

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)

Dpto. Daño tisular inmune e Inmunidad Innata

Polimorfismos del gen *CLEC7A* y riesgo de infección fúngica

Memoria del trabajo de investigación para optar al Título de Máster
en Investigación Biomédica presentado por Cristina de Ramón
Sánchez

Tutores: Mariano Sánchez Crespo y María del Carmen Herrero
Sánchez

Valladolid 2016

ABREVIATURAS

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones
PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos
TLR: Receptores toll-like
IL: Interleucina
TNF: Factor de necrosis tumoral
Syc: Tirosin cinasa esplénica
NFkB: Factor nuclear Kb
CARD9: Caspase recruitment domain family member 9
Bcl 10: B-cell lymphoma 10
IFN: Interferon
PTX3: Pentraxina-3
SNP: Single nucleotide polymorphism
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
dNTPs: Dinucleótidos trifosfatados
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN: Ácido ribonucleic
CMN: Células mononucleares
KASP: Kompetitive Allele Specific *PCR*
PBS: Phosphate Buffered Saline
IC: Intervalo de confianza
P: p valor, valor de probabilidad
OR: Odds ratio
TAC: Tomografía axial computerizada
LCR: Líquido cefalorraquídeo

INDICE

- I. INTRODUCCIÓN
 1. Riesgo de infección en pacientes oncohematológicos: micosis invasiva.
 2. Mecanismos de defensa frente a la infección fúngica. El papel central del receptor Dectin-1
 3. Otros receptores de patrones moleculares expresados en hongos.
 4. El sistema de la Pentraxina-3
 5. Posible asociación entre polimorfismo de *Dectin-1* y *Pentraxina-3* con un riesgo aumentado de infecciones fúngicas.

- II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

- III. MATERIAL Y MÉTODOS.
 1. Características clínicas de los pacientes con procesos oncohematológicos
 2. Extracción de ADN y ARN mensajero
 3. Cuantificación de ADN y ARN
 4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
 - 4.1. El sistema KASP de genotipado
 - 4.2. PCR para el estudio de la expresión selectiva de isoformas de dectin-1
 5. Electroforesis en gel de agarosa.
 6. Análisis estadísticos

- IV. RESULTADOS
 1. Características de la población a estudio
 2. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de los genes *CLEC7A* y *Pentraxina-3* en pacientes oncohematológicos
 3. Relación entre la presencia de polimorfismos y la frecuencia de de infecciones
 4. Relación entre la presencia de polimorfismos y la frecuencia de infecciones fúngicas
 5. Asociación entre el polimorfismo rs2078178 de Dectin-1 y la probabilidad de infección
 6. Expresión del receptor en donantes sanos con el polimorfismo rs2078178 de Dectin-1

- V. DISCUSIÓN

- VI. CONCLUSIONES

- VII. BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

1. Riesgo de infección en pacientes oncohematológicos: micosis invasiva.

Los pacientes con enfermedades oncohematológicas tienen mayor riesgo de padecer infecciones fúngicas que la población general debido a la inmunosupresión producida por la propia enfermedad y a los efectos indeseables de los tratamientos que reciben. Esta combinación de factores de riesgo implica altas tasas de comorbilidad y mortalidad por lo que sería necesario establecer estrategias de prevención estandarizadas y fundamentadas en estudios con evidencia científica.

Las infecciones fúngicas más frecuentes son las producidas por *Aspergillus* en el caso de los pacientes sometidos a trasplante de médula y por *Candida* en situaciones más convencionales, aunque infecciones por *Cryptococcus* y *Pneumocystis jiroveci* no son inusuales.

Los factores de riesgo para el desarrollo de infecciones fúngicas descritos incluyen:

- neutropenia $< 500 \times 10^9/L$ durante un periodo de al menos 10 días consecutivos;
- fiebre persistente de más de 72 - 96 horas de evolución refractaria a antibióticos de amplio espectro en pacientes de alto riesgo;
- temperatura superior a 38°C o inferior a 36°C y alguno de los factores predisponentes:
 - o neutropenia >10 días en los 60 días anteriores,
 - o uso de inmunosupresores en los últimos 30 días,
 - o infección fúngica invasora (probada o probable) durante un episodio neutropénico previo,
 - o coexistencia de SIDA sintomático;
- signos y síntomas de enfermedad injerto contra huésped severa (grado 2 o más) o enfermedad extensa crónica,
- uso prolongado durante al menos 3 semanas de corticoesteroides en los 60 días previos.

La *European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections* (EORTC) y el *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) han elaborado un documento de consenso para clasificar las infecciones fúngicas invasivas en pacientes oncológicos, basadas en una serie de criterios clínicos, radiológicos, microbiológicos e histológicos.

Los criterios clínicos se describen según la localización de la siguiente forma:

1. *Infección de vías respiratorias inferiores.*
 - a. *Criterios mayores: cualquiera de los siguientes hallazgos del TAC: signo del halo, signo del aire creciente (de media luna) o cavitación sin área de consolidación (excluyendo Mycobacterium, Legionella o Nocardia).*
 - b. *Criterios menores: Síntomas (tos, dolor torácico, hemoptisis, disnea), roce pleural, nueva infiltración o derrame pleural.*
2. *Infección rinosinusal.*
 - a. *Criterios mayores: evidencia radiológica de invasión como erosión, extensión por contigüidad o destrucción de la base del cráneo.*

- b. *Criterios menores: síntomas (rinorrea, congestión), ulceración de la mucosa nasal o epistaxis, tumefacción periorbitaria, dolor maxilar, lesiones necróticas o perforación del paladar duro.*
3. *Infección del sistema nervioso central.*
- a. *Criterios mayores: evidencia radiológica: mastoiditis u otros focos parameningeos, empiema extradural, lesión sólida en parénquima cerebral o médula espinal).*
- b. *Criterios menores: síntomas y signos neurológicos focales (crisis focales, hemiparesia y paresia de nervios craneales), irritación meníngea, anomalías en la bioquímica del LCR (siempre que los cultivos o hallazgos microscópicos sean negativos para otros patógenos y células malignas).*
4. *Infección fúngica diseminada: lesiones cutáneas papulares o nodulares, hallazgos intraoculares sugestivos de coriorretinitis o endoftalmitis hematógena.*

Los criterios microbiológicos se describen según la localización, el tipo de muestra y el análisis de la misma.

