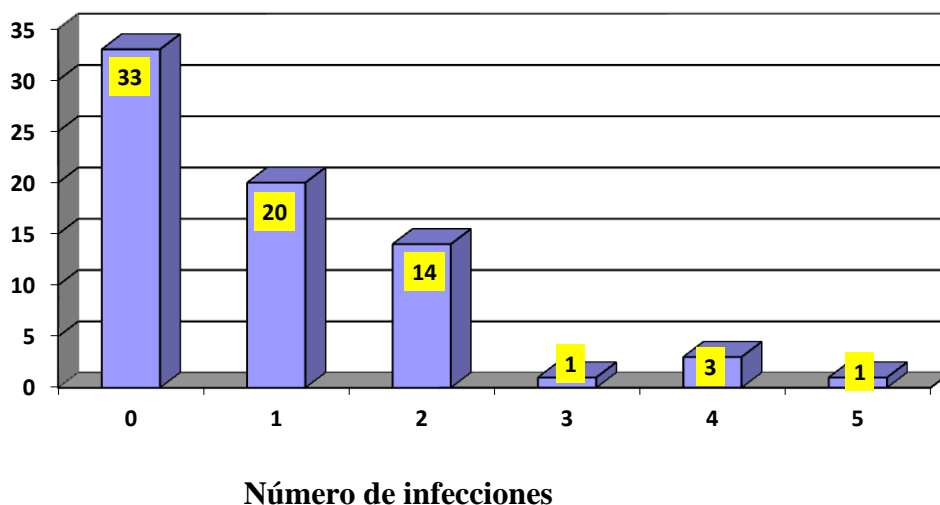
**Figura 13. Número de infecciones en 72 pacientes sometidos a TAPH en los diferentes periodos**



### 5.2.2 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Se recogieron 68 infecciones con confirmación microbiológica (50% de las infecciones), en 39 pacientes (54,2%). La media de episodios de infección con documentación microbiológica fue de 0,94, con un mínimo de 0 y un máximo de 5. Treinta y tres pacientes (45,8%) no tuvieron ninguna infección confirmada, 20 (27,8%) tuvieron una, 14 (19,4%) tuvieron 2, 1 (1,4%) tuvo 3, 3 (4,2%) tuvieron 4 y 1 (1,4%) tuvo 5. Ocho infecciones fueron polimicrobianas (Figura 14).

**Figura 14. Número de pacientes sometidos a TAPH que presentó infecciones con documentación microbiológica**



#### **5.2.2.1 Infecciones bacterianas**

Veintitrés pacientes (31,9%) presentaron durante el seguimiento post-trasplante infección por microorganismos grampositivos con un total de 33 episodios confirmados, 14 pacientes (19,4%) presentaron 1 episodio, 8 pacientes (11,1%) presentaron 2 y 1 paciente (1,4%) presentó 3 episodios. Veinticinco pacientes (34,7%) presentaron infección por microorganismos gramnegativos, con un total de 36 episodios confirmados: 15 pacientes (20,8%) presentaron 1 episodio, 9 (12,5%) presentaron 2 y 1 paciente (1,4%) presentó 3.

#### **5.2.2.2 Infecciones víricas**

Hubo 2 infecciones víricas, en 2 pacientes. Uno de ellos presentó una reactivación cutánea por virus varicela zóster y el otro presentó positividad para el antígeno de CMV en sangre.

### 5.2.2.3 Infecciones fúngicas

Hubo un total de 5 infecciones fúngicas en 5 pacientes: 3 de ellas fueron por *Candida* spp. (una detectada en un hemocultivo, otra en un exudado cutáneo y la tercera en un urocultivo), otra infección fúngica fue por un *Mucor* y la última por *Aspergillus* spp. Estos dos últimos pacientes fallecieron como consecuencia de la infección fúngica.

### 5.2.3 INFECCIONES SEGÚN EL PERIODO EVOLUTIVO

Se han agrupado las infecciones ocurridas en las 3 fases evolutivas propias del TAPH: periodo neutropénico, periodo intermedio, y periodo tardío. Describiremos para cada fase las infecciones bacterianas, víricas y fúngicas (Tabla 5).

**Tabla 5. Episodios de infección con documentación microbiológica**

Microorganismos	Periodo Neutropénico (0-30 días)		Periodo Intermedio (31-100 días)		Periodo Tardío (101-180 días)		Total	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
<b>Bacterias</b>	49	(92,5)	2	(66,7)	4	(66,6)	55	(88,7)
Grampositivas	22	(41,5)	0		2	(33,3)	24	(38,7)
Gramnegativas	27	(50,9)	2	(33,3)	2	(33,3)	31	(50)
<b>Virus</b>	1	(1,9)	0		1	(16,7)	2	(3,2)
CMV	1	(1,9)			0		1	(1,6)
Otros no CMV	0				1	(16,7)	1	(1,6)
<b>Hongos</b>	3	(5,6)	1	(33,3)	1	(16,7)	5	(8,1)
<i>Candida</i>	2	(3,8)	1	(33,3)	0		3	(4,8)
<i>Aspergillus</i>	1	(1,9)			0		1	(1,6)
<i>Mucor</i>					1	(16,7)	1	(1,6)
<b>Total</b>	53		3		6		62	

### 5.2.3.1 Periodo de neutropenia (0- 30 días)

Durante el periodo de neutropenia se recogieron un total de 109 episodios de infección con documentación microbiológica en 53: 22 (41,5%) por bacterias grampositivas, 27 (50,9%) por bacterias gramnegativas, 1 (1,9%) infección viral (CMV) y 3 (5,6%) infecciones fúngicas: 2 por *Candida* y una por *Aspergillus* (Tabla 5). La infección por *Aspergillus* la presentó un paciente en el periodo de neutropenia, que presentó clínica respiratoria, con aislamiento del germen en un lavado broncoalveolar. El paciente falleció como consecuencia de esta infección.

Presentaron infección asociada a catéter central 24 (22%) pacientes, secundaria a mucositis 20 (18%), vía urinaria 8 (7,3%), foco digestivo (diarrea y vómitos) 17 (15,6%), foco respiratorio 8 (7,3%) y en 28 (25,7%) no se objetivó focalidad (neutropenia febril). Cuarenta y cinco episodios (42,5%) de infección fueron clasificados como leves, 53 (50%) moderados, 4 (3,8%) graves, 4 (3,8%) pacientes presentaron shock séptico y 1 (0,9%) falleció (Tabla 6).

**Tabla 6. Focos de infección y gravedad de 72 pacientes sometidos a TAPH en el periodo de neutropenia**

	Número	%
<b>Focos de infección</b>		
Sin foco	28	(25,7)
Vía central	24	(22)
Vía urinaria	8	(7,3)
Gastrointestinal	17	(15,6)
Cutáneo	4	(3,7)
Respiratorio	8	(7,3)
Mucositis	20	(18)
<b>Gravedad</b>		
Leve	45	(42,50)
Moderada	53	(50)
Grave	4	(3,8)
Shock séptico	4	(3,8)
Exitus	1	(0,9)

### 5.2.3.2 Periodo intermedio (31-100 días)

Durante el periodo intermedio hubo un total de 17 episodios de infección con documentación microbiológica en 3 de ellos: 2 por bacterias gramnegativas y 1 por una infección fúngica por *Candida*.

Respecto a los focos de infección presentaron fiebre sin foco 2 (11,8%) pacientes, asociada a catéter central 2 (11,8%), vía urinaria 3 (17,7%), digestivo 1 (5,9%), respiratorio 7 (41,2%), cutáneo 1 (5,9%) y mucositis 1 (5,9%)

La gravedad de los episodios de infección fue: 11 (64,7%) leves, 4 (23,5%) moderados, 1 (5,9%) graves y un paciente (5,9%) falleció (Tabla 7).

**Tabla 7. Focos de infección y gravedad de 72 pacientes sometidos a TAPH en el periodo intermedio**

	Número	%
<b>Focos de infección</b>		
Sin foco	2	(11,8)
Vía central	2	(11,8)
Vía urinaria	3	(17,7)
Gastrointestinal	1	(5,9)
Cutáneo	1	(5,9)
Respiratorio	7	(41,2)
Mucositis	1	(5,9)
<b>Gravedad</b>		
Leve	11	(64,7)
Moderada	4	(23,5)
Grave	1	(5,9)
Shock séptico	0	
Exitus	1	(5,9)

### 5.2.3.3 Periodo tardío (101 días-6 meses)

Durante el periodo tardío hubo un total de 9 episodios de infección con documentación microbiológica en 6: 2 por bacterias grampositivas, 2 por bacterias gramnegativas, una infección viral por VVZ y una infección fúngica por *Mucor*. La infección por *Mucor* ocurrió en un paciente en el cuarto mes post-trasplante, aislándose el germen en un lavado broncoalveolar. El paciente falleció como consecuencia de esta infección.

Respecto a los focos de infección: presentó fiebre sin foco un paciente (11,1%), asociada a catéter central 2 (22,2%), vía urinaria 1 (11,1%), digestivo 1 (11,1%) cutáneo 1 (11,1%) y respiratorio 3 (33,3)

De los 9 episodios de infección se determinó la gravedad en 8: 4 (50%) fueron considerados leves, 1 (12,5%) moderado, 1 (12,5%) grave y 2 (25%) pacientes fallecieron (Tabla 8).

**Tabla 8. Focos de infección y gravedad de 72 pacientes sometidos a TAPH pacientes en el periodo tardío**

	Número	%
<b>Focos de infección</b>		
Sin foco	1	(11,1)
Vía central	2	(22,2)
Vía urinaria	1	(11,1)
Gastrointestinal	1	(11,1)
Cutáneo	1	(11,1)
Respiratorio	3	(33,3)
Mucositis	0	
<b>Gravedad</b>		
Leve	4	(50)
Moderada	1	(12,5)
Grave	1	(12,5)
Shock séptico	0	
Exitus	2	(25)



## 5.3 INMUNIDAD INNATA

### 5.3.1 GENOTIPO *MBL2* Y SU ASOCIACIÓN CON INFECCIONES

Los pacientes fueron divididos en dos grupos en función de los polimorfismos de *MBL2*: pacientes homocigotos (AA) para la forma salvaje de *MBL2* (n= 53) y otros pacientes, AO/OO (n=19), que incluía a pacientes heterocigotos (AO) (n=16), y homocigotos (OO) (n=3). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en género, edad, patología hematológica de base o actividad de la enfermedad en el momento del trasplante. Las características de los pacientes, enfermedad de base y número de líneas de tratamiento previas se muestran en las tablas 9, 10 y 11.

**Tabla 9. Características y genotipo del *MBL2* de 72 pacientes sometidos a TAPH**

	AA <i>Nº pacientes (%) n=53</i>	AO/OO <i>Nº pacientes (%) n=19</i>	Valor P *
<b>Sexo</b>			
<b>Hombres</b>	30 (56,6)	12 (63,2)	0,62
<b>Mujeres</b>	23 (43,4)	7 (36,8)	
<b>Edad media (DE), años</b>	51,6 (13,9)	50,2 (14,8)	0,70
<b>Enfermedad activa</b>			0,17
Si	11 (20,8)	7 (36,8)	
No	42 (79,2)	12 (63,2)	

*\*Test de Chi cuadrado/test exacto de Fisher en caso de variables cualitativas o test de t de student en caso de variables cuantitativas. Todos los tests son de dos colas.*

**Tabla 10. Enfermedad de base y genotipo del *MBL2* de 72 pacientes sometidos a TAPH**

	<b>AA</b> <i>Nº pacientes (%) n=53</i>	<b>AO/OO</b> <i>Nº pacientes (%) n=19</i>	<b>Valor P *</b>
<b>Enfermedad de base</b>			0,78
MM	14 (26,4)	6 (31,6)	
EH	8 (15,1)	5 (26,3)	
LNH	22 (41,5)	7 (36,8)	
NAM	7 (13,2)	1 (5,3)	
LP	1 (1,9)	0	
Amiloidosis	1 (1,9)	0	

*\*Test de Chi cuadrado/test exacto de Fisher en caso de variables cualitativas o test de t de student en caso de variables cuantitativas. Todos los tests son de dos colas.*

MM: Mieloma múltiple, EH: enfermedad de Hodgkin, LNH: linfoma no Hodgkin, NAM: Neoplasia aguda mieloide, LP: leucemia prolinfocítica

**Tabla 11. Número de líneas de tratamiento previas y genotipo del *MBL2* de 72 pacientes sometidos a TAPH**

	<b>AA</b> <i>Nº pacientes (%) n=53</i>	<b>AO/OO</b> <i>Nº pacientes (%) n=19</i>	<b>Valor P*</b>
<b>0</b>	1 (1.9)	0	0.18
<b>1</b>	14 (26.4)	5 (26.3)	
<b>2</b>	26 (49.1)	10 (52.6)	
<b>3</b>	12 (22.6)	2 (10.5)	
<b>4</b>	0	2 (10.5)	
<b>Media (DE)</b>	1.9 (0.8)	2.1 (0.9)	0.55

*\*Test de Fisher de dos colas*

Hubo una media de 1,74 (DE= 1,04) episodios de infección en el grupo de *MBL2* de tipo salvaje, mientras que en el grupo variante fue de 2,42 (DE= 1,84),  $p= 0,051$ , lo que no llegó a la significación estadística, aunque se vio una tendencia hacia un mayor número de infecciones en el grupo deficiente.

En la tabla 12, se muestran aspectos de las infecciones. Fue común la sepsis (43,1%), con distribución uniforme entre ambos grupos, así como la infección urinaria, que ocurrió con una frecuencia inferior a lo esperado (11,1%). También hubo baja frecuencia en la incidencia de neumonía (5,6% de todos los pacientes), con una tendencia a ocurrir más frecuentemente en el grupo variante, 10,5% vs. 3,8%, RR: 2,8 (0,4-18,4),  $p=0,27$ . La infección secundaria a catéter venoso central tuvo una incidencia similar en ambos grupos, 11,3% vs. 10,5%, RR: 0,9 (0,2-4,2),  $p= 0,92$ .

Hubo 15 episodios de infección grave, incluyendo sepsis, (ocho pacientes), neumonía (5 pacientes, uno de ellos tuvo una aspergilosis pulmonar y otro una neumonía por *Mucor*) y dos pacientes con episodios diarreicos graves (uno causado por *Clostridium difficile*). Se observó un aumento en la incidencia de infecciones graves en el grupo variante de *MBL2*, 26,3% vs. 11,3% (RR: 2,32 0,80-6,74,  $p = 0,1191$ ) aunque sin significación estadística.

**Tabla 12. Infecciones en 72 pacientes sometidos a TAPH durante 6 meses de seguimiento en función del genotipo del *MBL2*.**

	AA	AO/OO	RR (IC 95%)	Valor P*
	No. de pacientes (%) n=53	No. de pacientes (%) n=19		
<b>Tipos de infección</b>				
Neumonía	2 (3,8)	2 (10,5)	2,8(0,4-18,4)	0,27
Sepsis	22 (41,5)	9 (47,4)	1,1 (0,6-2,0)	0,66
CVC	6 (11,3)	2 (10,5)	0,9 (0,2-4,2)	0,92
ITU	5 (9,4)	3 (15,8)	1,7 (0,4-6,3)	0,45
<b>Infección grave</b>	6 (11,3)	5 (26,3)	2,32 (0,80-6,74)	0,12

\*Test de Chi cuadrado o test exacto de Fisher de dos colas según corresponda

RR: Riesgo relativo; IC: Intervalo de confianza.

CVC: Infección de catéter venoso central; ITU: Infección de tracto urinario.

No hubo diferencias significativas entre ambos grupos en la media de infecciones con documentación microbiológica, aunque hubo una tendencia hacia un mayor número de infecciones con confirmación microbiológica en el grupo variante de *MBL2*: 1,32 (DE 1,53) vs. 0,81 (sd 0,96) (p=0,1)

Hubo una media de 1,90 (DE= 1,2) episodios de infección documentada en el grupo variante de *MBL2* durante el periodo de neutropenia, mientras que en el grupo salvaje la media fue de 1,37 (DE 1,2), p=0,062. No hubo diferencias en la recuperación granulocitaria entre ambos grupos: 12,5 (DE: 3,3) días en el grupo salvaje y 13,5 (4,6) días en el grupo variante (p= 0,3).

La media en días hasta la primera infección tras la infusión fue de 7,98 días (DE= 11,34) en el grupo salvaje de *MBL2*, y de 13 días en el grupo variante (DE= 30,73) (p= 0,32).