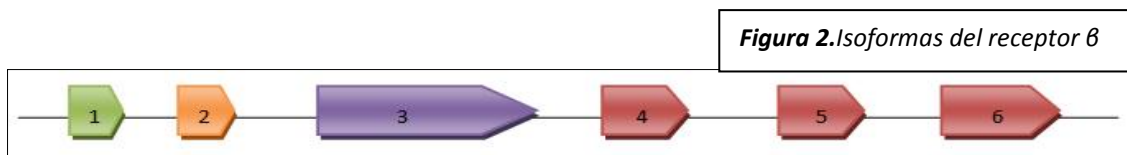
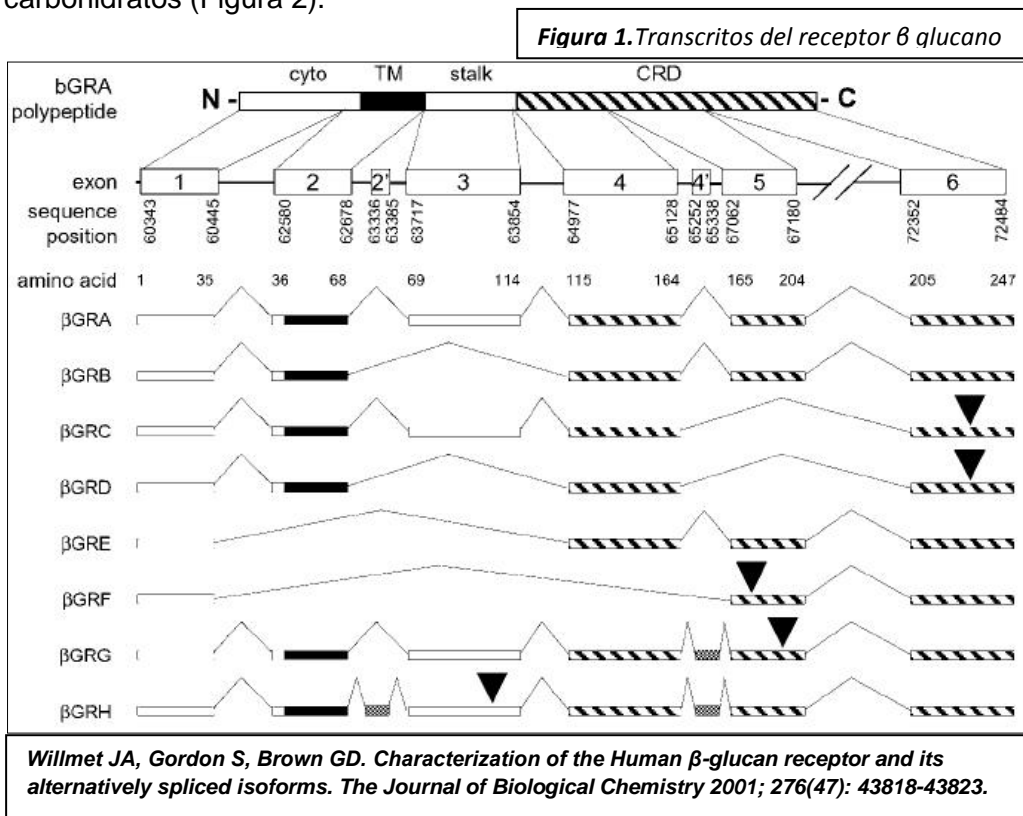
- *Cultivo positivo para Aspergillus a partir de esputo o lavado broncoalveolar.*
- *Cultivo positivo o citología o microscopia directa positiva para Aspergillus de aspirado sinusal, esputo o lavado broncoalveolar.*
- *Antígeno de Aspergillus positivo en muestras de lavado broncoalveolar, LCR, o dos o más muestras de sangre.*
- *Citología o microscopia directa positiva para Aspergillus en muestras habitualmente estériles.*

Habiendo establecido los criterios clínicos y microbiológicos, a continuación se detalla la clasificación de las infecciones fúngicas invasivas que propone 3 niveles de probabilidad: probada, probable y posible. Estos criterios se elaboraron para su uso en investigación clínica/epidemiológica, pero no para establecer decisiones terapéuticas.

- **INFECCIÓN PROBADA por *Aspergillus*:**
 - o La presencia histo/citopatológica de hifas tabicadas procedentes de aspiración con aguja o biopsia con evidencia (microscópica o por imagen) de daño tisular asociado.
 - o Cultivo positivo de *Aspergillus spp.* Procedente de una muestra de una localización habitualmente estéril donde existen datos clínicos o radiológicos compatibles (excluyendo orina y mucosas).
- **INFECCIÓN PROBABLE por *Aspergillus*:**
 - o Deben cumplirse al menos:
 - un criterio de la sección factores del huésped
 - un criterio microbiológico
 - un criterio clínico mayor o 2 criterios menores compatibles con infección.
- **INFECCIÓN POSIBLE por *Aspergillus*:**
 - o Deben cumplirse al menos:
 - Un criterio de la sección factores del huésped
 - Un criterio microbiológico o un criterio clínico mayor/2 criterios clínicos menores compatibles con infección.

2. Mecanismos de defensa frente a la infección fúngica. El papel central del receptor Dectin-1

Dectin-1 es un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) que se expresa, fundamentalmente, en células mieloides como monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. Está codificado por el gen *CLEC7A*, también llamado *BGR*, *CD369*, *SCARE2* y *CLECSF12*, que se localiza en el cromosoma 12p13. En humanos, el gen *CLEC7A* consta de 6 exones, y en el proceso de transcripción a ARN puede sufrir splicing alternativo y dar lugar a diferentes isoformas. En 2001, JA Willmet describió 8 isoformas: A, B, C, D, E, F, G y H, que se diferencian entre ellas en el número de exones que presentan (Figura 1). Cada uno de estos exones codifica para una región concreta del receptor de tal forma que el primer exón y parte del segundo codifican el dominio intracelular, el segundo exón codifica el dominio transmembrana, el exón tercero el tallo y los tres exones restantes el dominio extracelular de unión a carbohidratos (Figura 2).



Dectin-1 es una proteína transmembrana glicosilada tipo II que consta de: i) una región extracelular que contiene el dominio de reconocimiento de carbohidratos (en rojo) y el tallo de unión (en lila), ii) una región transmembrana (en naranja), y iii) una región intracitoplasmática (en verde) que contiene un dominio ITAM (Figura 3). Dectin-1 reconoce los β -glucanos que forman parte de la pared de plantas y hongos, preferentemente, pero también de algunas bacterias como las micobacterias (Tsoni et al., 2008).

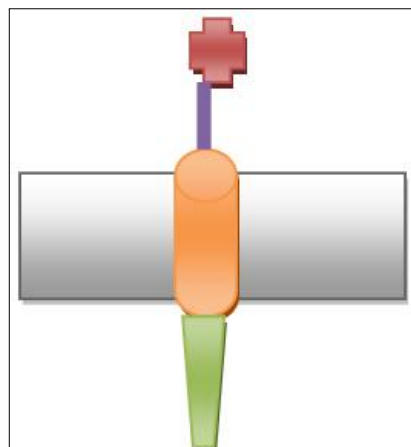
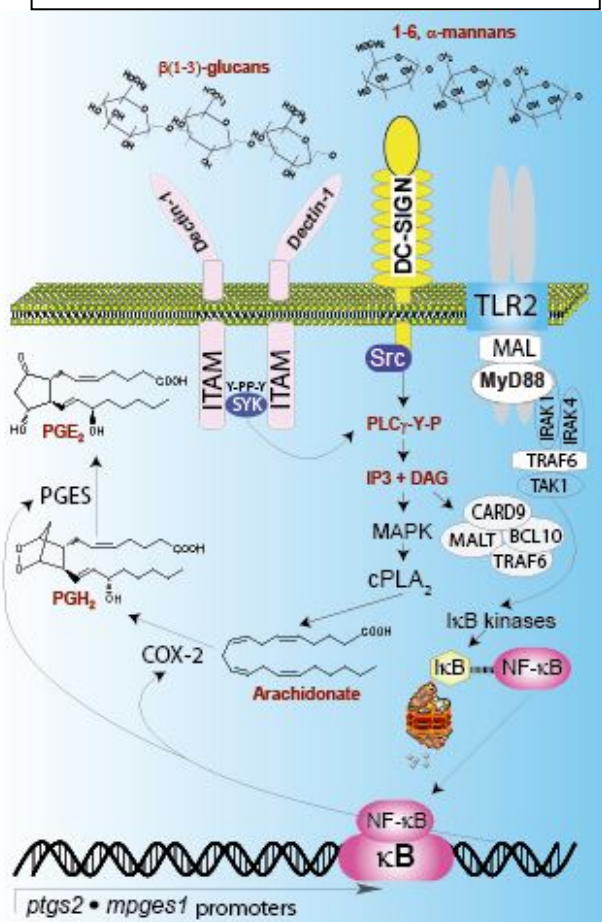


Figura 3. Estructura de Dectin-1

Este reconocimiento de los patrones fúngicos activa varias vías de señalización y desencadena diversas respuestas celulares como la maduración de células dendríticas, la fagocitosis, la producción de metabolitos del ácido araquidónico y la expresión de numerosas citocinas como $\text{TNF}\alpha$, CXCL2, IL-23, IL-6 o IL-10.

Figura 4. Señalización de Dectin-1



La señalización desencadenada por el receptor Dectin-1 comienza con la fosforilación del dominio ITAM citosólico por una quinasa de la familia Src que, a su vez, promueve la activación de la quinasa Syk. Posteriormente se produce la activación de fosfolipasas $\text{C}\gamma$, que conduce a la generación de diacilglicerol, la activación de la proteína quinasa C y la cascada de MAP quinasas mediante una serie de reacciones sucesivas de fosforilación. Por otra parte, también activa CARD9, que regula al factor de transcripción NF- κ B, que a su vez regula la transcripción de numerosas citocinas, fundamentalmente las relacionadas con las respuestas inmunes de tipo Th1 y Th17 (Figura 4).

La activación de Dectin-1 también induce la producción de IL-1 β a través de la vía CARD9-Bcl10-MALT y la formación del complejo caspasa 8-MALT1-ASC que activa la caspasa 8 implicada en la maduración de la pro-IL-1 β . Se ha descrito también la activación de caspasa 1 en estas condiciones (Uchiyama et al., 2015).