En función del tipo de infección, hubo más pacientes con una infección causada por bacterias grampositivas en el grupo variante de *MBL2*, 47,4% vs. 26,4%, RR: 1,8 (Intervalo de confianza –IC- 95%: 0,9-3,4),  $p= 0,09$ . Del mismo modo, hubo más infecciones por grampositivos en este grupo (13 infecciones en 19 pacientes en el grupo variante de *MBL2* vs. 20 infecciones en 53 pacientes en el grupo salvaje de *MBL2*,  $p= 0,13$ ). Hubo una mayor incidencia de infecciones causadas por *Staphylococcus epidermidis* en el grupo variante de *MBL2*, 36,8% vs. 17%, RR: 2,2 (IC 95%: 0,9-5,0),  $p= 0,07$ . Sólo hubo una infección por *Staphylococcus aureus*, en el grupo salvaje de *MBL2*.

La mayoría de las infecciones causadas por bacterias grampositivas tuvieron lugar en el periodo temprano, con una mayor frecuencia en el grupo variante de *MBL2* (42,1% vs. 26,4% en el grupo de *MBL2* salvaje,  $p= 0,2$ ). En el periodo intermedio no hubo ninguna infección, y sólo una en cada grupo en el periodo tardío, que no fue estadísticamente significativa.

Observamos una mayor incidencia de infecciones fúngicas en el grupo de *MBL2* variante, 21,1% vs. 1,9%, RR: 11,5 (IC 95%: 1,3-93,7),  $p=0,0048$ , que también se comprobó en el análisis multivariante, OR: 214,6 (1,7-27239,  $p=0,03$ ). Se observó un mayor número de infecciones causadas por *Aspergillus* spp. en este grupo, aunque sin significación estadística (ninguna infección en el grupo salvaje de *MBL2* vs. 5,3% en el grupo variante,  $p=0,09$ ).

No hubo diferencias en la incidencia de infecciones causadas por bacterias gramnegativas, 35,8% en el grupo variante de *MBL2* vs. 31,6% en el grupo salvaje, RR: 0,9 (IC 95%: 0,4-1,9)  $p= 0,74$ , ni en la incidencia de infecciones víricas, 5,3% vs. 1,9%,

RR: 2,8 (IC 95%: 0,2-42,4) p= 0,44, aunque si hubo una mayor incidencia de las mismas en el grupo variante en este aspecto (Tablas 13 y 14).

**Tabla 13. Documentación microbiológica en 72 pacientes sometidos a TAPH durante 6 meses de seguimiento en función del genotipo del MBL2.**

	<b>AA</b>	<b>AO/OO</b>	<b>RR (IC 95%)</b>	<b>Valor P*</b>
	<i>No. de pacientes</i> (%) n=53	<i>No. de pacientes (%)</i> n=19		
<b><i>Infecciones por Grampositivos</i></b>				
<i>S. epidermidis</i>	14 (26,4)	9 (47,4)	1,8 (0,9-3,4)	0,09
<i>S. aureus</i>	9 (17)	7 (36,8)	2,2 (0,9-5,0)	0,07
	1 (1,9)	0		0,055
<b><i>Infecciones por Gramnegativos</i></b>				
<i>Infecciones víricas</i>	19 (35,8)	6 (31,6)	0,9 (0,4-1,9)	0,74
<i>Infecciones víricas</i>	1 (1,9)	1 (5,3)	2,8 (0,2-42,4)	0,44
CMV	0 (0)	1 (5,3)	-	0,26
<b><i>Infecciones fúngicas</i></b>				
<i>Aspergillus</i>	1 (1,9)	4 (21,1)	11,5 (1,3-93,7)	<b>0,0048</b>
	0	1 (5,3)	--	0,09

\*Test de Chi cuadrado o test exacto de Fisher de dos colas según corresponda

RR: Riesgo relativo; IC: Intervalo de confianza.

**Tabla 14. Asociación entre genotipos *MBL2* e infecciones en 72 pacientes sometidos a TAPH: análisis multivariante**

<b>Variable Resultado (pacientes con infección)</b>	<b>OR* (IC 95%)</b> (Efecto de los genotipos <i>MBL2</i> en el riesgo de infección)	<b>Valor P</b>
<b><i>Tipos de infección</i></b>		
-Neumonía	8.1 (0.4-158.2)	0.17
-Sepsis	0.9 (0.3-3.1)	0.88
-CVC	0.8 (0.1-5.0)	0.77
-ITU	2.3 (0.4-12.8)	0.44
<b><i>Infección grave</i></b>	0.8 (0.1-4.9)	0.79
<b><i>Infecciones por grampositivos</i></b>	2.5 (0.8-7.5)	0.11
- <i>S. epidermidis</i>	4.0 (1.0-16.5)	0.05
<b><i>Infecciones por gramnegativos</i></b>	0.7 (0.2-2.4)	0.59
<b><i>Infecciones víricas</i></b>	1.1 (0.01-60.4)	0.96
<b><i>Infecciones fúngicas</i></b>	12.9 (1.1-153.9)	0.03

\*OR (Odds ratio): ajustada por: sexo, edad, enfermedad activa, tipo de enfermedad hematológica. IC: Intervalo de confianza.

CVC: infección de catéter venoso central; ITU: infección de tracto urinario.

### 5.3.2 GENOTIPO *MBL2* Y SU ASOCIACIÓN CON LA TASA DE MORTALIDAD

Hubo más muertes en el grupo variante de *MBL2* que en el grupo salvaje (15,8% vs. 7,5%,  $p= 0,37$ ). Todas las muertes en el grupo variante de *MBL2* estuvieron relacionadas con algún proceso infeccioso, mientras que en el grupo salvaje de *MBL2* las muertes fueron debidas a otras causas ( $p= 0,05$ ) (Tabla 15).

**Tabla 15. Causas de muerte en 72 pacientes sometidos a TAPH en función del genotipo de *MBL2*.**

	<b>AA</b>	<b>AO/OO</b>	<b>RR (IC 95%)</b>	<b>Valor P*</b>
	<i>No. de pacientes (%)</i>	<i>No. de pacientes (%)</i>		
	<i>n=53</i>	<i>n=19</i>		
<b>Nº muertes</b>	4 (7,5)	3 (15,8)	2,1 (0,5-8,5)	0,37
<b>Etiología</b>				
Infecciosa	0	3	--	0,05
Progresión	3	0	--	
Desconocida	1	0	--	

\*Test exacto de Fisher de dos colas

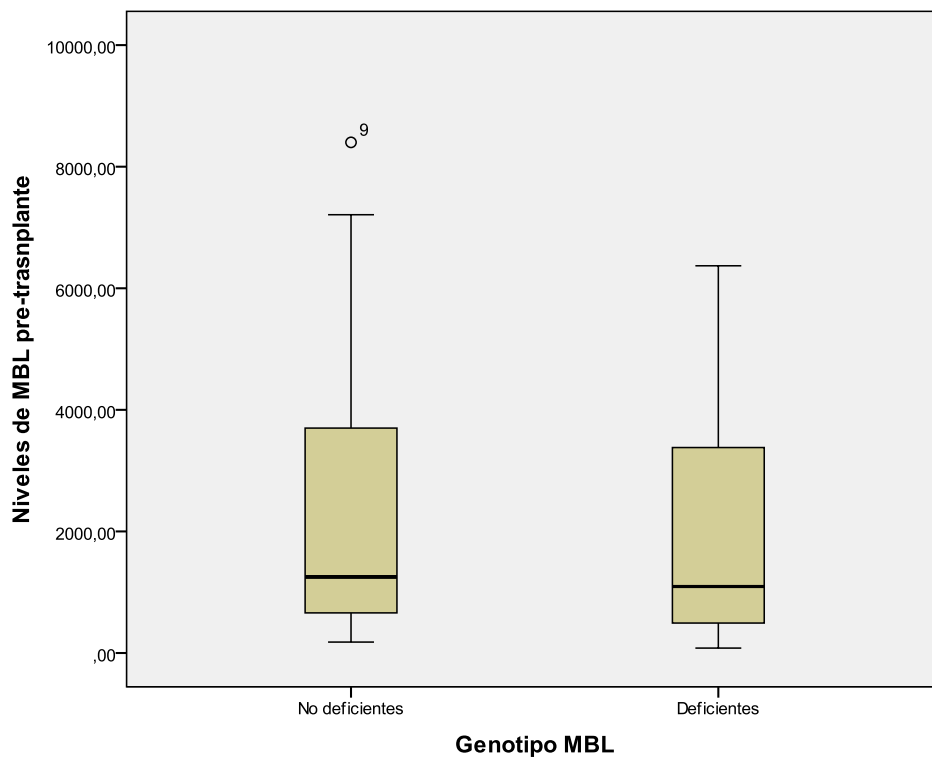
RR: Riesgo relativo; IC: Intervalo de confianza.

### 5.3.3 NIVELES DE MBL Y SU ASOCIACIÓN CON GENOTIPOS

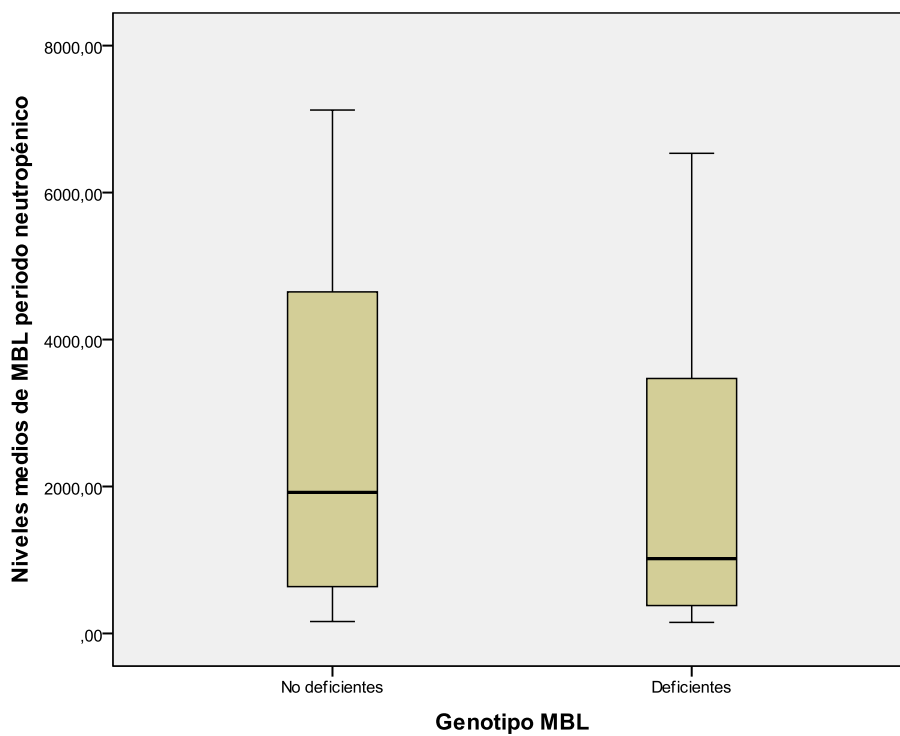
En las figuras 15 a 18 se muestra la correlación existente entre los niveles de MBL y el genotipo de *MBL2* en los diferentes periodos del TAPH. No hemos hallado una asociación entre el genotipo mutado de *MBL2* y niveles bajos de MBL en estos pacientes.



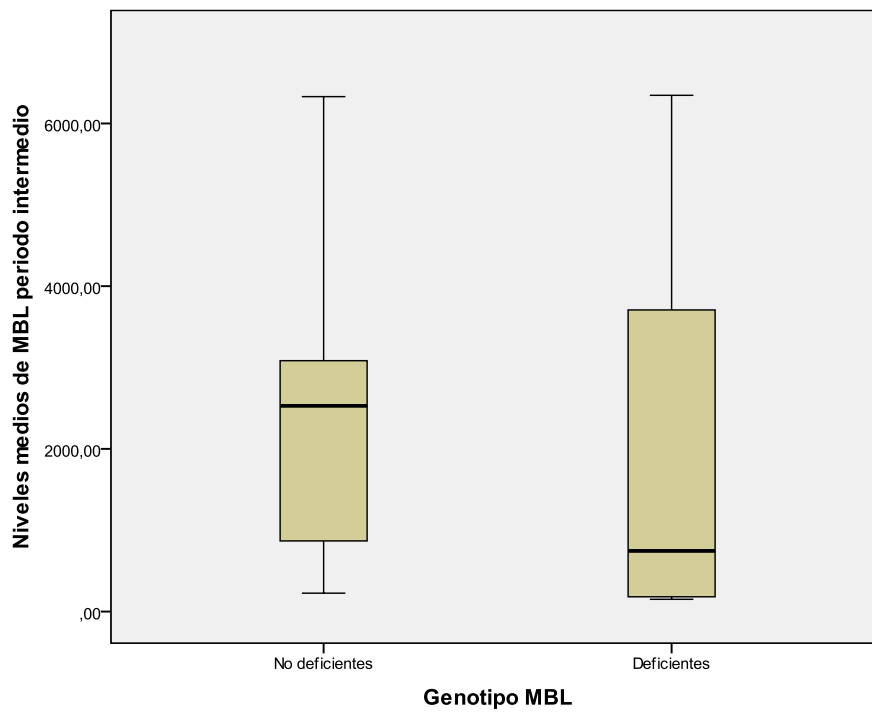
**Figura 15. Niveles de MBL (ng/ml) pre-trasplante según el genotipo *MBL2***



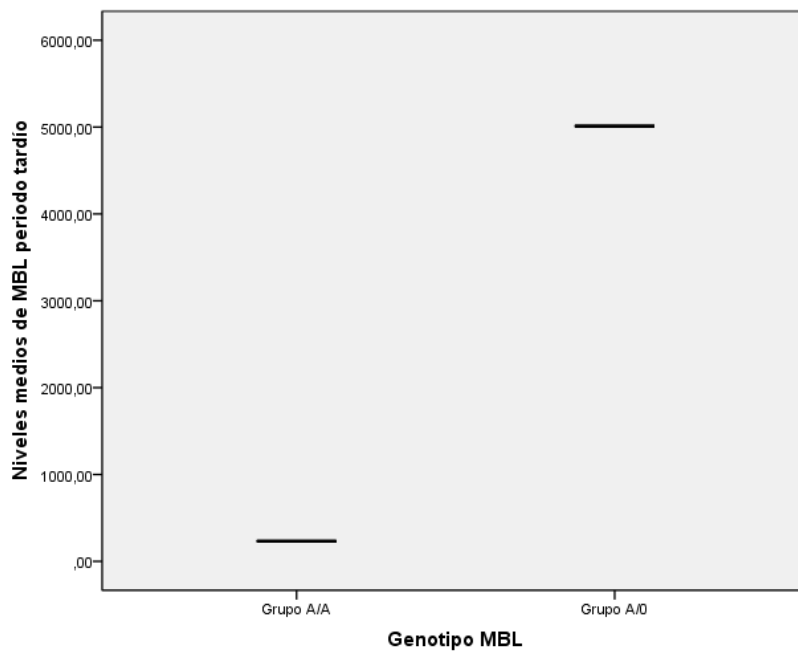
**Figura 16. Niveles medios de MBL (ng/ml) en el periodo neutropénico según el genotipo *MBL2***



**Figura 17. Niveles medios de MBL (ng/ml) en el periodo intermedio según el genotipo *MBL2***



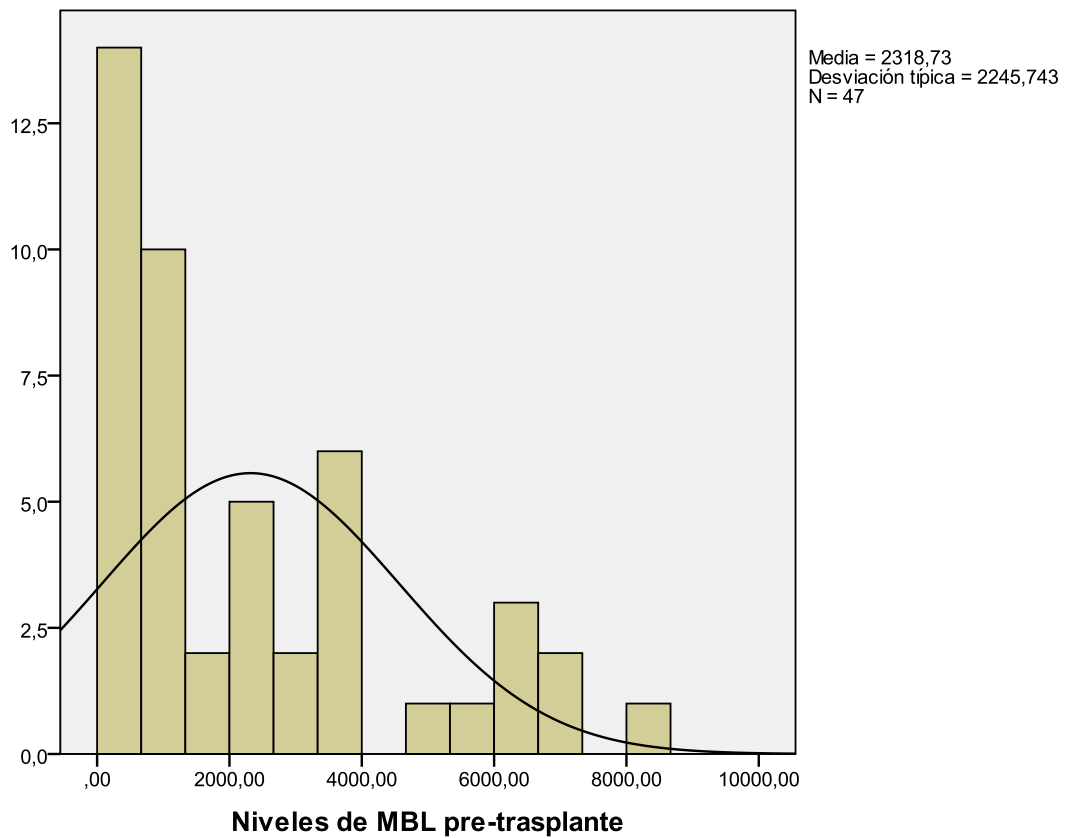
**Figura 18. Niveles medios de MBL (ng/ml) en el periodo tardío según el genotipo *MBL2***



### 5.3.3.1 Niveles medios de MBL pretrasplante

De los 72 pacientes incluidos en el estudio se determinaron niveles de MBL en 47. La media de los niveles de MBL pretrasplante fue de 2318,7 ng/ml (DE: 2245,7) (Figura 19).