Dectin-1 coopera funcionalmente con otros receptores acoplados a MyD88 como TLR-2/4/5/7/9 (Reid et al., 2009), lo que contribuye a la aparición de un patrón característico de expresión de citocinas en el que destacan la elevada producción de TNF α , IL-10, IL-6 e IL-23, y la escasa producción de IL-12 p70 (Dennehy et al., 2008).

3. Otros receptores de patrones moleculares expresados en hongos

Como se ha mencionado previamente, los receptores TLR2 colaboran con Dectin-1 en el reconocimiento y posterior desarrollo de la respuesta inflamatoria. TLR4 reconoce los mananos de la pared fúngica, y los heterodímeros TLR1/TLR2 y TLR6/TLR2 reconocen fosfolipomananos (Jouault et al., 2003).

Tras la identificación de los patrones fúngicos, se desencadena una respuesta inmune de tipo Th1 asociada con la producción de IFN γ y, en el caso particular de infección por *Candida albicans*, la respuesta termina con la polarización al tipo Th17 caracterizada por la elevada producción de IL-17 e IL-23.

En las infecciones bacterianas los lipopolisacáridos y las lipoproteínas bacterianas son reconocidas fundamentalmente por receptores TLR, pero estudios más recientes han revelado la participación de Dectin-1, aunque no se conocen los mecanismos a través de los cuales se canaliza su papel defensivo (Gantner et al., 2002).

4. El sistema de la Pentraxina-3

La familia de las pentraxinas se caracterizan por su estructura multimérica cíclica, en la que se pueden distinguir dos grupos principales: i) las pentraxinas de cadena corta que son reactantes de fase aguda liberados por el hígado durante la respuesta inflamatoria, a cuyo grupo pertenece la proteína C reactiva y ii) las pentraxinas largas entre las que se incluye la pentraxina-3 (PTX3).

El gen que codifica para la PTX3, denominado *PTX3*, se localiza en el cromosoma 3q25 y consta de 3 exones. PTX3 se comporta como un receptor soluble que se une selectivamente a agentes microbianos que contienen galactomananos. De esta forma, se produce la opsonización de la partícula, como es el caso de la interacción con *Aspergillus* en su fase de conidia (Moalli et al, 2011). Asimismo favorece la fagocitosis y contribuye a la destrucción de los patógenos fúngicos.

En modelos murinos, se ha observado que la deficiencia de PTX3 altera el reconocimiento de las conidias de *Aspergillus* por los macrófagos alveolares y las células dendríticas y se asocia con desarrollo de una respuesta inmune tipo Th2, ineficaz para la resolución de la infección fúngica (Garlanda et al, 2002).

5. Posible asociación entre polimorfismos de *Dectin-1* y *Pentraxina-3* con un riesgo aumentado de infecciones fúngicas.

Como se ha descrito previamente, el reconocimiento precoz de los hongo por el sistema inmune innato a través de los receptores de lectina tipo C es fundamental para conseguir la activación del sistema inmune y eliminación del patógeno.

Varios estudios clínicos han asociado algunos polimorfismos con un riesgo aumentado de infección fúngica. Es el caso de ciertos polimorfismos de *Dectin-1* relacionados con candidiasis sistémica y orofaríngea (Plantiga 2009), candidiasis vulvovaginal (Rosentul et al., 2014), queratitis fúngica (Qu et al., 2015) y aspergilosis pulmonar invasiva (Sainz et al., 2012).

En otros estudios se han relacionado algunos polimorfismos de *Dectin-1* con mayor riesgo de infecciones paratuberculosas en ganado bovino mediante su cooperación con TLR2 (Pant, 2014); o de tuberculosis mediado por la disminución de TNF α , IL10 y especies reactivas de oxígeno (ROS) que disminuyen la capacidad macrofágica frente a las micobacterias (Bucala, 2013). Por otra parte, en pacientes VIH-positivos se ha asociado la presencia de un polimorfismos de *Dectin-1* con mayor riesgo de infección respiratoria bacteriana, aunque no se conoce su mecanismo (Netea, 2011).

Los polimorfismos de un solo nucleótido, generalmente conocidos por el acrónimo SNP (*single nucleotide polymorfism*) son variantes genéticas detectadas en los estudios poblacionales que pueden ser funcionales e influir en la fisiopatogenia de diferentes enfermedades. Los SNPs funcionales se clasifican en: i) reguladores, localizados en las regiones promotoras de los genes, ii) estructurales, localizados en las regiones intrónicas y exónicas de los ARN mensajeros y iii) codificantes, localizados en los exones y que pueden afectar a la estructura y función de la proteína.

De acuerdo con esta interpretación, los polimorfismos que afectan a la codificación de *Dectin-1* y a su expresión, pueden influir en el mecanismo de reconocimiento de las partículas fúngicas por parte de las células del sistema inmune. Por lo que esto supone una mayor susceptibilidad a padecer infecciones fúngicas en situaciones de riesgo de invasión por gérmenes oportunistas. Así, el SNP rs16910526 se relaciona en algunos estudios con mayor riesgo de infecciones por hongos, para lo cual existe una explicación molecular. El cambio de nucleótido genera un codón STOP que da lugar a la codificación de una proteína *Dectin-1* truncada que posee una escasa funcionalidad para el reconocimiento de microorganismos. Por otro lado, los SNPs de *Dectin1* rs2078178 y rs16910631 se han asociado con enfermedad inflamatoria intestinal. En cambio, no se ha estudiado su relación con infecciones fúngicas ni se conoce el mecanismo por el que estos polimorfismos intrónicos puedan afectar a la funcionalidad de *Dectin-1*.