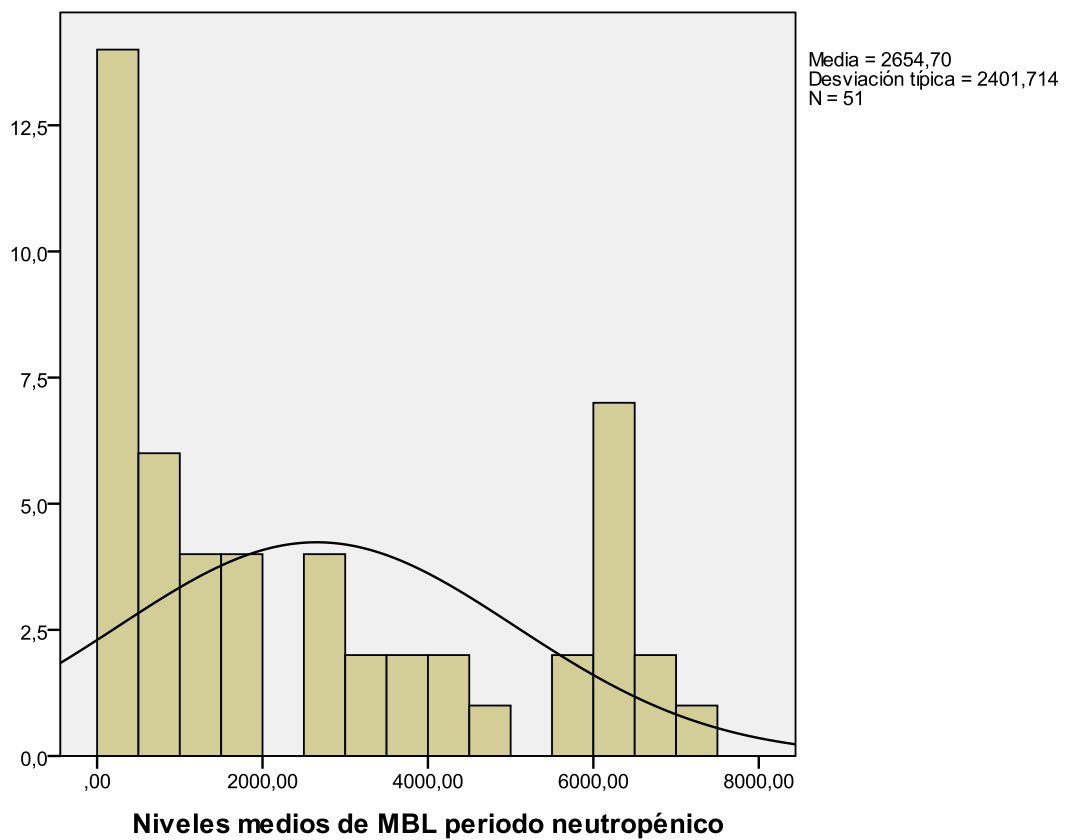
**Figura 19. Niveles de MBL pretrasplante**



### 5.3.3.2 Niveles medios de MBL en el periodo de neutropenia

Durante el periodo de neutropenia se obtuvieron niveles de MBL en 51 pacientes. Los niveles medios de MBL fueron de 2654,7 ng/ml (DE: 2401,7) (Figura 20).

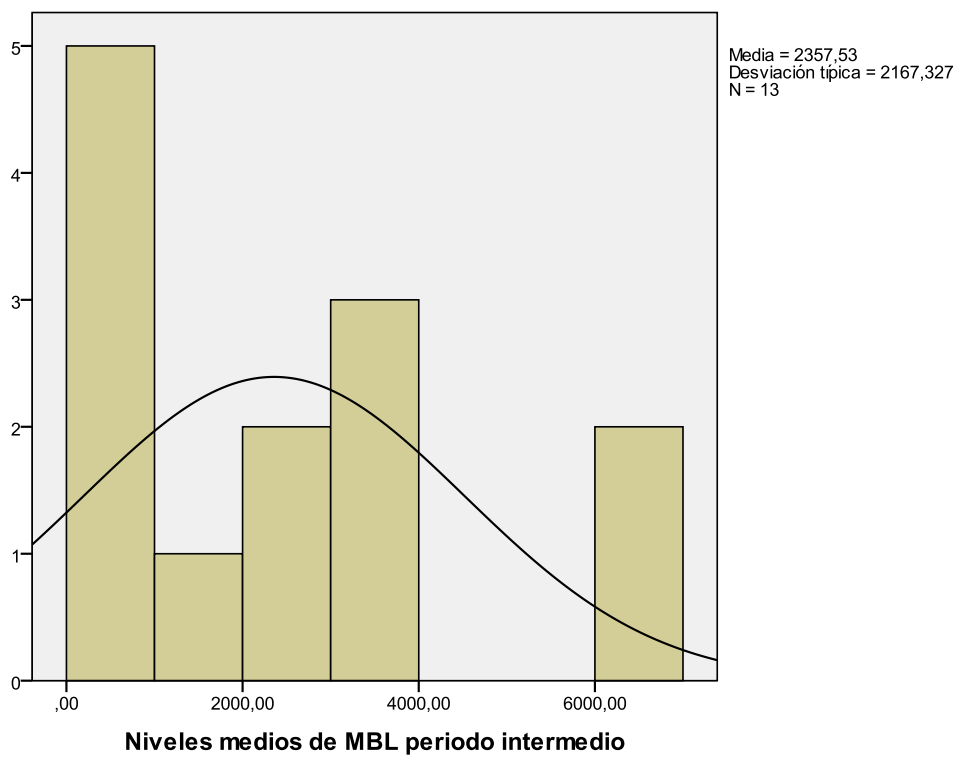
**Figura 20. Niveles medios de MBL en el periodo de neutropenia.**



### 5.3.3.3 Niveles medios de MBL en el periodo intermedio

Durante el periodo intermedio se obtuvieron niveles de MBL en 13 pacientes. Los niveles medios de MBL fueron de 2.357,5 ng/ml (DE: 2167,3) (Figura 21).

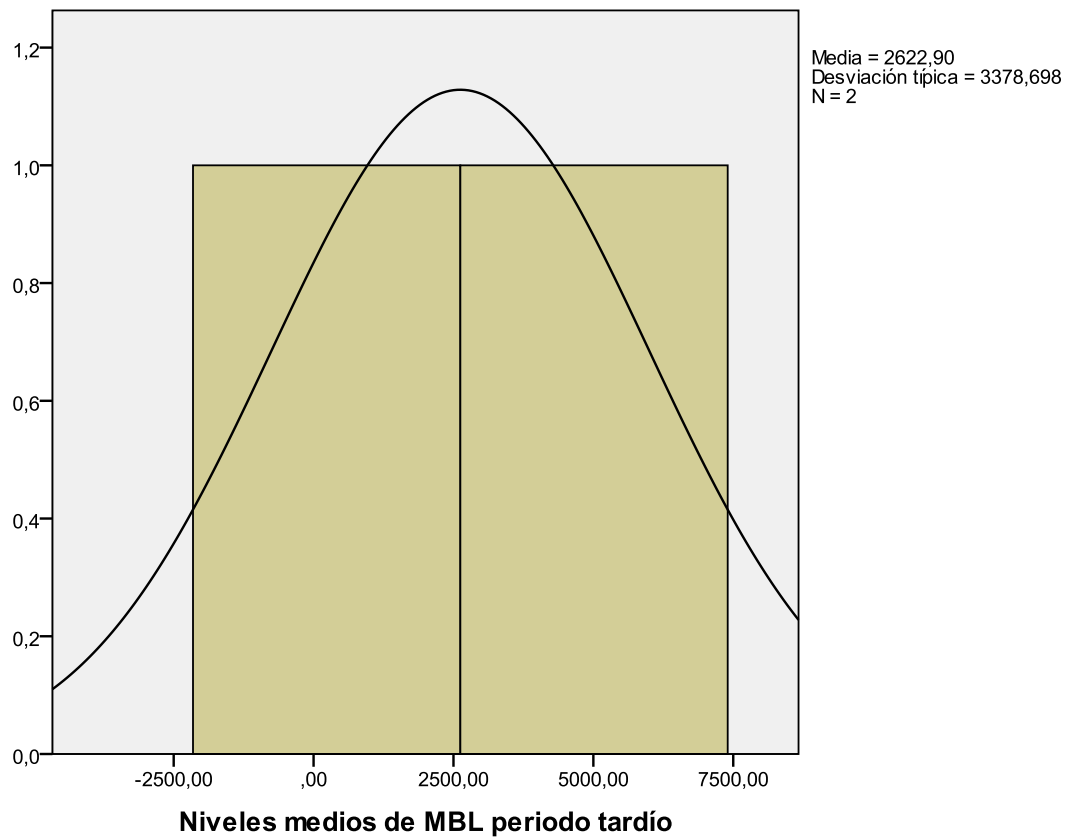
**Figura 21. Niveles de MBL en el periodo intermedio.**



### 5.3.3.4 Niveles medios de MBL en el periodo tardío

Durante el periodo intermedio se obtuvieron niveles de MBL en 2 pacientes. Los niveles medios de MBL fueron de 2622,9 ng/ml (DE: 3378,7) (Figura 22).

**Figura 22. Niveles medios de MBL en el periodo tardío**



### 5.3.4 NIVELES MEDIOS DE MBL E INFECCIONES POST-TRASPLANTE

A la hora de valorar la asociación entre los niveles de MBL y las infecciones ocurridas tras la realización del TAPH, elegimos escoger los niveles de MBL medios medidos en el periodo pretrasplante.

Los pacientes se dividieron en función de los niveles de MBL; para ello hicimos dos puntos de corte para estudiar la relación entre los niveles de MBL y las infecciones, en 1.000ng/ml (niveles de MBL  $\leq$  1.000 ng/ml y  $>$ 1.000 ng/ml) y en 500 ng/ml ( $\leq$ 500 ng/ml y  $>$  500 ng/ml). No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos grupos en sexo, edad, enfermedad hematológica, actividad de la enfermedad en el momento del trasplante o número de líneas previas (Tablas 16,17 y 18).

**Tabla 16. Características y niveles de MBL de 72 pacientes sometidos a TAPH**

	<b>MBL &gt;1.000</b> N (%) n=29	<b>MBL <math>\leq</math>1.000</b> N (%) n=18	<b>Valor</b> <i>P</i> *	<b>MBL &gt;500</b> N (%) n=37	<b>MBL <math>\leq</math>500</b> N (%) n=10	<b>Valor</b> <i>P</i> *
<b>Sexo</b>						
Varón	16 (55,2)	13 (44,8)	0,36	20 (54,1)	9 (90)	0,07
Mujer	13 (44,8)	5 (27,8)		17 (45,9)	1 (10)	
<b>Edad media</b> <b>años (DE)</b>	51,1 (15,1)	55,7 (14,3)	0,31	53,1 (14)	51,7 (14,3)	0,79
<b>Enfermedad</b> <b>activa</b>			1			0,72
SI	10 (34,5)	6 (33,3)		12 (32,4)	4 (40)	
NO	19 (65,5)	12 (66,7)		25 (67,6)	6 (60)	

\**Test de Chi cuadrado/test exacto de Fisher en caso de variables cualitativas o test de t de student en caso de variables cuantitativas. Todos los tests son de dos colas.*

**Tabla 17. Enfermedad de base y niveles de MBL de 72 pacientes sometidos a TAPH**

	MBL >1.000	MBL ≤1.000	P*	MBL >500	MBL ≤500	P*
	N (%) n=29	N (%) n=18		N (%) n=37	N (%) n=10	
<b>Enfermedad de base</b>						
MM	7 (24,1)	5 (27,8)	0,5	10 (27)	2 (20)	0,21
EH	4 (13,8)	5 (27,8)		6 (16,2)	3 (30)	
LNH	11 (37,9)	5 (27,8)		12 (32,4)	4 (40)	
NMA	6 (20,7)	2 (11,1)		8 (21,6)	0	
LP	1 (3,4)	0		1 (2,7)	0	
Amiloidosis	0	1 (5,6)		0	1 (10)	

\*Test de Chi cuadrado/test exacto de Fisher en caso de variables cualitativas o test de t de student en caso de variables cuantitativas. Todos los tests son de dos colas.

MM: Mieloma multiple, EH: enfermedad de Hodgkin, LNH: linfoma no Hodgkin, NAM: Neoplasia aguda mieloide, LP: leucemia prolinfocítica

**Tabla 18. Número de líneas de tratamiento previas de 72 pacientes sometidos a TAPH**

	MBL >1.000	MBL ≤1.000	P*	MBL >500	MBL ≤500	P*
	N (%) n=29	N (%) n=18		N (%) n=37	N (%) n=10	
<b>0</b>	0	1 (5,6%)	0,67	0	1 (10)	0,23
<b>1</b>	8 (27,6)	4 (22,2)		11 (29,7)	1 (10)	
<b>2</b>	14 (48,3)	9 (50)		18 (48,6)	5 (50)	
<b>3</b>	6 (20,7)	4 (22,2)		7 (18,9)	3 (30)	
<b>4</b>	1 (3,4)	0		1 (2,7)	0	

\*Test de Fisher de dos colas para variables cualitativas

Se analizaron las infecciones ocurridas a lo largo del trasplante en sus diferentes fases (periodo de neutropenia, intermedio y tardío), y en cada grupo se estudió la asociación entre los niveles de MBL y las diferentes localizaciones de las infecciones (bacteriemia, neumonía, infección de tracto urinario o infección asociada a catéter). En las tres fases del trasplante, tanto con el punto de corte en 1.000 ng/ml como con el punto de corte en



500 ng/ml, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de infecciones en función de la localización de las infecciones ni en la gravedad de las mismas (Tabla 19).

**Tabla 19. Tipos de infección en 47 pacientes sometidos a TAPH durante 6 meses de seguimiento en función de los niveles de MBL.**

	<b>MBL &gt;1.000</b>	<b>MBL ≤1.000</b>		<b>MBL &gt;500</b>	<b>MBL ≤500</b>	
	<b>N (%) n=29</b>	<b>N (%) n=18</b>	<b>p</b>	<b>N (%) n=37</b>	<b>N (%) n=10</b>	<b>p</b>
<b>Tipos de infecciones</b>						
Neumonía	2 (6,9)	2 (11,1)	0,63	3 (8,1)	1 (10)	1
Sepsis	14 (48,3)	7 (38,9)	0,56	16 (43,2)	5 (50)	0,73
CVC	3 (10,3)	1 (5,6)	1	3 (8,1)	1 (10)	1
ITU	6 (20,7)	1 (5,6)	0,23	7 (18,9)	0	0,32
<b>Infección grave</b>	<b>5 (17,2)</b>	<b>3 (16,7)</b>	<b>1</b>	<b>5 (13,5)</b>	<b>3 (30)</b>	<b>0,34</b>

CVC: catéter venoso central; ITU: Infección de tracto urinario.

Asimismo, se estudió a lo largo de las tres fases la asociación entre los niveles de MBL agrupados según los puntos de corte anteriormente mencionados, y la documentación microbiológica de las infecciones, sin detectarse diferencias significativas en ninguno de los grupos analizados (Tabla 20).