Los SNPs de *PTX3* rs3816527, rs2305619 y rs1840680 se han asociado también con riesgo de aspergilosis. Sin embargo, no se ha realizado un estudio comparativo del riesgo asociado a polimorfismos de *Dectin-1*, frente a los polimorfismos de *PTX3*.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS: Los pacientes portadores de polimorfismos de Dectin-1 y Pentraxina-3 pueden tener alteraciones en el reconocimiento de hongos y en la respuesta inmune que podría incrementar en forma significativa el riesgo de infecciones fúngicas.

OBJETIVO PRINCIPAL: Determinar si la presencia de algún polimorfismo en el gen *CLEC7A* o en el gen *PTX-3* se correlaciona con mayor riesgo de desarrollar infecciones fúngicas en pacientes oncohematológicos.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- **OBJETIVO 1:** Establecer la posible relación entre la presencia de polimorfismos de Dectin-1 y PTX-3 y un mayor riesgo de infecciones bacterianas y víricas, además del riesgo implícito de infección fúngica.
- **OBJETIVO 2:** Comprobar si la presencia de polimorfismos intrónicos de Dectin-1 se correlacionan con patrones de *splicing* alternativo que afecten a la expresión de isoformas de Dectin-1 que carezcan de segmentos en el dominio de reconocimiento de carbohidratos y por lo tanto, muestren una disminución de su funcionalidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Características clínicas de los pacientes con procesos oncohematológicos

Respecto al objetivo principal y al objetivo 1, la población de estudio incluye 151 pacientes hematológicos con enfermedades de alto riesgo como leucemias agudas mieloblásticas y linfoblásticas, linfomas no Hodgkin de alto grado y mielomas múltiples. Todos los pacientes habían recibido altas dosis de quimioterapia, uso prolongado de corticoides o trasplante de progenitores hematopoyéticos, por lo que eran candidatos con alto riesgo de desarrollo de infecciones por gérmenes oportunistas.

Se trata de una población homogénea de raza caucásica y residente en Castilla y León reclutada desde enero de 2013 a julio de 2016 del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y del Hospital Río Hortega de Valladolid. De cada paciente se obtuvo 5ml de sangre periférica en tubos con anticoagulante tipo EDTA.

Respecto al objetivo 2, la población de estudio se corresponde a 27 muestras de concentrado leuco-plaquetaria de donantes sanos procedentes del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León.

En ambos casos, las muestras de estudio se obtuvieron tras la solicitud, firma y aceptación por parte de los individuos implicados de un consentimiento informado estricto para su utilización en investigación, tal y como estipula la declaración de Helsinki. Además se garantizó la protección de datos a lo largo de todo el proceso.

2. Extracción de ADN Y ARN mensajero (ARNm).

Para el estudio de los polimorfismos, se extrajo el ADN genómico a partir de 400µl de sangre periférica de los pacientes oncohematológicos; o bien a partir de 400µl del concentrado leucoplaquetario de los donantes sanos. Para ello se utilizó el dispositivo MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche; Mannheim, Alemania) que permite el aislamiento de ácidos nucleicos de ADN o ARN de alta pureza, mediante el uso de partículas magnéticas (Figura 5). Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C hasta su valoración y estudio (Figura 5).



Figura 5. MagNa Pure Compact

Para los estudios de expresión de las distintas isoformas que codifica el gen *CLEC7A*, se aisló el ARNm de las muestras de donantes sanos. A partir del concentrado leuco-plaquetario diluido 1:2 en Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X, se obtuvo la interfase de células mononucleares (CMNs) mediante centrifugación (1900

rpm durante 30 minutos) en gradiente de densidad con Ficoll-Paque™ PLUS (densidad máxima: 1.078 g/ml) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).

De esta manera, se obtiene el siguiente resultado (Figura 6):

- 1) Plasma.
- 2) Capa de células mononucleares (monocitos y linfocitos). Puede haber hasta un 5% de polimorfonucleares.
- 3) Ficoll.
- 4) Hematíes, plaquetas y resto de polimorfonucleares.

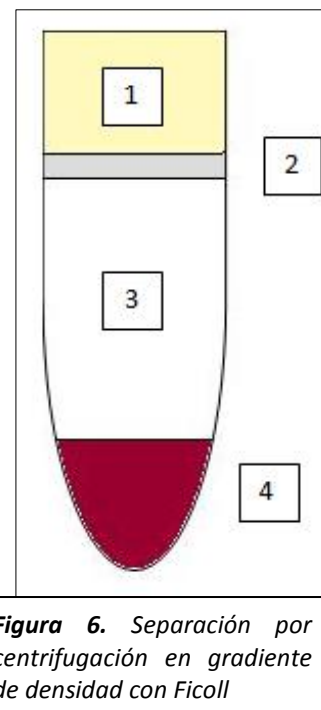


Figura 6. Separación por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll

Las CMNs se recogieron y lavaron 2 veces con PBS 1X, centrifugando a 1200 rpm durante 10 minutos. A continuación, el ARNm se extrajo mediante la técnica de purificación de ARN con TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific), que consta de los siguientes pasos:

1. Homogeneización: El pellet de CMNs se resuspende en 1 ml de reactivo de Trizol. En este paso se puede interrumpir el proceso y conservar la muestra a -80°C.
2. Separación: A la muestra del paso anterior se añaden 200 µl de cloroformo y se agita durante 15-25 segundos para posteriormente incubar 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra se centrifuga a 12.000 xg durante 15 minutos a 4°C, lo que permite la separación en 3 fases: i) fase inferior, correspondiente a las proteínas, ii) fase intermedia, correspondiente a ADN genómico y iii) fase superior acuosa, donde se obtiene el ARNm.
3. Precipitación: Se recoge la parte superior acuosa y se añaden 500 µl de isopropanol para que precipite el ARNm. Se mezcla vigorosamente, y tras incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C para que precipite el ARNm.
4. Lavado: Se retira el sobrenadante y se procede a lavar el pellet de ARNm con 1 ml de etanol al 75% en agua ultrapura MiliQ libre de RNAsas. Se realizan dos lavados a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C y finalmente se procede al secado del pellet de ARNm a temperatura ambiente.
5. Disolución: Se añaden 15-25 µl de agua ultrapura MiliQ libre de RNAsas y se pipetea suavemente para disolver el ARN. Posteriormente se deja en hielo para valorarlo, o se congela a -80°C para conservarlo hasta su medición.