**Tabla 20. Tipos de infección en 47 pacientes con TAPH durante 6 meses de seguimiento en función de los niveles de MBL.**

	MBL >1.000	MBL ≤1.000		MBL >500	MBL ≤500	
	N (%) n=29	N (%) n=18	<i>p</i>	N (%) n=37	N (%) n=10	<i>p</i>
<b>Infecciones por grampositivos</b>						
<i>S. epidermidis</i>	6 (20,7)	2 (11,1)	0,69	7 (18,9)	1 (10)	0,67
<i>S. aureus</i>	1 (3,4)	0	1	1 (2,7)	0	1
<b>Infecciones por gramnegativos</b>						
<b>Infecciones víricas</b>						
CMV	1 (3,4)	0	1	1 (2,7)	0	1
<b>Infecciones fúngicas</b>						
<i>Aspergillus</i>	0	1 (5,6)	0,38	0	1 (10)	0,21

CMV: citomegalovirus

### 5.3.5 MORTALIDAD EN ASOCIACIÓN A NIVELES DE MBL

No se encontraron diferencias en la mortalidad en función de los niveles de MBL, segmentado según los puntos de corte utilizados previamente (1.000 ng/ml y 500 ng/ml) (Tabla 21).

**Tabla 21. Mortalidad en 72 pacientes sometidos a TAPH durante 6 meses de seguimiento en función de los niveles de MBL.**

	MBL >1.000	MBL ≤1.000		MBL >500	MBL ≤500	
	N (%) n=29	N (%) n=18	<i>p</i>	N (%) n=37	N (%) n=10	<i>p</i>
<b>Muertes</b>	4 (13,8)	2 (11,1)	1	4 (10,8)	2 (20)	0,6

## 5.4 TLR

Se determinó el genotipo TLR2 y TLR4 de todos los pacientes, con la siguiente frecuencia para TLR4: 62 (86,1%) pacientes eran genotipo salvaje Asp299, Thr399; 9 (12,5%) la variante genética Asp299Gly, Thr399Ile y 1 (1,4%) la otra variante Asp299Gly, Thr399. Para los TLR2: 70 (97,2%) eran Arg677/Arg753 y 2 (2,8%) la variante genética Arg677TrpM ,Arg753 (Tabla 22).

**Tabla 22. Genotipo TLR de 72 pacientes sometidos a TAPH**

<b>TLR</b>		<b>N=72</b>	<b>(%)</b>
<b>TLR4</b>	Asp299,Thr399	62	(86,1)
	Asp299Gly,Thr399	9	(12,5)
	Asp299Gly,Thr399Ile	1	(1,4)
<b>TLR2</b>	Arg677,Arg753	70	(97,2)
	Arg677Trp,Arg753	2	(2,8)

No hubo relación estadísticamente significativa entre las distintas variantes genéticas de TLR2 y TLR4 con el número total de episodios de infección, documentación microbiológica de las infecciones, tipos de infecciones bacterianas, víricas o fúngicas, localización de las infecciones (sepsis, infección de catéter, infección de tracto urinario o neumonía), ni con la tasa de mortalidad.



## 6. DISCUSIÓN

---



En este estudio prospectivo de pacientes tratados con un TAPH se ha realizado un análisis de la incidencia de infección y mortalidad en función de dos componentes del sistema inmune innato. De forma más extensa se han estudiado los polimorfismos del gen *MBL2*, comparando a los pacientes portadores del genotipo *MBL2* de tipo salvaje con los que presentaron el genotipo variante de *MBL2*. Este genotipo variante se ha asociado con la producción de niveles más bajos de MBL, que podría conducir a un número mayor de infecciones/ infecciones más graves. También se han analizado las posibles diferencias existentes en cuanto al número, gravedad y evolución de las infecciones en los pacientes sometidos a TAPH en función de los niveles de MBL previos al mismo. Por último, se ha estudiado qué influencia tiene el sistema de TLRs, en concreto los TLR4 y TLR2, en estos pacientes, con los mismos objetivos de estudio de las infecciones.

A continuación se mostrarán las limitaciones del estudio.

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y CONTROL DE SESGOS

Los estudios de cohortes son, de los diseños epidemiológicos básicos, los más importantes, siendo uno de los más utilizados en la investigación biomédica. Sin embargo, en este tipo de diseños se pueden producir una serie de sesgos que afecten a la validez de los resultados.

La posibilidad de que exista un sesgo de confusión ha de ser interpretada en cada una de las asociaciones que se han estudiado. La confusión se encuentra a nivel de la población base y se produce por las relaciones que mantienen las distintas variables entre sí y con la exposición. En la valoración de la influencia de la presencia de polimorfismos genéticos y los niveles de MBL en la incidencia y gravedad de las infecciones en los pacientes trasplantados será aquel que sea factor de riesgo de infección en estos pacientes y a su vez se relacione con la probabilidad de presentar polimorfismos, sin que sea variable intermediaria en la relación polimorfismos genéticos-infección. Por ello, se controlaron como posibles factores de confusión variables como la edad, sexo, tipo de enfermedad hematológica de base y actividad de la enfermedad versus remisión mediante análisis estratificado y multivariable.

Con respecto al sesgo de selección, éste surge cuando la exposición (presencia de polimorfismos genéticos y niveles bajos de MBL) condiciona diferencialmente la probabilidad de selección de los grupos que se comparan. Con respecto a la selección de la población de estudio, se incluyeron todos los pacientes sometidos a TAPH que aceptaron participar en el estudio y durante la selección no se conoció si los pacientes eran o no portadores de polimorfismos ni los niveles de MBL. Con respecto al sesgo de



selección por baja tasa de respuesta, generalmente la tasa de participación en los estudios hospitalarios es alta y mayor que en los estudios comunitarios dada la mayor relación de dependencia de los pacientes con el personal sanitario. En nuestro trabajo todos los pacientes participaron en el estudio, ninguno rechazó la propuesta.

El sesgo de selección por problemas en la recogida de información se puede producir si el número de pacientes perdidos durante el seguimiento es elevado y la razón de abandono está relacionada con la exposición y con el riesgo de infección. Las pérdidas de sujetos durante el seguimiento son menores en los estudios hospitalarios y en este estudio fueron pacientes trasplantados con seguimiento en el hospital y el periodo de seguimiento fue corto (6 meses). Para garantizar que el número de pérdidas fuese el menor posible se recogió información que permitió su localización (dirección y teléfono). Así mismo, para evitar pérdidas selectivas de información que también puedan producir este sesgo, toda la información se recogió de forma prospectiva. También se realizó un registro de todas las pérdidas y se recogió la máxima información de base posible sobre ellas.

No obstante, a pesar de todo no se pudieron obtener los niveles de MBL pre-trasplante en 25 pacientes (34,7 %). Se analizó si estos 25 pacientes presentaban mayor gravedad que el resto de la población de estudio. No se encontraron diferencias en cuanto al número de infecciones (media de 2 infecciones en los pacientes en los que sí se obtuvo el valor de MBL pre-trasplante frente a 1,76 en los pacientes sin niveles,  $p=0,47$ ). Tampoco se observaron diferencias en la gravedad de las infecciones ni en la tasa de mortalidad entre ambos grupos.

El tercero de los errores es el sesgo de información. De las tres fuentes básicas de sesgo de información, el que más podría afectar a los resultados es el sesgo de mala clasificación. Con respecto a la información sobre la exposición (existencia de polimorfismos genéticos, niveles bajos de MBL), todas las determinaciones se hicieron según técnicas estándares, las mismas en todos los pacientes y por las mismas personas entrenadas para tal fin.

El análisis de muestras se realizó enmascarado sobre la presencia o no de infecciones. A su vez, la medición del efecto (presencia de infección), se hizo por médicos especialistas en enfermedades infecciosas y usando los mismos criterios para su diagnóstico (según las normas clínicas de la IDSA). Los médicos responsables del seguimiento y diagnóstico de infecciones estuvieron enmascarados con respecto a la presencia de polimorfismos genéticos y/o niveles bajos de MBL. Por lo tanto, si existiese un error en la medición de la exposición o en la valoración del efecto, sería por igual en todos los pacientes, con lo que se produciría un sesgo de mala clasificación no diferencial que habitualmente tendería a infraestimar la asociación entre la exposición y el efecto, lo que significa que si se encuentra una asociación a pesar de la mala clasificación no diferencial se puede estar seguro que la asociación real es aún más fuerte.

El sesgo de regresión a la media podría haber estado presente al realizar las mediciones de MBL basales, pero esto afectaría por igual a toda la cohorte de pacientes: expuestos y no expuestos, con lo que todos los pacientes habrían estado sometidos al mismo fenómeno de regresión a la media, controlándose así el posible efecto de este sesgo.

## **POLIMORFISMOS DE *MBL2***

El grupo de estudio fue homogéneo, sin diferencias en edad, sexo, enfermedad hematológica de base o actividad de la enfermedad en el momento del trasplante.

Hasta el momento, hay pocos estudios que analicen la incidencia de infecciones en los TAPH en función de los polimorfismos del gen *MBL2*. Horiuchi y col. (83) realizaron un estudio comparativo de la incidencia de infecciones bacterianas graves entre los pacientes con genotipos con baja producción de MBL y el genotipo salvaje de *MBL2* en pacientes sometidos a un TAPH, encontrando una asociación entre los genotipos de baja producción con un riesgo significativamente aumentado de infecciones bacterianas graves en una serie de 113 pacientes tratados con dosis altas de quimioterapia y un TAPH, la mayoría de ellos con enfermedades hematológicas similares a las nuestras. En su estudio hubo una menor incidencia de infecciones bacterianas graves (9%) que en el nuestro (18%). Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que en todos sus pacientes se utilizaron antibióticos profilácticos, incluyendo ciprofloxacino y fluconazol, mientras que ésta no fue una práctica habitual en nuestro estudio.

Mølle y col. (82), llevaron a cabo un estudio retrospectivo que comparaba los polimorfismos del *MBL2* con el riesgo de infecciones graves en pacientes con mieloma múltiple que reciben un TAPH tras la administración de dosis altas de melfalán. Encontraron que los pacientes que presentaban el gen *MBL2* de tipo salvaje tenían un riesgo significativamente menor de “septicemia”, en comparación con los pacientes portadores del gen variante de *MBL2*. En nuestra serie no encontramos diferencias en el número de pacientes con sepsis entre los pacientes con genotipo de *MBL2* de tipo salvaje y los pacientes con genotipo variante. Aunque la falta de asociación entre estas

infecciones con los polimorfismos del *MBL2* podría explicarse por el tamaño de la muestra, también podría ser debido a las diferencias en las enfermedades de base, ya que en el estudio de Mølle (82) todos los pacientes padecían mieloma múltiple, mientras que los nuestros tenían diferentes enfermedades que podrían conferirles un riesgo mayor de infección. Además, también observaron infecciones más graves en los pacientes con *MBL2* variante, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante. También en nuestro estudio se observó esta diferencia y sin significación estadística. Sería interesante confirmar este hallazgo, ya que en caso de que se confirmara se podría cambiar el manejo de los TAPH, por ejemplo, mediante una profilaxis antibiótica y antifúngica más intensiva y precoz en los pacientes con *MBL2* variante.

Encontramos una tendencia a un mayor número de episodios de neumonía en los pacientes con la forma variante *MBL2*, aunque no fue estadísticamente significativa, posiblemente debido al pequeño tamaño de la muestra.

En cuanto a las infecciones de tracto urinario, en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

En cuanto al análisis de la incidencia de las infecciones causadas por diferentes, microorganismos, encontramos un mayor número de infecciones causadas por bacterias grampositivas en los pacientes portadores de la forma variante de *MBL2*, aunque sin significación estadística. Estas bacterias fueron principalmente estafilococos. Se encontró una mayor incidencia de infecciones causadas por *Staphylococcus epidermidis* en el grupo variante de *MBL2*. Estos hallazgos contrastan con el número similar de infecciones de catéter venoso central en ambos grupos. Esto parece significar que el

aumento del número de infecciones causadas por bacterias grampositivas no es sólo debido a infección de catéter, y una hipótesis es que los pacientes con el genotipo variante de *MBL2* sometidos a TAPH, tienden a tener más infecciones por gérmenes grampositivos. Sin embargo, no está claro el mecanismo de esta diferencia. En dos estudios diferentes por Neth y col. (70) y por Shang y col. (103), se encontró que *S. epidermidis* presenta generalmente baja actividad de unión a MBL, lo que iría en contra de la hipótesis de que el MBL juega un papel importante en las infecciones causadas por este germen. Un estudio realizado por L. Shi y col. (104) en ratones comprobó que el 100% de ratones con *MBL2* nulo murieron 48h después de la exposición a una inoculación intravenosa de *S. aureus* en comparación con el 45% de mortalidad en el grupo de ratones con *MBL2* de tipo salvaje, lo que sugiere que la MBL juega un papel clave en la infección por *S. aureus* en ratones y sugiere que el gen variante de la MBL puede actuar como un factor de susceptibilidad a las infecciones por estafilococos en los seres humanos. Asimismo, un estudio realizado por Hellemann y col. (105), demostró una asociación entre el genotipo *MBL2* O/O con una mayor incidencia de infección por bacterias grampositivas. Estos resultados son consistentes con los hallazgos de Neth y col. (70), que han demostrado que *S. aureus* se une a MBL con alta afinidad in vitro. Sin embargo, en el estudio de Chapman (106) en pacientes con empiema, no se observó asociación entre la deficiencia de MBL y la susceptibilidad a los empiemas por bacterias grampositivas o neumococos; tampoco Smithson y col. (107) encontraron diferencias significativas en las bacteriemias por *S. aureus* entre los pacientes con genotipo variante de *MBL2* y controles sanos.

Por lo tanto, parece que se necesitan más estudios para aclarar si la deficiencia de MBL o la presencia del genotipo variante de *MBL2* se asocian con infecciones por

grampositivos, o si estos microorganismos pueden causar infecciones con más frecuencia en estos pacientes. Los resultados de esta respuesta podrían ayudar a prevenir y reducir las infecciones en este grupo de pacientes, con el uso de la administración profiláctica de antibióticos.

Se ha demostrado previamente por Granell y col. (76), que la disfunción de la vía de la MBL secundaria a deficiencias determinadas genéticamente influye en los resultados del alo-TPH, ya que se produce un aumento de la susceptibilidad a las infecciones fúngicas invasivas. En pacientes con TAPH, Horiuchi y col. (83) encontraron que 3 de los 16 pacientes con infecciones severas que tenían una aspergilosis pulmonar eran homocigotos para A, esto es, el alelo normal de MBL. Por el contrario, en nuestro estudio, 2 de los 11 pacientes con infecciones graves tenían una neumonía fúngica, y ambos presentaban el genotipo deficiente de *MBL2*. Los dos murieron como consecuencia de esta infección.

Por lo tanto, podría ser muy atractivo evaluar si los pacientes con polimorfismos del *MBL2* podrían beneficiarse de profilaxis antifúngica, no sólo en TAPH sino también en otro tipo de tratamientos que dañan el sistema inmune innato como quimioterapia o terapias inmunosupresoras.

En nuestro estudio se han producido más infecciones víricas en el grupo de *MBL2* variante, aunque sin significación estadística. Sólo hubo un caso en cada grupo, pero teniendo en cuenta que el tamaño del grupo de *MBL2* de tipo salvaje era mayor, este resultado debe ser tenido en cuenta. Por otra parte, la infección vírica en el grupo de *MBL2* variante fue causada por una reactivación del CMV, una enfermedad potencialmente muy grave, mientras que el virus en el grupo de *MBL2* de tipo salvaje

fue una reactivación de una infección por virus varicela zoster, mucho más común en pacientes hematológicos.

No se encontraron diferencias en la incidencia de infecciones causadas por bacterias gramnegativas, lo cual es consistente con los estudios de Helleman y Sutherland (105, 108).

Respecto a la mortalidad, ésta fue mayor en la forma variante *MBL2*, de hecho, en este grupo, la causa de la muerte fue una infección grave en todos los pacientes. En el estudio de Helleman (105), se constató asimismo un aumento de la mortalidad en los pacientes homocigotos para el alelo variante de *MBL2* (OO), y en un estudio de Garnacho-Montero (109) se observó que la presencia de alelos variantes del gen *MBL2* era un factor de riesgo independiente de mortalidad en pacientes con sepsis neumocócica.

En resumen, los pacientes con el genotipo variante de *MBL2* presentan una mayor mortalidad asociada a infecciones, así como una mayor incidencia de infección fúngica. Asimismo, presentan tendencia a padecer un mayor número de infecciones por grampositivos y a presentar infecciones más graves que los pacientes que tienen el genotipo *MBL2* de tipo salvaje.

Estos datos orientan a que en los pacientes que reciben un TAPH, el genotipo salvaje del gen *MBL2* puede jugar un papel protector en las infecciones por hongos y grampositivos, así como en la severidad de las infecciones.

Sería por tanto muy interesante valorar si la realización de una profilaxis precoz antibacteriana y antifúngica en los pacientes que presenten el genotipo variante de *MBL2* que van a someterse a un TAPH, podría disminuir la incidencia de infecciones, así como su gravedad.



## NIVELES DE MBL

Respecto a la influencia que pueden ejercer los niveles de la MBL en pacientes con neoplasias hematológicas sometidos a TAPH en cuanto a la incidencia y evolución de las infecciones, hasta donde sabemos, no hay en la actualidad ningún estudio que analice esta cuestión.

Por el contrario, hay numerosos estudios que han investigado la relación entre los niveles de la MBL y las infecciones en pacientes oncológicos pediátricos, con resultados contradictorios; en un estudio de Neth y col. (110), los niveles bajos de MBL ( $<1.000 \mu\text{g/L}$ ) se asociaron con un incremento del riesgo de infección, comparado con niveles  $\geq 1.000 \mu\text{g/L}$ . Por otra parte, en un estudio de Schalapbach y col. (111), los pacientes con niveles muy bajos ( $<100 \mu\text{g/L}$ ) y normales ( $\geq 1.000 \mu\text{g/L}$ ) de MBL, tuvieron significativamente más episodios de neutropenia febril que los pacientes con niveles bajos de MBL ( $100-999 \mu\text{g/L}$ ). Hay otros tres estudios en los que no se encontraron diferencias entre los niveles de MBL y los diferentes tipos de infección (112-114). Esto podría explicarse por las diferencias clínicas y metodológicas que existen, como la estratificación por edad, tipo de tumor y régimen de quimioterapia empleado.

Existen varios estudios en pacientes adultos inmunocomprometidos que analizan la relación entre los niveles de MBL y las infecciones. El estudio de Lambourne (74), mostró asociación entre el déficit de MBL y la aspergilosis aguda invasora, mientras que un estudio por Vekemans (115) encontró que los pacientes con déficit de MBL tenían un mayor número de infecciones severas y con un inicio más temprano de la primera infección comparado con los pacientes no deficientes, aunque no encontraron episodios febriles más prolongados o más frecuentes. En dos estudios de Kilpatrick y

Bergmann (116, 117), no se encontró asociación entre los niveles de MBL y las infecciones en pacientes que recibían quimioterapia.

Respecto al alelo-TPH, en el estudio de Osthoff et al (80) se demostró que los pacientes que recibían un trasplante y tenían niveles de MBL por debajo de 1.000 ng/mL presentaban un riesgo aumentado de padecer una o más infecciones mayores, mientras que en los estudios de Mullighan (75) y Chaudhry (81), no se halló esta asociación, aunque en el estudio de Mullighan si vieron que los niveles bajos de MBL mostraban una tendencia a asociarse con las infecciones.

En nuestro estudio, no se ha hallado ninguna asociación entre los niveles bajos de MBL con la susceptibilidad a padecer infecciones durante la realización de un TAPH; es más, no se observó concordancia entre los genotipos productores de bajos niveles de MBL con la determinación de niveles bajos de MBL en las determinaciones realizadas pretrasplante y en los diferentes periodos post-trasplante.

Una de las razones que podría justificar la discordancia de los datos de nuestro estudio (diferencias estadísticamente significativas que muestran aumento de infecciones fúngicas y mayor mortalidad de causa infecciosa en pacientes sometidos a TAPH con el alelo variante de *MBL2*, pero sin hallar ninguna influencia de los niveles bajos de la MBL) podría ser debido al tamaño muestral; si bien hemos analizado los genotipos de los 72 pacientes incluidos en el estudio, únicamente hemos podido analizar la evolución de las infecciones tras un TAPH en función de los niveles de MBL en 47 pacientes, puesto que el resto carecía de la medición pretrasplante de MBL.

## **TOLL-LIKE RECEPTORS**

No hubo relación estadísticamente significativa entre los distintos tipos de infecciones bacterianas, víricas o fúngicas y las distintas variantes genéticas de los TLR4 o TLR2. Aunque es importante tener en cuenta que las variantes genéticas fueron la minoría, por lo que no se pudieron extraer conclusiones, dado el escaso porcentaje de los pacientes con mutaciones. En otras series se describen asociaciones entre las mutaciones de los TLR y riesgo de infección, especialmente por *Aspergillus* (118-120).

*Los resultados del presente trabajo sugieren que los polimorfismos del MBL2 en los pacientes sometidos a TAPH se relacionan con mayor riesgo de infecciones fúngicas y con un aumento en la tasa de mortalidad secundaria a infección. Asimismo, se observó en este grupo de pacientes una tendencia a un mayor número de infecciones por grampositivos y a una mayor gravedad de los episodios de infección. Sin embargo, los niveles de MBL bajos no se asociaron con mayor riesgo de infecciones en los distintos periodos del TAPH.*

*Los polimorfismos de los TLR, no se relacionaron con las infecciones en estos pacientes, aunque las variantes genéticas fueron minoría en nuestro estudio.*

## 7. CONCLUSIONES

---



1. En los pacientes a los que se realizó un TAPH el polimorfismo del gen *MBL2* más frecuente fue el no deficiente (A/A).
2. No se objetivó asociación entre los genotipos de *MBL2* y los niveles de MBL pretrasplante.
3. Los pacientes con el genotipo variante de *MBL2*, presentaron un aumento en la incidencia de infecciones fúngicas. Asimismo, estos pacientes tuvieron un mayor número de infecciones por microorganismos grampositivos e infecciones más graves que los pacientes con el genotipo *MBL2* de tipo salvaje, aunque sin llegar a la significación estadística.
4. Los pacientes con el genotipo variante de *MBL2* presentaron una mayor mortalidad asociada a infecciones.
5. No hubo asociación entre los niveles bajos de MBL y la evolución de los pacientes sometidos a TAPH.
6. No se objetivó un mayor riesgo de infección en aquellos pacientes con polimorfismos en los genes TLR2 y 4.





## 8. BIBLIOGRAFÍA

---



- 1) McGlave P. Overview of cell and immune based therapies. En: Hoffman R, Benz EJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P. et al. Hematology, basic principles and practice. 5° ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2009. p 1555-1559.
- 2) Mackall C, Fry T, Gress R, Peggs K, Storek J, Toubert A. Background to hematopoietic cell transplantation, including post-transplant immune recovery. Bone Marrow Transplantation 2009;**44**:457-462.
- 3) Myers LA, Patel DD, Pucrubnk JM, Buckley RH. Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency in the neonatal period leads to superior thymic output and improved survival. Blood 2002; **99**:872-878.
- 4) Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, Heilman D, Broxmeyer HE, Emanuel D, et al. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord-blood transplantation. Blood 2000; **96**:2703-2711.
- 5) Carreras E, Rozman C. Trasplante de progenitores hematopoyéticos. En: Sans-Sabrafén J, Besses C, Vives JL. Hematología clínica. 5° ed. Madrid: Elsevier 2006. p 789-807.
- 6) Sorror ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. Blood 2005;**106**:2912-2919.
- 7) Travis J. Origins. On the origin of the immune system. Science 2009; **324**:580-582.
- 8) Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell 1997; **91**:295-298.

- 9) Neth OW, Bajaj-Elliott M, Turner MW, Klein NJ. Susceptibility to infection in patients with neutropenia: the role of the innate immune system. *Br J Haematol* 2005; **129**:713-722.
- 10) Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S. Et al. The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;**8**:29-35.
- 11) Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 2001; **180**:86-99.
- 12) Verma A, White M, Vathipadiekal V, Tripathi S, Mbianda J, Leong M. et al. Human H-ficolin inhibits replication of seasonal and pandemic influenza A viruses. *J Immunol* 2012;**189**:2478-2487.
- 13) Botto M, Kirschfink M, Macor P, Pickeringa MC, Würzner R, Tedesco F. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol* 2009;**46**:2774-2783.
- 14) Liu FT, Bevins CL. A sweet target for innate immunity. *Nat Med* 2010;**16**:263-264.
- 15) Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol* 2008;**28**:1-13.
- 16) Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol* 2010;**28**:157-183.
- 17) Deban L, Russo RC, Sironi M, Moalli F, Scanziani M, Zambelli V. et al. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol* 2010;**11**:328-334.

- 18) Liu AH, Zasloff MA, Johnston RB Jr. Innate immunity. In: Adkinson NF Jr, Busse WW, Bochner BS, et al. Middleton's Allergy: Principles and Practice. 7th ed, Elsevier 2008.
- 19) Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**125**:985-992.
- 20) Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009;**113**:1399-1407.
- 21) Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010;**32**:305-315.
- 22) Shaw MH, Reimer T, Kim YG, Nuñez G. NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Curr Opin Immunol* 2008;**20**:377-382.
- 23) Wilkins C, Gale M Jr. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr Opin Immunol* 2010; **22**:41-47.
- 24) Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamut U, Schamidt G, Loppnow H. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994;**8**:217-225.
- 25) Johnston RB Jr, Babior BM. The polymorphonuclear leukocyte system. In: Immunologic disorders in infants and children, 5th ed, Stiehm ER, Ochs HD, Winkelstein JA (Eds), Saunders/Elsevier, Philadelphia 2004. p.109.
- 26) Silva MT. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol* 2010;**87**:93-106.
- 27) Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 2008;**26**:421-452.

- 28) Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005;**175**:1373-1381.
- 29) Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 2010;**234**:45-54.
- 30) Rehaume LM, Hancock RE. Neutrophil-derived defensins as modulators of innate immune function. *Crit Rev Immunol* 2008;**28**:185-200.
- 31) Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukoc Biol* 2009;**85**:352-370.
- 32) Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 2010;**129**:154-169.
- 33) Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest* 2012;**122**:1164-1171.
- 34) Paust S, Senman B, von Andrian UH. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunol Rev* 2010;**235**:286.
- 35) Cooper MA, Yokoyama WM. Memory-like responses of natural killer cells. *Immunol Rev* 2010;**235**:297.
- 36) Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011; **331**:44-49.
- 37) Sun JC, Lopez-Verges S, Kim CC, DeRisi JL, Lanier LL. NK cells and immune "memory". *J Immunol* 2011; **86**:1891-1897.
- 38) Paust S, von Andrian UH. Natural killer cell memory. *Nat Immunol* 2011;**12**:500-508.

- 39) Semple JW, Freedman J. Platelets and innate immunity. *Cell Mol Life Sci* 2010;**67**:499-511.
- 40) Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 2001;**180**:86–99.
- 41) Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet* 2000;**2**:305–322.
- 42) Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol Immunol* 2001;**38**:133–149.
- 43) Teillet F, Dublet B, Andrieu JP, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Thielens NM. The two major oligomeric forms of human mannan-binding lectin: chemical characterization, carbohydrate-binding properties, and interaction with MBL-associated serine proteases. *J Immunol* 2005;**174**:2870-2877.
- 44) Jensen PH, Weilguny D, Matthiesen F, McGuire KA, Shi L, Hojrup P. Characterization of the oligomer structure of recombinant human mannan-binding lectin. *J Biol Chem* 2005;**280**:11043-11051.
- 45) Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 1992;**176**:1497-1503.
- 46) Lipscombe RJ, Sumiya M, Summerfield JA, Turner MW. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein (MBP) expressed by individuals of differing genotype. *Immunology* 1995;**85**:660-667

- 47) Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaible W, Laursen SB, Poulsen K et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997;**386**:506-510.
- 48) Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun* 2006;**7**:85-94.
- 49) Garred P, Madsen HO, Hofmann B, Svejgaard A: Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet* 1995;**346**:941-943.
- 50) Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, Thursz M, Gorchein A, Monteil MA, et al. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 1995;**345**:886-889.
- 51) Koch A, Melbye M, Sorensen P, Homoe P, Madsen HO, Molbak K, et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *J Am Med Assoc* 2001;**285**:1316-1321.
- 52) Hibberd ML, Sumiya M, Summerfield JA, Booy R, Levin M. Association of variants of the gene for mannose binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet* 1999;**353**:1049-1053.
- 53) Peterslund NA, Koch C, Jensenius JC, Thiel S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet* 2001;**358**:637-638.
- 54) Mullighan CG, Heatley S, Doherty K, Szabo F, Grigg A, Hughes TP et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2002;**99**:3524-3529.



- 55) Roy S, Knox K, Segal S, Griffiths D, Moore CE, Welsh KI, et al; Oxford Pneumococcal Surveillance Group. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. *Lancet* 2002;**359**:1569-1573.
- 56) Kronborg G, Garred P. Mannose-binding lectin genotype as a risk factor for invasive pneumococcal infection. *Lancet* 2002;**360**:1176.
- 57) Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2003;**37**:1496-1505.
- 58) Siassi M, Hohenberger W, Riese J. Mannan-binding lectin (MBL) serum levels and post-operative infections. *Biochem Soc Trans.* 2003;**31**:774-775.
- 59) Siassi M, Riese J, Steffensen R, Meisner M, Thiel S, Hohenberger W. Mannan-binding lectin and procalcitonin measurement for prediction of postoperative infection. *J. Crit Care* 2005;**9**:483-489.
- 60) Garred P, Harboe M, Oettinger T, Koch C, Svejgaard A. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis. *Eur J Immunogenet* 1994;**2**:125-131.
- 61) Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW et al. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet* 1996;**348**:1417-1419.
- 62) Yuen MF, Lau CS, Lau YL, Wong WM, Cheng CC, Lai CL. Mannose binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 1999;**29**:1248-1251.
- 63) Hakozaki Y, Yoshba M, Sekiyama K, Seike E, Iwamoto J, Mitani K et al. Mannose-binding lectin and the prognosis of fulminant hepatic failure caused by HBV infection. *Liver* 2002;**22**:29-34.

- 64) Matsushita M, Hijikata M, Ohta Y, Iwata K, Matsumoto M, Nakao K et al. Hepatitis C virus infection and mutations of mannose binding lectin gene MBL. Arch Virol 1998;**143**:645-651.
- 65) Matsushita M, Hijikata M, Matsushita M, Ohta Y, Mishiro S. Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPA and LYPB with interferon-resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients. J Hepatol 1998;**29**:695-700.
- 66) Sasaki K, Tsutsumi A, Wakamiya N, Ohtani K, Suzuki Y, Watanabe Y et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. Scand J Gastroenterol 2000;**35**:960-965.
- 67) Kilpatrick DC, Delahooke TE, Koch C, Turner ML, Hayes PC. Mannan-binding lectin and hepatitis C infection. Clin Exp Immunol 2003;**132**:92-95.
- 68) Maas J, Roda Husman AM, Brouwer M, Krol A, Coutinho R et al. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. Amsterdam Cohort Study. AIDS 1998;**12**:2275-2280.
- 69) Heggelund L, Mollnes TE, Ueland T, Christophersen B, Aukrust P, Froland SS. Mannose-binding lectin in HIV infection: relation to disease progression and highly active antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 2003;**32**:354-361.
- 70) Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. Infect Immun 2000;**68**:688-693.
- 71) Cross CE, Bancroft GJ. Ingestion of acapsular *Cryptococcus neoformans* occurs via mannose and  $\beta$ -glucan receptors, resulting in cytokine production and

- increased phagocytosis of the encapsulated form. *Infect Immun* 1995;**63**:2604-2611.
- 72) Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 2001;**180**:86-99
- 73) Kaur S, Gupta VK, Thiel S, Sarma PU, Madan T. Protective role of mannan-binding lectin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Exp Immunol* 2007;**148**:382-389.
- 74) Lambourne J, Agranoff D, Herbrecht R, Troke PF, Buchbinder A, Willis F, et al. Association of mannose-binding lectin deficiency with acute invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2009;**49**:1486-1491.
- 75) Mullighan CG, Heatley SL, Danner S, Dean MM, Doherty K, Hahn U, et al. Mannose-binding lectin status is associated with risk of major infection following myeloablative sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2008;**112**:2120-2128.
- 76) Granell M, Urbano-Ispizua A, Suarez B, Rovira M, Fernández-Avilés F, Martínez C et al. Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2006;**34**:1435-1441.
- 77) Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol* 1992;**90**:31-35.

- 78) Bellamy R, Ruwende C, McAdam KP, Thursz M, Sumiya M, Summerfield J et al. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. *QJM* 1998;**91**:13-18.
- 79) Mullighan CG, Bardy PG. Mannose-binding lectin and infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2004;**45**:247-256.
- 80) Osthoff M, Rovó A, Stern M, Danner D, Gratwohl A, Tichelli A et al. Mannose-binding lectin levels and major infections in a cohort of very long-term survivors after allogeneic stem cell transplantation *Haematologica* 2010;**95**:1389-1396.
- 81) Chaudhry SH, Chaudhry S, Jansen-Hoogendijk AM, Jol van der Zijde CM, van Tol MJ, Roos A et al. Mannose-binding lectin levels and infections in children after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2010;**45**:289-293.
- 82) Mølle I, Peterslund NA, Thiel S, Steffensen R. MBL2 polymorphism and risk of severe infections in multiple myeloma patients receiving high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006;**38**:555-560.
- 83) Horiuchi T, Gondo H, Miyagawa H, Otsuka J, Inaba S, Nagafuji K et al. Association of MBL gene polymorphisms with major bacterial infection in patients treated with high-dose chemotherapy and autologous PBSCT. *Genes Immun* 2005;**6**:162-166.
- 84) Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;**11**:373-384.
- 85) Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006;**7**:131-137.