3. Cuantificación de ADN y ARN

La cuantificación de ADN y ARNm se realizó por espectrofotometría mediante el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo scientific), que permite calcular con alta precisión concentraciones de ADN de doble cadena o cadena sencilla, ARN y proteínas en muestras de pequeño volumen (entre 2 y 5 μl) (Figura 7).

Con este fin, se aplica 1.5-2 μl de la muestra entre ambos sensores ópticos, sobre la que se hace incidir un haz de luz que la atraviesa, de forma que se cuantifica la luz emitida tras pasar por la muestra. Es un requisito indispensable limpiar los sensores al inicio y fin del proceso, y entre las distintas medidas.

El espectrofotómetro es capaz de medir la absorbancia de los puentes de hidrógeno de los ácidos nucleicos (260 nm) y de las proteínas (280 nm). El programa de ADN o ARNm calcula el cociente de absorbancias 260/280, cuyo valor debe ser superior a 0.8, siendo óptimo entre 1,8 y 2. A partir de estos datos, se obtiene la concentración de ADN o ARNm expresada en ng/ μl .



Figura 7. Espectrofotómetro Nanodrop.

4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.1 Sistema KASP de genotipado

Para la descripción de polimorfismos de Dectin-1 y de PTX-3 se emplearon 4ng de ADN genómico, bien de los pacientes oncohematológicos o bien de los donantes sanos. Se utilizó el sistema KASP (*Kompetitive Allele Specific PCR*) *SNP Genotyping Chemistry*, el cual está basado en la tecnología FRET (Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente) que consiste en transferir energía desde un donador o reportero (sonda marcada con fluorocromos) a un aceptor o a un *quencher* mediante hibridación. Permite la discriminación alélica o la detección de variantes genéticas que afecten a un único nucleótido (SNP) con tan solo 0,1 a 10 ng de ADN genómico.

Es una PCR que utiliza un cebador universal (Reverse) y dos cebadores específicos (Forward) que se diferencian solo en un nucleótido que corresponderán a cada uno de los alelos del polimorfismo a estudiar. Este sistema utiliza una sonda marcada con los fluorocromos HEX (emite a 556 nm) o FAM (emite a 510 nm) que tiene una secuencia similar a la encontrada en los extremos 5' de los cebadores, y que está unida a un *quencher* que solo permitirá la emisión de fluorescencia por parte de los fluorocromos cuando el cebador este unido a su secuencia específica. A continuación se describen los diferentes ciclos que tienen lugar para la amplificación de nuestra secuencia de interés:

- En el primer ciclo: Se desnaturaliza la doble hebra de ADN a 94°C. Una vez separadas las dos hebras a 55-61°C, se produce la unión de uno de los cebadores específicos al alelo correspondiente del polimorfismo en la cadena complementaria de ADN, y en la otra cadena se une el cebador reverso. Posteriormente se produce la amplificación de esa región por la polimerasa a 57°C (Figura 8).

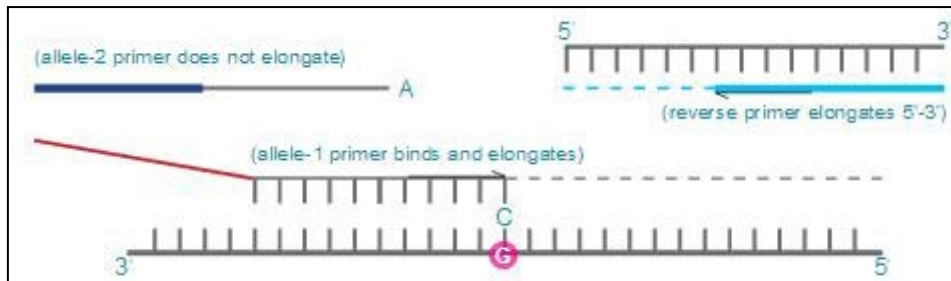


Figura 8. Primer ciclo de PCR.

- En el segundo ciclo: se desnaturaliza de nuevo la doble hebra de ADN a 94°C. Tras la separación de ambas hebras, a 55-61°C se une el cebador reverso a la cola del segmento amplificado en el ciclo 1, y se produce la amplificación. La región amplificada obtenida es complementaria a la sonda marcada (Figura 9).

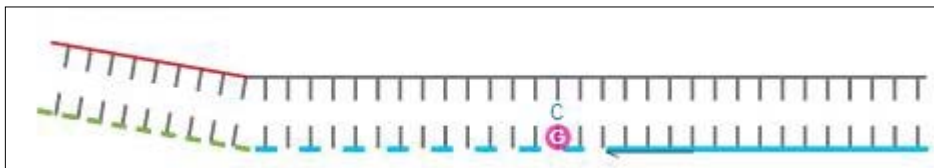


Figura 9. Segundo ciclo de PCR.