- 86) Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat. Immunol* 2009;**10**:1200–1207.
- 87) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;**24**:783–801.
- 88) Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000;**68**:6398-6401.
- 89) Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 2003;**77**:4588-4596.
- 90) Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 2007;**44**:1315-1320.
- 91) Smirnova I, Hamblin MT, McBride C, Beutler B, Di Rienzo A. Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics* 2001;**158**:1657-1664.
- 92) Schumann RR, Lorenz E, Latz E. Mutations of TLR4 are associated with incidence and severity of sepsis in critically ill patients. ICAAC 2001. Presentation 1107.
- 93) Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002;**186**:1522-1525.

- 94) Neth OW, Bacher U, Das P, Zabelina T, Kabisch H, Kroeger N et al. Influence of mannose-binding lectin genotypes and serostatus in allo-SCT: analysis of 131 recipients and donors. *Bone Marrow Transplant* 2010;**45**:13-19.
- 95) Kilpatrick DC, Stewart K, Allan EK, McLintock LA, Holyoake TL, Turner ML. Successful haemopoietic stem cell transplantation does not correct mannan-binding lectin deficiency. *Bone Marrow Transplant* 2005;**35**:179-181.
- 96) Hughes WT, Amstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T et al. Guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002;**34**:730-751.
- 97) Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ et al; International Harmonization Project on Lymphoma. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;**25**:579-586.
- 98) Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K et al; International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma *Leukemia* 2006;**20**:1467-1473.
- 99) Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH et al; International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003;**21**:4642-4649.
- 100) Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MA, Kumar S, Wechalekar A, Hawkins PN et al. New criteria for response to treatment in immunoglobulin light chain

- amyloidosis based on free light chain measurement and cardiac biomarkers: impact on survival outcomes. *J Clin Oncol* 2012;**30**:4541-4549.
- 101) De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T et al; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008;**46**:1813-1821.
- 102) Thiel S, Frederiksen PD, Jensenius JC. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. *Mol Immunol* 2006;**43**:86-96.
- 103) Shang Shi-qiang, Chen Guo-xian, Shen Jie, Yu Xiao-hong, Wang Ke-yi. The binding of MBL to common bacteria in infectious diseases of children. *J Zhejiang Univ SCI* 2005;**6B**:53-56.
- 104) Shi L, Takahashi K, Dundee J, Shahroor-Karni S, Thiel S, Jensenius JC et al. Mannose-binding lectin-deficient mice are susceptible to infection with *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* 2004;**199**:1379-1390.
- 105) Hellemann D, Larsson A, Madsen HO, Bonde J, Jarløv JO, Wiis J. et al. Heterozygosity of mannose-binding lectin (MBL2) genotypes predicts advantage (heterosis) in relation to fatal outcome in intensive care patients. *Hum Mol Genet* 2007;**16**:3071-3080.

- 106) Chapman SJ, Vannberg FO, Khor CC, Rautanen A, Maskell NA, Davies CW et al. Mannose-binding lectin genotypes: lack of association with susceptibility to thoracic empyema. *BMC Med Genet* 2010;**15**:11-15.
- 107) Smithson A, Muñoz A, Suarez B, Perello R, Martinez J.A, Mensa J. et al. Mortality and time for detection of blood growth in patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia: implication of mannose-binding lectin pathway. In: Program and abstracts of the 17th European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Munich) 2007:1753.
- 108) Sutherland AM, Walley KR, Russell JA. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med.*2005; **33**:638-644.
- 109) Garnacho-Montero J, García-Cabrera E, Jiménez-Álvarez R, Díaz-Martín A, Revuelto-Rey J, Aznar-Martín J et al. Genetic variants of the MBL2 gene are associated with mortality in pneumococcal sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;**73**:39-44.
- 110) Neth O, Hann I, Turner MW, Klein NJ. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. *Lancet* 2001;**358**:614-618.
- 111) Schlapbach LJ, Aebi C, Otth M, Luethy AR, Leibundgut K, Hirt A et al. Serum levels of mannose-binding lectin and the risk of fever in neutropenia pediatric cancer patients. *Pediatr Blood Cancer* 2007;**49**:11-16.
- 112) Frakking FNJ, van de Wetering MD, Brouwer N, Dolman KM, Geissler J, Lemkes B. et al. The role of mannose-binding lectin (MBL) in paediatric oncology patients with febrile neutropenia. *Eur J Cancer* 2006;**42**:909-916.



- 113) Lehrnbecher T, Venzon D, De HM, Chanock SJ, Kühl J. Assessment of measuring circulating levels of interleukin-6, interleukin-8, C-reactive protein, soluble Fc gamma receptor type III, and mannose-binding protein in febrile children with cancer and neutropenia. *Clin Infect Dis* 1999;**29**:414-419.
- 114) Rubnitz JE, Howard SC, Willis J, Pui CH, Pounds S, Hayden RT. Baseline mannose binding lectin levels may not predict infection among children with leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2008;**50**:866-868.
- 115) Vekemans M, Robinson J, Georgala A, Heymans C, Muanza F, Paesmans M et al. Low mannose-binding lectin concentration is associated with severe infection in patients with hematological cancer who are undergoing chemotherapy. *Clin Infect Dis* 2007;**44**:1593-1601.
- 116) Kilpatrick DC, McLintock LA, Allan EK, Copland M, Fujita T, Jordanides NE et al. No strong relationship between mannan binding lectin or plasma ficolins and chemotherapy-related infections. *Clin Exp Immunol* 2003;**134**:279-284.
- 117) Bergmann OJ, Christiansen M, Laursen I, Bang P, Hansen NE, Ellegaard J, et al. Low levels of mannose-binding lectin do not affect occurrence of severe infections or duration of fever in acute myeloid leukaemia during remission induction therapy. *Eur J Haematol* 2003;**70**:91-97.
- 118) Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, Janer M et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2008;**359**:1766-1777.
- 119) Carvalho A, Cunha C, Carotti A, Aloisi T, Guarrera O, Di Ianni M et al. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and susceptibility to infections in allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2009;**37**:1022-1029.

120) Pamer EG. TLR polymorphisms and the risk of invasive fungal infections. N Engl J Med 2008;**359**:1836-1838.

## **9. ANEXOS**

---



## 9.1 ANEXO 1

### INFECCIONES E INMUNIDAD INNATA EN TAPH

#### 1.DATOS PRETRASPLANTE

NOMBRE.....NHC.....

SEXO H  M  EDAD.....

#### ENFERMEDAD DE BASE:

Enfermedad hematológica:.....

Estadío.....

Fecha dx:.....

Líneas de tratamiento previas:

Número.....

Fludarabina si  no

Campath si  no

antiCD-33 si  no

RDT si  no

TPH previo si  no  Tipo mini-alo  alo-convencional  auto

Otras enfermedades: si  no

Diabetes:  EPOC  I cardiaca  Neoplasias  Cirrosis  IRC

Alcoholismo

Otras.....

Antecedentes de infecciones relevantes previas y tratamiento

Infección fúngica

Si  No

Posible  Probable  Probada  (gérmen.....)

Antimicrobiano.....

Evolución.....

Infección bacteriana grave

Si  No

Gérmen.....

Infección vírica grave

Si  No

Gérmen.....

## 2. DATOS DEL TRASPLANTE

### 2.1 SEROLOGÍAS PRETRASPLANTE ( +/-)

VHS	CMV	VEB	VVZ	VIH	VHC	VHB	TOXOPLASM A	PPD

### 2.2 ACONDICIONAMIENTO Y FECHA INFUSIÓN

Fuente de progenitores: SP  MO  Ambos

Acondicionamiento: Fármacos y dosis.....

.....

Fecha de infusión:.....

### 2.3 PROCEDIMIENTOS INVASIVOS

Sonda urinaria:

Si  No

Fechas de colocación y retirada .....

.....

Ventilación mecánica:

Si  No

Fechas de inicio y fin .....

.....

Nutrición parenteral

Si  No

Fechas de colocación y retirada .....

.....

## 2.4 VALORES DE LINFOCITOS T, INMUNOGLOBULINAS

	30	60	90	120	180
CD4					
CD8					
IGG					
IGA					
IGM					

## 2.5 PERIODO DE NEUTROPENIA

Día de recuperación granulocitaria .....

GCSF: Si  No

### *Profilaxis*

VIRUS:

No

Si  Fármaco..... Día finalización.....

HONGOS:

No

Si  Fármaco..... Día finalización.....

ANTIBÓTICA:

No

Si  Fármaco..... Día finalización.....

Mucositis: si  no  grado I  II  III  IV

## 2.6 PERIODO DESDE RECUPERACIÓN GRANULOCITARIA HASTA +100

### *Profilaxis*

#### VIRUS:

No

Si  Fármaco..... Día finalización.....

#### HONGOS:

No

Si  Fármaco..... Día finalización.....

#### ANTIBIÓTICA:

No

Si  Fármaco..... Día finalización.....

## 2.7 .PERIODO DESDE DIA + 100

### *Profilaxis*

#### VIRUS:

No

Si  Fármaco..... Día finalización.....

#### HONGOS:

No

Si  Fármaco..... Día finalización.....

#### ANTIBIÓTICA:

No

Si  Fármaco..... Día finalización.....



## 2.9 NIVELES SERICOS MBL/GENOTIPO MBL- TLR/ GALACTOMANANO

**NOMBRE PACIENTE:**.....

<b>Fecha</b>	<b>MBL</b>	<b>Galactomanano</b>	<b>CMV (Ag)</b>	<b>Genotipo MBL</b>	<b>Genotipo TLR2</b>	<b>Genotipo TLR4</b>

## 2.10 COMPLICACIONES INFECCIOSAS

NOMBRE PACIENTE.....

PERIODO .....

Fecha	Infección	Fiebre	Foco	Sospe- cha hongo	Germen	Locali- zación germen	Gravedad	Trat. Anti- microbiano	Cambio vía Tipo vía Fecha colocación	Evolución

## DATOS DEL TRASPLANTE

### Enfermedad Hematológica:

Mieloma múltiple  
LAL  
Síndrome linfoproliferativo  
E Hodgkin  
Linfoma de alto grado  
Neoplasia aguda mieloide (1ª ó 2ª)  
Síndrome mielodisplásico  
Síndrome mieloproliferativo crónico  
Inmunodeficiencia congénita  
Alteraciones congénitas eritropoyesis  
Aplasia de médula ósea  
Otros

### Antecedentes de infecciones fúngicas

Gérmes  
Aspergillus (Fumigatus ó Terreus ó Flavus)  
Mucormicosis  
Scedosporium

Antimicrobiano  
Anfotericina  
Itraconazol  
Voriconazol  
Caspofungina  
Fluconazol  
Otros

Evolución  
Resolución completa  
Resolución parcial

### Antecedente de infección bacteriana grave

Gérmes  
S. Aureus (MARS si o no)  
S Hominis  
S Viridans  
Enterobacter

Pseudomonas (multirresistente si-no)

E. Colli (multirresistente si-no)

Stenotrophomona

Acinetobacter

Serratia

Proteus

Otros

### **Antecedentes de infección vírica**

Gérmen

CMV

Herpes simple

Otros

### **Acondicionamiento**

Radioterapia + Ciclofosfamida

Busulfan + Ciclofosfamida

Fludarabina + Melfalan

BEAC

BEAM

Melfalan

Otros

### **Periodo de neutropenia**

Profilaxis virus

Aciclovir

Otros

Profilaxis antifungica

Fluconazol

Caspofungina

Itraconazol

Voriconazol

Anfotericina

Otros

Profilaxis antibiótica (nunca hacemos)

**Periodo desde la recuperación granulocitaria hasta día + 100**

Profilaxis virus

Aciclovir

Gancilovir

Otros

Profilaxis antifúngica

Voriconazol

Itraconazol

Fluconazol

Otros

Profilaxis antimicrobiana

Septin forte

Pentamidina

Otros

**Periodo desde día + 100**

Profilaxis virus

Aciclovir

Gancilovir

Otros

Profilaxis antifúngica

Voriconazol

Itraconazol

Fluconazol

Otros

Profilaxis antimicrobiana

Septin forte

Pentamidina

Otros

## HOJA DE RECOGIDA DE INFECCIONES

### Infección

Confirmada

Probable

Posible

Dudosa

### Fiebre

Si o no

### Foco

Catéter

Mucositis

Vías respiratorias altas

Pulmón

Genitourinario

Vía digestiva alta

Diarrea

Cutáneo

SNC

Otros

### Sospecha de hongo

Si o no

### Gérmes

S Aureus

S hominis

S epidermidis

S Viridans

Enterococo

Corynebacterium

Moraxella

Pseudomona (multirresistente si ó no)

E coli (multirresistente si ó no)

Serratia

Acinetobacter

Enterobacter

Proteus

Clostridium  
Citomegalovirus  
Herpes simple  
Adenovirus  
Poliomavirus  
Influenzae  
Virus respiratorio Sincitial  
Virus herpes 6  
Aspergillus (Fumigatus ó Terreus ó Flavus ó Spp)  
Mucor  
Scedosporium  
Otros

#### Localización germen

Sangre  
Punta catéter  
Orina  
Heces  
Biopsia cutanea  
Biopsia digestiva  
Esputo espontáneo  
BAL  
Exudado nasal  
Frotis faringeo  
Otros

#### Gravedad

Leve  
Moderado  
Grave  
Shock séptico

#### Tratamiento antimicrobiano

Empírico correcto  
Empírico incorrecto  
Según antibiograma  
Tazocel  
Otros

Evolución

Resolución

Progresión



## 9.2 ANEXO 2

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA EXTRACCIÓN Y CONGELACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PARA ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN

#### NOMBRE DEL ESTUDIO: POLIMORFISMOS EN LOS GENES DEL SISTEMA INMUNE INNATO (MBL Y TLR) Y RIESGO DE INFECCIÓN EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

A usted se le pide que nos permita utilizar una parte de sus muestras de sangre para realizar análisis genéticos dentro del estudio arriba indicado. Los resultados de estos análisis serán confidenciales y no se revelarán ni a usted ni a otra persona a menos que usted pida que explícitamente se revelen. También se le pedirá que nos permita conservar parte de estas muestras de sangre para utilizarlas en el futuro en caso de que se realizasen nuevos estudios genéticos con objetos similares.

#### Paciente:

Yo acepto que mis muestras de sangre sean utilizadas para las pruebas genéticas.

Nombre..... Fecha.....

Firma.....

Yo acepto que mis muestras de sangre sean almacenadas para utilizarlas en el futuro en nuevos análisis genéticos.

Nombre..... Fecha.....

Firma.....



This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

## Mannose-binding lectin gene variants and infections in patients receiving autologous stem cell transplantation

*BMC Immunology* 2014, **15**:17 doi:10.1186/1471-2172-15-17

Ana Moreto (anamoreto@hotmail.com)  
Concepcion Fariñas-Alvarez (cfarinas@humv.es)  
Maria Puente (puentepomposo@hotmail.com)  
Javier Gonzalo Ocejo-Vinyals (jgocejo@humv.es)  
Pablo Sánchez-Velasco (pvelasco103@hotmail.com)  
Juan Pablo Horcajada (JHorcajada@parcdesalutmar.cat)  
Ana Batlle (mbatlle@humv.es)  
Carmen Montes (carmenmontesgaisan@hotmail.com)  
Francisca Santos (fsantos@humv.es)  
Eulogio Conde (eulogio.conde@unican.es)  
Maria-Carmen Fariñas (farinasc@unican.es)

**ISSN** 1471-2172

**Article type** Research article

**Submission date** 6 November 2013

**Acceptance date** 25 April 2014

**Publication date** 3 May 2014

**Article URL** <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/15/17>

Like all articles in BMC journals, this peer-reviewed article can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in BMC journals are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in BMC journals or any BioMed Central journal, go to

<http://www.biomedcentral.com/info/authors/>

2014 Moreto *et al.*

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



# Mannose-binding lectin gene variants and infections in patients receiving autologous stem cell transplantation

Ana Moreto<sup>1,5</sup>  
Email: anamoreto@hotmail.com

Conception Fariñas-Alvarez<sup>2</sup>  
Email: cfarinas@humv.es

Maria Puente<sup>1,5</sup>  
Email: puentepomposo@hotmail.com

Javier Gonzalo Ocejo-Vinyals<sup>3</sup>  
Email: jgocejo@humv.es

Pablo Sánchez-Velasco<sup>3</sup>  
Email: pvelasco103@hotmail.com

Juan Pablo Horcajada<sup>4,6</sup>  
Email: JHorcajada@parcdesalutmar.cat

Ana Batlle<sup>1</sup>  
Email: mbatlle@humv.es

Carmen Montes<sup>1</sup>  
Email: carmenmontesgaisan@hotmail.com

Francisca Santos<sup>4</sup>  
Email: fsantos@humv.es

Eulogio Conde<sup>1</sup>  
Email: eulogio.conde@unican.es

Maria-Carmen Fariñas<sup>4\*</sup>  
\* Corresponding author  
Email: farinasc@unican.es

<sup>1</sup> Department of Hematology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, University of Cantabria, IFIMAV, Santander, Spain

<sup>2</sup> Health Care Quality Unit, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, University of Cantabria, IFIMAV, Santander, Spain

<sup>3</sup> Department of Immunology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, University of Cantabria, IFIMAV, Santander, Spain

<sup>4</sup> Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, University of Cantabria, IFIMAV, Santander, Spain

<sup>5</sup> Current address: Department of Hematology, Hospital Universitario de Cruces, Bilbao, Spain

<sup>6</sup> Current address: Department of Infectious Diseases, Hospital Universitari del Mar, Barcelona, Spain

## Abstract

### Background

Serious infections are common in patients undergoing autologous stem cell transplantation (ASCT) mainly because of the effects of immunosuppression. The innate immune system plays an important role in the defense against different infections. Mannose binding lectin (MBL) is a central molecule of the innate immune system. There are several promoter polymorphisms and structural variants of the *MBL2* gene that encodes for this protein. These variants produce low levels of MBL and have been associated with an increased risk for infections.

### Methods

Prospective cohort study. The incidence, severity of infections and mortality in 72 consecutive patients with hematologic diseases who underwent ASCT between February 2006 and June 2008 in a tertiary referral center were analyzed according to their *MBL2* genotype. INNO-LiPA *MBL2* was used for *MBL2* gene amplification and genotyping. Relative risks (RR) (IC95%) as measure of association were calculated. Multivariate analysis was performed using logistic regression.

### Results

A statistically significant higher number of fungal infections was found in patients with *MBL2* variants causing low MBL levels (21.1% versus 1.9%,  $p=0.016$ ). In this *MBL2* variant group infection was more frequently the cause of mortality than in the *MBL2* wild-type group ( $p=0.05$ ). Although not statistically significant, there was a higher incidence of major infections in the *MBL2* variant group as well as a higher number of infections caused by gram-positive bacteria.

### Conclusions

Low-producer *MBL2* genotypes were associated with an increased number of fungal infections in ASCT patients, which would suggest that MBL has a protective role against such infections. ASCT patients with *MBL2* variant genotypes are more likely to die as a result of an infection.

## Keywords

MBL, Gene variant, Polymorphism, Infection, Autologous stem cell transplant

## Background

Patients undergoing autologous stem cell transplantation (ASCT) are at a high risk of serious infection, mainly due to both the procedure and the underlying disease requiring the transplant, which in most patients undergoing the procedure is hematological [1-5].

Mannose-binding lectin (MBL) is a circulating liver-synthesized C-type serum protein of importance in the innate immune defense system. It is one of the recognition molecules in the lectin complement activation pathway [6]. Human MBL is derived from a single gene located on chromosome 10 (*MBL2*) [3-8].

Serum levels and the function of MBL oligomers are strongly influenced by genetic variants [9]. Low levels of MBL have been associated with increased susceptibility to infections, especially in recurrent or severe forms, even in immunocompetent individuals [10]. However, isolated low MBL serum levels do not usually cause disease. This deficiency appears to be associated with severe infections when other immune deficiencies occur [11].

The effect of MBL deficiency in the infectious complications of patients receiving chemotherapy is variable [11]. It has been associated with serious infections and more prolonged episodes of febrile neutropenia [11-13], as well as with an earlier first severe infection in deficient patients [14]. There are also several studies which analyze the relationship between MBL and allogeneic stem cell transplantation infections [15-22], but until now, only two studies dealing with this issue in ASCT have been published [23,24]. The focus of this study is the association between *MBL2* gene variants and the risk of infections in patients with different hematologic diseases undergoing ASCT.

## Patients and methods

### *Patients*

A prospective cohort study of all patients who received an ASCT for hematologic disease from February 2006 to June 2008 in the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (1,000-bed teaching hospital) was performed. All transplanted patients >13 years old without immunodeficiency (solid tumors, HIV infection or congenital immunodeficiencies) were included. Patients were followed up after inclusion in the study for 6 months.

### *Infections*

Intercurrent infections were monitored during the early period (0–30 days after ASCT), the intermediate period (30–100 days after ASCT) and the late period (>100 days after ASCT). Infections were prospectively collected by the clinical research associates from the institution using a standardized data collection form, following the protocols of the Hematology Department of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, in compliance with the clinical guidelines of the Infectious Diseases Society of America [25]. Prophylactic measures included isolation in high-pressure rooms with air filters and the administration of

intravenous acyclovir at prophylactic doses from day -3. Antibiotics and antifungal prophylaxis were not routinely administered.

An infectious episode was defined as a microbiologically or clinically documented infection. Microbiologically documented infections with the same organisms during the same phase of therapy occurring more than 7 days apart were counted as different infections. Major infection was predefined as either sepsis confirmed on microbiological testing or a systemic inflammatory response syndrome with highly suggestive radiographic or clinical characteristics and the requirement for a specific antimicrobial treatment in both cases. The following conditions were excluded: single positive blood culture resulting from contaminant skin bacteria, upper respiratory tract infections, culture-negative interstitial pneumonitis, dermatological varicella zoster reactivation, and local herpes simplex reactivation. Severe herpes virus infection was predefined as invasive viral infections requiring prompt treatment and hospitalization. A positive cytomegalovirus (CMV) blood culture or CMV-pp65 antigenemia assay or polymerase chain reaction (PCR) for CMV DNA (>400 copies/ml) (COBAS Amplicor CMV Monitor, Roche Diagnostics) and symptoms of organ dysfunction were required to fulfill the criteria of a clinically significant CMV infection/reactivation [26]. Episodes of asymptomatic CMV reactivation, primary varicella zoster virus and Epstein-Barr virus infections were excluded.

### ***MBL2 genotyping***

Blood was collected in EDTA-stabilized tubes in compliance with approved protocols from our institution. Genomic DNA from patients and controls was extracted from peripheral blood by using the Maxwell 16 Genomic DNA Purification system. For MBL2 gene amplification and genotyping, the INNO-LiPA MBL2 (Innogenetics Diagnostica Iberia S.L.U, Barcelona, Spain) was used, following the manufacturer's instructions. The INNO-LiPA MBL2 is a line probe assay, designed for genotyping the 6 variations in the human MBL2 gene (-550G > C, -221G > C, +4C > T, R52C, G54D, and G57E), providing an analysis of the seven common haplotypes and the 28 possible resulting diplotypes.

Exon mutations called structural variants (normal allele or "wild-type" A and mutant alleles B, C and D which together were called allele O) and promoter polymorphisms (H/L, Y/X and P/Q) were analyzed. Variants YA/YA, XA/XA and YA/XA were classified as A/A. Those with any mutation in the exon such as YA/O, XA/O were classified as A/O and, lastly, individuals homozygous for the structural variants in the exon were considered as O/O. Thus, patients were divided in two groups according to their *MBL2* genotype: 1) normal homozygous patients (AA) and 2) patients with AO and OO genotypes, who were considered to be lower MBL producers [24].

### ***Statistical analysis***

Results were analyzed according to *MBL2* genotype, comparing normal homozygous patients (AA) and patients with AO and OO genotype and to determine if there were differences between the two groups in terms of demographic characteristics, underlying disease, infection parameters and mortality. Statistical analysis was performed using a two-tailed  $\chi^2$  test and a Fisher's exact test, Student *t*-test or Mann Whitney, as appropriate in each case. For  $m \times n$  tables, a Fisher's exact test was estimated using the Monte Carlo method. Relative risks (RR) and their 95% confidence intervals (CI) were calculated to analyze the association between genetic variants and polymorphisms and the risk of concomitant infections as dependent



variables (overall and by microorganisms). Multivariate analysis was performed using logistic regression to estimate the association between genetic variants and polymorphisms and the risk of underlying infections adjusted by confusion factors. A regression model was constructed for each type of infection, with infection-related variables being the outcome and the independent variable being the *MBL2* genotypes, adjusted for sex, age, hematologic disease, active pre-transplant hematologic disease. A two-tailed  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Data were analyzed using Stata (SE 10.0, Stata Corporation, College Station, TX) and SPSS (version 19) (SPSS Inc., Chicago, IL) statistical software.

### ***Ethics***

This study was approved by the Ethics Committee of the Autonomous Community of Cantabria, Spain. All patients (>18 years) signed informed consent to participate in the study. For children under 18 years, the parents had to sign informed consent.

## **Results**

### **MBL2 structural variants, promoter polymorphisms and genotypes**

Seventy-two patients were included. Median age at the time of transplantation was 54 years (19–74). During the study period, no patients under 19 years underwent AST. Forty-two (42) patients were men. Patients were divided in two groups according to their *MBL2* genotype: patients homozygous (*AA*) for wild type *MBL2* ( $n = 53$ ) and other patients, *AO/OO* ( $n = 19$ ), which included heterozygous patients (*AO*) ( $n = 16$ ), and homozygous patients (*OO*) ( $n = 3$ ). No statistically significant differences were found in both groups for gender, age, distribution according to different types of hematologic disease or hematologic disease activity at the time of transplantation. Patient characteristics, underlying disease and number of previous lines of treatment are shown in Tables 1 and 2.

**Table 1 Characteristics and MBL genotypes of 72 patients with ASCT**

	<b>AA</b> <i>Patients (%) n = 53</i>	<b>AO/OO</b> <i>Patients (%) n = 19</i>	<b>P-value*</b>
<b>Gender</b>			
<b>Male</b>	30 (56.6)	12 (63.2)	0.62
<b>Female</b>	23 (43.4)	7 (36.8)	
<b>Mean age (SD), years</b>	51.6 (13.9)	50.2 (14.8)	0.70
<b>Underlying disease</b>			0.78
MM	14 (26.4)	6 (31.6)	
HD	8 (15.1)	5 (26.3)	
NHL	22 (41.5)	7 (36.8)	
AMN	7 (13.2)	1 (5.3)	
PL	1 (1.9)	0	
Amyloidosis	1 (1.9)	0	
<b>Active disease**</b>			0.22
YES	11 (20.8)	7 (36.8)	
NO	42 (79.2)	12 (63.2)	

\* *Two-tailed Chi-squared test/Fisher exact test for categorical variables or two-tailed t-test for continuous variables.*

\*\* *Active pre-transplant hematologic disease.*

MM: multiple myeloma, HD: Hodgkin disease, NHL: non Hodgkin lymphoma, AMN: acute myeloid neoplasia, PL: polymphocytic leukemia, ME: multiple sclerosis.

AA genotype: patients homozygous for wild-type structural allele (A).

AO/OO genotype: patients heterozygous or homozygous for the B, C or D alleles.

**Table 2 Number of chemotherapy lines pre-transplant**

	<b>AA</b> <i>Patients (%) n = 53</i>	<b>AO/OO</b> <i>Patients (%) n = 19</i>	<b>P-value*</b>
<b>0</b>	1 (1.9)	0	0.18
<b>1</b>	14 (26.4)	5 (26.3)	
<b>2</b>	26 (49.1)	10 (52.6)	
<b>3</b>	12 (22.6)	2 (10.5)	
<b>4</b>	0	2 (10.5)	
<b>Mean (SD)</b>	1.9 (0.8)	2.1 (0.9)	0.55

\**Two-tailed Fisher's exact test for categorical variables or two-tailed t-test for continuous variables.*

AA genotype: patients homozygous for wild-type structural allele (A).

AO/OO genotype: patients heterozygous or homozygous for the B, C or D alleles.

## Infections

Episodes of infection were recorded from the first day after infusion (day +1) until the sixth month post-transplantation. The average number of episodes of infection per patient was 2 (SD = 1.3) with a minimum of 0 and a maximum of 8 (1 patient). A total of 138 episodes of infection were collected in 69 patients. Three (3) patients had no infections during follow-up

(4.2%). Thirty-one (31) patients (43.1%) had a single episode, 20 (27.8%) had 2 episodes, 11 (15.3%) 3 episodes, 4 (5.6%) 4 episodes, 2 (2.8%) 5 episodes and one patient (1.4%) had 8 episodes of infection.

There were 112 infections in the early period (from day 1 to 30), 17 in the intermediate period (days 31 to 100) and 9 in the late period (day 101 to the end of the study). An average of 1.74 (SD = 1.04) episodes of infection occurred in the wild-type *MBL2* group, and 2.42 (SD = 1.84) in the variant *MBL2* group, with a greater number of infections in the deficient group (at the limit of statistical significance,  $p = 0.051$ ).

Table 3 shows infection characteristics. Sepsis was common (43.1%) and equally distributed between both groups, as was urinary tract infection which occurred at a lower frequency (11.1%) than expected. There was also a low incidence of pneumonia (5.6% of all patients), which occurred more frequently in the *MBL2* variant group, 10.5% versus 3.8%, RR: 2.8 (0.4-18.4),  $p = 0.28$ . Venous catheter infection occurred at a similar rate in both groups; 11.3% versus 10.5%, risk ratio (RR): 0.9 [95% confidence interval (CI) 0.2-4.2,  $p = 1.00$ ].

**Table 3 *MBL2* genotypes and infections in 72 patients with ASCT during the 6 months of follow-up**

	AA Patients (%) <i>n</i> = 53	AO/OO Patients (%) <i>n</i> = 19	RR (95% CI)	<i>P</i> -value*
<b>Types of Infection</b>				
-Pneumonia	2 (3.8)	2 (10.5)	2.8(0.4-18.4)	0.28
-Sepsis	22 (41.5)	9 (47.4)	1.1 (0.6-2.0)	0.66
-VCI	6 (11.3)	2 (10.5)	0.9 (0.2-4.2)	1.00
-UTI	5 (9.4)	3 (15.8)	1.7 (0.4-6.3)	0.43
<b>Major infection</b>	6 (11.3)	5 (26.3)	2.32 (0.80-6.74)	0.15
<b>Gram-positive infections</b>	14 (26.4)	9 (47.4)	1.8 (0.9-3.4)	0.09
- <i>S. epidermidis</i>	9 (17)	7 (36.8)	2.2 (0.9-5.0)	0.11
- <i>S. aureus</i>	1 (1.9)	0 (0)	--	1.00
-Other				
<b>Gram-negative infections</b>	19 (35.8)	6 (31.6)	0.9 (0.4-1.9)	0.74
<b>Viral infections</b>	1 (1.9)	1 (5.3)	2.8 (0.2-42.4)	0.46
-CMV	0 (0)	1 (5.3)	--	0.26
<b>Fungal infections</b>	1 (1.9)	4 (21.1)	11.5 (1.3-93.7)	0.016
- <i>Candida</i>	1(1.9)	2 (10.5)	5.6 (0.5-58.1)	0.17
- <i>Aspergillus</i>	0 (0)	1 (5.3)	--	0.26
- <i>Mucor</i>	0 (0)	1 (5.3)	--	0.26
<b>N° deaths</b>	4 (7.5)	3 (15.8)	2.1 (0.5-8.5)	0.37
<b>Cause of death</b>				
-Infection	0	3	--	0.05
-Progression	3	0	--	
-Unknown (not infection)	1	0	--	

\* *Two-tailed Chi-squared test or Fisher exact test as corresponding.*

RR: risk ratio; CI: confidence interval.

VCI: Venous catheter infection; UTI: Urinary tract infection.

AA genotype: patients homozygous for wild-type structural allele (A).

AO/OO genotype: patients heterozygous or homozygous for the B, C or D alleles.

Fifteen major episodes of infection were recorded: sepsis in 8 patients; pneumonia in 5 patients, including one pulmonary aspergillosis and one *Mucor* pneumonia; and 2 patients with severe diarrheal episodes (one caused by *Clostridium difficile*). A higher incidence of major episodes of infection was observed in the variant *MBL2* group, 26.3% versus 11.3% in the *MBL2* wild-type group: RR = 2.32, (95% CI: 0.80-6.74,  $p = 0.15$ ), although this did not reach statistical significance.

There were 68 microbiologically documented infections (50% of all the infections) in 39 patients. Fifty-six (82.4%) of these infections occurred in the early period, 5 (7.4%) in the intermediate and 7 (10.2%) in the late period. There were 33 infections caused by gram-positive bacteria, 36 caused by gram-negative bacteria, 5 fungal infections and 2 infections caused by virus. Eight were polymicrobial infections.

The average number of microbiologically documented infections was not statistically significant different between both groups, although there was a greater number of infections with microbiological documentation in the variant *MBL2* group: 1.32 (SD = 1.53) versus 0.81 (SD = 0.96  $p = 0.1$ ).

There was a higher average of microbiologically documented episodes of infection in the early period in the variant *MBL2* group (1.90 (SD = 1.2), than in the *MBL2* wild-type (1.37 (SD = 1.2  $p = 0.062$ ), but this did not reach statistical significance.

The average time in days until the first infection after the transplantation day was 7.98 days (SD = 11.34) in the wild-type *MBL2* group and 13 days (SD = 30.73) in the *MBL2* variant group ( $p = 0.32$ ).