- En el tercer ciclo: se produce la desnaturalización de la doble hebra de ADN a 94°C como en todos los ciclos. La sonda marcada se separa del quencher para unirse a la región amplificada en el ciclo 2 de la que es complementaria; de forma que queda la otra sonda marcada correspondiente al otro alelo unido al quencher y no emite luz (Figura 10).

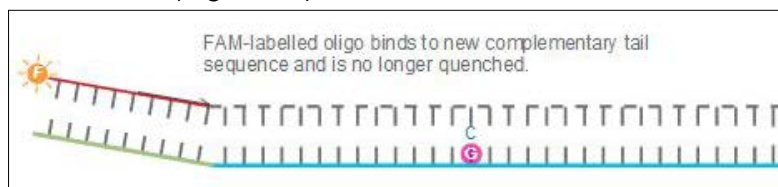
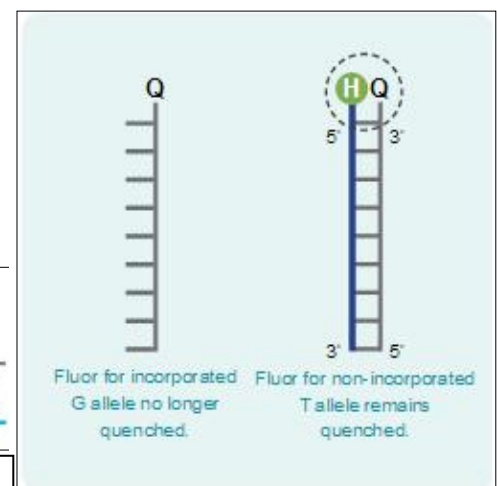


Figura 10. Tercer ciclo de PCR.



- Ciclos 4 a 36: en estos ciclos se producirá la amplificación sucesiva de la región unida a la sonda marcada con el fluorocromo. Así se irá acumulando fluorescencia a lo largo de los ciclos y al final se determinará el polimorfismo que presenta el paciente.

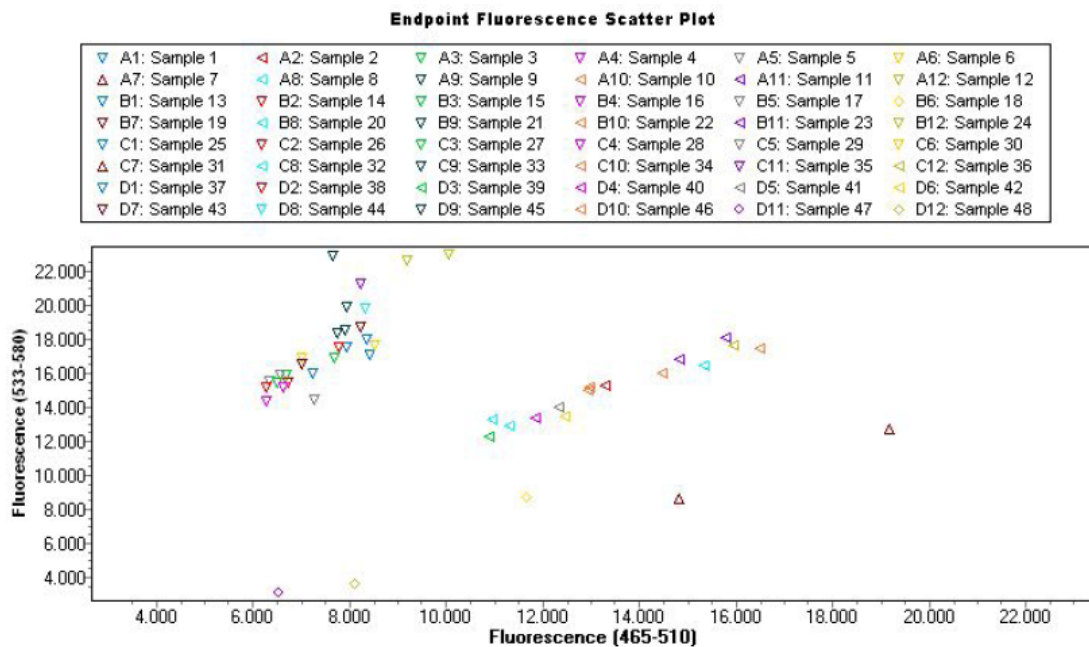
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	RS		RS		RS		RS		RS		RS	
C												
D	1691 0526		1691 0631		2078 178		2305 619		3816 527		1840 680	
E												
F												
G												
H												

Tabla 1. Colocación de muestras para PCR en placas de 96 pocillos

La lectura de resultados se realiza mediante un dispositivo denominado termociclador LightCycler 480 que nos permitirá medir la absorbancia de cada muestra para cada polimorfismo con el fin de determinar los diferentes alelos.

Los resultados quedan reflejados en una gráfica limitada por 2 ejes: x, que corresponde a la fluorescencia emitida por FAM; e y, que corresponde a la fluorescencia emitida por HEX (Figura 11). De manera que:

- Las muestras homocigotas para el polimorfismo a estudiar: presentan 2 cromosomas homólogos que dan lugar a amplicones que se localizarán en uno de los dos ejes.
- Las muestras heterocigotas para el polimorfismo a estudiar: presentan 2 cromosomas heterólogos (cada uno con un nucleótido diferente), por lo que los amplicones se localizarán en torno a una recta que se dispone entre los dos ejes.