Regarding the type of infection, gram-positive bacteria were more frequent in the *MBL2* variant group, 47.4% versus 26.4%, RR = 1.8 (95% CI: 0.9-3.4,  $p = 0.09$ ). There was a greater incidence of infections caused by *Staphylococcus epidermidis* in the *MBL2* variant group, 36.8% versus 17%, RR = 2.2 (95% CI: 0.9-5.0,  $p = 0.11$ ). In the adjusted analysis, the odds ratio (OR) was 4.0 (95% CI: 1.0-16.5,  $p = 0.05$ ), at the limit of statistical significance (Table 4). There was only 1 case of infection by *Staphylococcus aureus*, in the *MBL2* wild-type group.

**Table 4 Association between *MBL2* genotypes and infections: Multivariate analysis**

<b>Outcome variable (patients with infection)</b>	<b>OR* (95% CI) (Effect of <i>MBL2</i> genotypes on risk of infection)</b>	<b><i>p</i>-value</b>
<b><i>Types of infection</i></b>		
-Pneumonia	8.1 (0.4-158.2)	0.17
-Sepsis	0.9 (0.3-3.1)	0.88
-VCI	0.8 (0.1-5.0)	0.77
-UTI	2.3 (0.4-12.8)	0.44
<b><i>Serious infection</i></b>	0.8 (0.1-4.9)	0.79
<b><i>Gram-positive infections</i></b>	2.5 (0.8-7.5)	0.11
- <i>S. epidermidis</i>	4.0 (1.0-16.5)	0.05
<b><i>Gram-negative infections</i></b>	0.7 (0.2-2.4)	0.59
<b><i>Viral infections</i></b>	1.1 (0.01-60.4)	0.96
<b><i>Fungal infections</i></b>	12.9 (1.1-153.9)	0.03

\*Odds Ratio (OR) adjusted by: sex, age, type of hematologic disease, active pre-transplant hematologic disease.

CI: confidence interval.

VCI: Venous catheter infection; UTI: Urinary tract infection.

Most infections caused by gram-positive bacteria occurred in the early period and were more frequent in the variant *MBL2* group (42.1% versus 26.4% in the *MBL2* wild-type group,  $p = 0.2$ ). There were no such infections in the intermediate period and only one in each group in the late period.

The incidence of fungal infections in the variant *MBL2* group (3 *Candida albicans*, 1 *Mucor*, 1 *Aspergillus*) was statistically significantly higher than in the *MBL2* wild-type group (1 *Candida* spp), RR = 11.5 (95% CI: 1.3-93.7,  $p = 0.016$ ), as confirmed in a multivariate analysis (Table 4).

There were no statistically significant differences in the incidence of infection caused by gram-negative bacteria, RR: 0.9 (95% CI: 0.4-1.9,  $p = 0.74$ ), or by virus between both groups, RR: 2.8 (95% CI: 0.2-42.4,  $p = 0.46$ ), although there was a higher incidence of viral infections in the variant *MBL2* group.

More patients died in the variant *MBL2* group than in the wild-type *MBL2* group (15.8% versus 7.5% respectively,  $p = 0.37$ ), although this difference was not statistically significant. However, all deaths in the variant *MBL2* group were related to infection, whereas in the wild-type *MBL2* group, deaths were due to other causes, with a  $p$ -value of 0.05 at the limit of statistical significance (Table 3).

## Discussion

This prospective study focused on comparing the incidence of infection and mortality after ASCT between patients with the wild-type *MBL2* genotype compared to patients carrying a variant *MBL2* genotype. The *MBL2* variant is associated with lower levels of serum MBL, so it may be related with a greater number of infections and/or more serious infections. A multivariate analysis was performed to rule out other factors that could cause a higher

incidence or severity of infection (disease status-response vs. type of hematologic disease, active pre-transplant hematologic disease, sex and age).

The study group was homogeneous, with no differences in age, gender or hematologic disease, and presented similar disease activity at the time of transplantation.

So far, there are few studies describing the incidence of infections in ASCT related to *MBL2* gene variants. Horiuchi et al. [23] in a series of 113 patients treated with high-dose chemotherapy and ASCT, most of whom had hematologic diseases, carried out a study of the incidence of major bacterial infection in patients with low-producing genotypes compared to the wild-type genotype, finding an association between the low-producing genotypes and a highly increased and significant risk of major bacterial infections. The incidence of major bacterial infections (9%) was lower than that observed in the current study (18%). This could be related with the use of prophylactic antimicrobials including ciprofloxacin and fluconazole in all their patients, in contrast to the usual practice in our center.

Mølle *et al.* [24], in a retrospective study compared *MBL2* gene variants with the risk of severe infections in multiple myeloma in patients receiving ASCT after high-dose melphalan. They found that patients homozygous for wild-type *MBL2* had a significantly reduced risk of septicemia compared to patients carrying the variant *MBL2*. In our series, no differences were found in the number of patients with sepsis between the two groups. Although the lack of association between these infections and *MBL2* gene variants could be explained by the sample size, this could also be due to the different underlying diseases: in Mølle's study, all patients were diagnosed with multiple myeloma while our patients had heterogeneous hematologic diseases and therefore could have had a higher risk of infection. They also found more severe infections in patients with variant *MBL2*, although the differences were not statistically significant. Similarly, in our series more severe infections and a greater number of episodes of pneumonia were found in patients with variant *MBL2*.

When the incidence of infections caused by different microorganisms was analyzed, a higher number of infections caused by gram-positive bacteria was found in patients carrying the variant *MBL2* form, and these were mainly staphylococci. In this respect, the incidence of infections caused by *Staphylococcus epidermidis* was greater in the *MBL2* variant group. These findings contrast with the similar number of central venous catheter infections found in both groups. This could mean that the increased number of infections caused by *S. epidermidis* is not only due to catheter infection. ASCT patients carrying the variant *MBL2* genotype, with MBL deficiency, may develop more *S. epidermidis* infections. However, the mechanism for this difference is unclear. A study by Hellemann et al. [27] in critically ill patients admitted to an intensive care, showed an association between the *MBL2* O/O genotype with an increased incidence of gram-positive infections. However, in two different studies by Neth et al. [28] and Shang et al. [29], *S. epidermidis* generally demonstrated low MBL binding activity, which would contradict the hypothesis that MBL plays an important role in infections caused by *S. epidermidis*. One explanation that has been proposed for the diversity between the different studies may rely on the fact that MBL also functions as a scavenger molecule in maintaining internal tissue homeostasis. Apparent MBL associations may be due to disturbances in this scavenger system, rather than a direct anti-infectious effect [30].

In the current study, no differences were found in the incidence of infections caused by gram-negative bacteria in patients with wild-type *MBL2* genotype versus patients carrying a variant

*MBL2* genotype. This is consistent with the studies by Hellemann [27] and Sutherland [31]. There was only one case of viral infection in each group; in the *MBL2* variant group this was caused by CMV, a potentially very serious disease, while the virus in the *MBL2* wild-type group was a reactivation of varicella zoster, which is more common in hematological patients.

Granell et al. [18] showed that MBL pathway dysfunction due to genetically determined deficiencies of MBL influence the outcome of allogenic stem cell transplantation by increasing susceptibility to fungal invasive infections. In patients with ASCT, Horiuchi et al. [23] found that 3 of the 16 patients with major infections who had a pulmonary aspergillosis were homozygous for A, i.e. the normal MBL allele. On the contrary, in our study, 4 patients with fungal infection carried the *MBL2* deficient genotype; 2 had *Aspergillus* and *Mucor* pneumonia (both died as a consequence of their fungal infection); 1 had candidemia; and 1 had disseminated mucocutaneous *Candida* infection. Several studies have been published showing that MBL may play a crucial role in the innate immunity against yeast infections by increasing PMN uptake [32,33].

In our series, the incidence of mortality due to infection was higher in the *MBL2* variant form, and the cause of death in all patients was major infection. These findings are in line with other groups of immunosuppressed patients who had low-producing *MBL2* genotypes [27,34].

## Conclusions

In summary, the results of our study suggest that ASCT patients with the *MBL2* variant gene have increased fungal infections, which would suggest that MBL offers protection against such infections. It would be reasonable to assess whether early antifungal prophylaxis in our ASCT patients with the *MBL2* variant gene could reduce the incidence of such infections. Due to the contradictory results of the previous reports, further studies are needed to clarify whether low-producing *MBL2* genotypes could play a role in gram-positive infections, especially in *S. epidermidis* infections. ASCT patients with *MBL2* variant genotypes are more likely to die as a result of an infection.

## Abbreviations

ASCT, Autologous stem cell transplantation; MBL, Mannose binding lectin; CMV, Cytomegalovirus; RR, Relative risk; CI, Confidence interval; OR, Odds ratio

## Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

AM participated in data collection and manuscript preparation. CF-A participated in the design of the study, performed the statistical analysis and reviewed and revised the manuscript. MP participated in collection of data and manuscript preparation. JGO-V carried out part of the *MBL2* genotyping, and revised the manuscript. PS-V carried out part of the

*MBL2* genotyping and revised the manuscript. JPH participated in the design of the study and reviewed and revised the manuscript. AB participated in collection of data. CM participated in collection of data and manuscript preparation. FS participated in collection of data and manuscript preparation. EC reviewed and revised the manuscript. MCF: participated in the design of the study, data analysis and reviewed and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Authors' information

Drs. Fariñas-Alvarez, Ocejo-Vinyals, Horcajada, Conde and Fariñas share senior authorship in this study.

## Acknowledgements

The authors are in debt with J.D. García-Palomo† (Infectious Diseases Unit, H. Universitario Marques de Valdecilla, Santander, Spain) for his contribution to the study design and data analysis.

This work was supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias [FIS PI04/0492].

## References

1. Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ: **Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia.** *Ann Intern Med* 1966, **64**:328–340.
2. Pizzo PA: **Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia.** *New Engl J Med* 1993, **328**:1323–1332.
3. Schimpff SC: **Empiric antibiotic therapy for granulocytopenic cancer patients.** *Am J Med* 1986, **80**(Suppl. 5C):13–20.
4. Klastersky J: **Febrile neutropenia.** *Curr Opin Oncol* 1993, **5**:625–632.
5. Groeger JS, Lucas AB, Thaler HT, Friedlander-Klar H, Brown AE, Kiehn TE, Armstrong D: **Infectious morbidity associated with long-term use of venous access devices in patients with cancer.** *Ann Intern Med* 1993, **119**:1168–1174.
6. Eisen DP, Minchinton RM: **Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases.** *Clin Infect Dis* 2003, **37**:1496–1505.
7. Sastry K, Herman GA, Day L, Deignan E, Bruns G, Morton CC, Ezekowitz RA: **The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10.** *J Exp Med* 1989, **170**:1175–1189.
8. Lee Bouwman H, Bart Roep O, Roos A: **Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity.** *Hum Immunol* 2006, **67**:247–256.



9. Turner MW: **Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease.** *Immunobiology* 1998, **199**:327–339.
10. Gordon AC, Waheed U, Hansen TK, Hitman GA, Garrad CS, Turner MW, Klein NJ, Brett SJ, Hinds CJ: **Mannose-binding lectin polymorphisms in severe sepsis: relationship to levels, incidence, and outcome.** *Shock* 2006, **25**:88–93.
11. Thiel S, Frederiksen PD, Jensenius JC: **Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency.** *Mol Immunol* 2006, **43**:86–96.
12. Peterslund NA, Koch C, Jensenius JC, Thiel S: **Association between deficiency of mannose binding lectin and severe infections after chemotherapy.** *Lancet* 2001, **358**:637–638.
13. Neth O, Hann I, Turner MW, Klein NJ: **Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study.** *Lancet* 2001, **358**:614–618.
14. Vekemans M, Robinson J, Georgala A, Heymans C, Muanza F, Paesmans M, Klustersky J, Barette M, Meuleman N, Huet F, Calandra T, Costantini S, Ferrant A, Mathissen F, Axelsen M, Marchetti O, Aoun M: **Low mannose-binding lectin concentration is associated with severe infection in patients with hematological cancer who are undergoing chemotherapy.** *Clin Infect Dis* 2007, **44**(12):1593–1601.
15. Osthoff M, Rovó A, Stern M, Danner D, Gratwohl A, Tichelli A, Trendelenburg M: **Mannose-binding lectin levels and major infections in a cohort of very long-term survivors after allogeneic stem cell transplantation.** *Haematologica* 2010, **95**:1389–1396.
16. Chaudhry SH, Chaudhry S, Jansen-Hoogendijk AM, van der Zijde CM J, van Tol MJ, Roos A, Bredius RG: **Mannose-binding lectin levels and infections in children after allogeneic hematopoietic SCT.** *Bone Marrow Transplant* 2010, **45**:289–293.
17. Mullighan CG, Heatley SL, Danner S, Dean MM, Doherty K, Hahn U, Bradstock KF, Minchinton R, Schwarzer AP, Szer J, Bardy PG: **Mannose-binding lectin status is associated with risk of major infection following myeloablative sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Blood* 2008, **112**:2120–2128.
18. Granell M, Urbano-Ispizua A, Suarez B, Rovira M, Fernández-Avilés F, Martínez C, Ortega M, Uriburu C, Gaya A, Roncero JM, Navarro A, Carreras E, Mensa J, Vives J, Rozman C, Montserrat E, Lozano F: **Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation.** *Exp Hematol* 2006, **34**:1435–1441.
19. Kilpatrick DC, Stewart K, Allan EK, McLintock LA, Holyoake TL, Turner ML: **Successful haemopoietic stem cell transplantation does not correct mannan-binding lectin deficiency.** *Bone Marrow Transplant* 2005, **35**:179–181.
20. Mullighan CG, Bardy PG: **Mannose-binding lectin and infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation.** *Leuk Lymphoma* 2004, **45**:247–256.

21. Rocha V, Franco RF, Porcher R, Bittencourt H, Silva WA Jr, Latouche A, Devergie A, Esperou H, Ribaud P, Socie G, Zago MA, Gluckman E: **Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation.** *Blood* 2002, **100**:3908–3018.
22. Mullighan CG, Heatley S, Doherty K, Szabo F, Grigg A, Hughes TP, Schwarer AP, Szer J, Tait BD, Bik To L, Bardy PG: **Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation.** *Blood* 2002, **99**:3524–3529.
23. Horiuchi T, Gondo H, Miyagawa H, Otsuka J, Inaba S, Nagafuji K, Takase K, Tsukamoto H, Koyama T, Mitoma H, Tamimoto Y, Miyagi Y, Tahira T, Hayashi K, Hashimura C, Okamura S, Harada M: **Association of MBL gene polymorphisms with major bacterial infection in patients treated with high-dose chemotherapy and autologous PBSCT.** *Genes Immun* 2005, **6**:162–166.
24. Mølle I, Peterslund NA, Thiel S, Steffensen R: **MBL2 polymorphism and risk of severe infections in multiple myeloma patients receiving high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation.** *Bone Marrow Transplant* 2006, **38**:555–560.
25. **IDSA clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer.** Available from:  
[http://www.idsociety.org/Antimicrobial\\_Agents/#Neutropenic%20Patients%20with%20Cancer](http://www.idsociety.org/Antimicrobial_Agents/#Neutropenic%20Patients%20with%20Cancer)  
(Accessed on 13 February 2013).
26. Razonable RR, Paya CV, Smith TF: **Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:746–752.
27. Hellemann D, Larsson A, Madsen HO, Bonde J, Jarløv JO, Wiis J, Faber T, Wetterslev J, Garred P: **Heterozygosity of mannose-binding lectin (MBL2) genotypes predicts advantage (heterosis) in relation to fatal outcome in intensive care patients.** *Hum Mol Genet* 2007, **16**:3071–3080.
28. Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW: **Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition.** *Infect Immun* 2000, **68**:688–693.
29. Shang SQ, Chen GX, Shen J, Yu XH, Wang KY: **The binding of MBL to common bacteria in infectious diseases of children.** *J Zhejiang Univ SCI B* 2005, **6**:53–56.
30. Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha MR, Madsen HO, Borrias-Essers MC, Ryder LP, Koch C, Garred P: **Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells.** *Eur J Immunol* 2003, **33**:2853–2863.
31. Sutherland AM, Walley KR, Russell JA: **Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults.** *Crit Care Med* 2005, **33**:638–644.

32. van Asbeck EC, Andy IM H, Jelle S, Herpers BL, Jan V: **Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells.** *BMC Microbiol* 2008, **8**:229.
33. van Till JW, Modderman PW, de Boer M, Hart MH, Beld MG, Boermeester MA: **Mannose-binding lectin deficiency facilitates abdominal Candida infections in patients with secondary peritonitis.** *Clin Vaccine Immunol* 2008, **15**(1):65–70.
34. Cervera C, Balderramo D, Suárez B, Prieto J, Fuster F, Linares L, Fuster J, Moreno A, Lozano F, Navasa M: **Donor mannose-binding lectin gene polymorphisms b influence the outcome of liver transplantation.** *Liver Transpl* 2009, **15**(10):1217–1224.