Endpoint Genotyping for rs2078178 (1) (Endpoint Genotyping)

Settings

Filter Comb.	Allele X: FAM (465-510) / Allele Y: HEX / Yellow555 (533-580)
Color Com.	Off

Figura 11. Resultados de la PCR POR Light Cycler

4.2 PCR para el estudio de la expresión selectiva de isoformas de Dectin-1

- **Transcripción reversa:** A partir de 3ng/ml de ARNm de las CMNs de los donantes sanos evaluados, se realizó la transcripción reversa. Para ello se utilizó la transcriptasa reversa del virus Moloney de leucemia, M-MLV Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific) que es una ADN polimerasa recombinante que permite la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARNm. Además, de la polimerasa se empleó: desoxirribonucleótidos trifosfatados (dnTPs: adenina, timina, citosina y guanina), DTT (sustancias reductoras para eliminar entrecruzamiento entre moléculas) y Buffer o solución amortiguadora 5x (Tris-HCl, KCl, MgCl), N6 (hexanucleótidos) 300 ng/ml y RNasin® Ribonuclease inhibitors (Promega). Posteriormente se puede proceder directamente a realizar la PCR o posponerlo en el tiempo. En el último caso, se congela la mezcla a -20°C.
- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Mediante PCR convencional y a partir del ADNc obtenido en la transcripción reversa, se amplificaron los transcritos entre el cebador Forward/Sense presente en el exón 1 y el cebador Reverse/Antisense presente en el exón 6 del gen *CLEC7A*.
 - o Primer Forward/Sense: 5´- GGGCTCTCAAGAACAATGGA -3´
 - o Primer Reverse/AntiSense para el exón 6: 5´- TTGGAGATGGGTTTTCTTGG -3

Para la amplificación del ADNc, además de los cebadores, se utilizó: dnTPs, la polimerasa TagMAN, DTT, Buffer o solución amortiguadora 10X (Tris-HCl, KCl, MgCl) y agua ultrapura MilliQ libre de nucleasas.

La mezcla de todo ello se introdujo en un termociclador y se inició la PCR con un total de 25 ciclos, cada uno de los cuales consta de tres etapas:

- o Desnaturalización: separación de las cadenas de c DNA a 95°C durante 30 segundos.
- o Hibridación: los cebadores se alinean al extremo 3´e hibridan con la secuencia complementaria, a 65°C durante 30 segundos.
- o Extensión: la enzima Taq polimerasa actúa sobre el complejo cebador-secuencia añadiendo nucleótidos en sentido 5´→ 3´, a 72°C durante 10 segundos.

Al final de cada ciclo se obtuvieron amplicones de la región que deseábamos amplificar, que se iban acumulando a lo largo de los ciclos.

5. Electroforesis en gel de agarosa.

El análisis de los transcritos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Debido al tamaño esperado de los productos amplificados (>300 pares de bases), las muestras fueron separadas en geles de agarosa al 1,5% en un tampón TAE 1X (solución de Tris, acetato y EDTA) teñido con Gel Red Nucleic Acid Gel Stain® (Biotium) en una proporción 1/1000, que nos permitirá la visualización del ADN bajo luz ultravioleta y tampón de carga. Cada una de las muestras amplificadas se

diluyó 1:2 en agua ultrapura MilliQ y, posteriormente, se resuspendieron en tampón de carga 6X en una proporción 1/6 (tampón/muestra diluida). Finalmente se aplicó un voltaje de 100V para la migración y separación de las muestras.

Tras la electroforesis, se visualizaron los fragmentos de ADNc mediante luz ultravioleta en el transiluminador CHEMI-DOC MP de Bio-Rad. A continuación imprimimos la imagen, a partir de la cual analizamos las bandas obtenidas dispuestas según el peso molecular de cada transcrito representado. De esta forma, conociendo el peso molecular de las diferentes isoformas del receptor Dectin-1, pudimos comparar de forma cualitativa las diferentes distribuciones de las isoformas según el genotipo de cada muestra.

6. Análisis estadísticos.

Se realizó un estudio descriptivo de las variables, que son en su totalidad cualitativas y se expresan como valores absolutos, proporción y porcentaje.

Previo al estudio de relación entre los polimorfismos y el riesgo de infección, se comprobó si todos los SNPs se encontraban en Equilibrio de Hardy-Weinberg para cada grupo de riesgo estudiado. El test de equilibrio de Hardy-Weinberg es un modelo teórico para valorar la genética de poblaciones. Analiza las frecuencias genotípicas en una población que cumple las siguientes características: i) compuesta de organismos diploides con reproducción sexual en la que todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar, ii) la población es suficientemente grande para minimizar las diferencias entre individuos y las migraciones y mutaciones pueden despreciarse, iii) la selección natural no afecta al gen de estudio, iv) las frecuencias genotípicas se mantienen constantes a lo largo de las generaciones.

Las variables categóricas se compararon con tablas de contingencia utilizando el test de Chi cuadrado (comparación de grupos) con el fin de calcular la posible relación entre los polimorfismos estudiados y el riesgo de padecer infecciones mediante el software estadístico SPSS versión 22 (*Statistical Package for Social Sciences*, Inc., Chicago, IL.). En los casos en los que el número de muestra es inferior a 5 se utilizaría el test de Fisher. En los casos en los que se demuestra que hay una relación de dependencia se realiza un estudio de asociación (Odds Ratio, OR) con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

RESULTADOS

1. Características de la población a estudio

De los 151 pacientes estudiados, 54 correspondían a muestras de pacientes del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y las 97 restantes eran del Hospital Río Hortega de Valladolid. La media de edad de los pacientes seleccionados era de 61 años, con un límite inferior de 5 y superior de 92 años. El 58% eran de sexo masculino y el 42% femenino. De todos los pacientes, el 36,4% había fallecido al finalizar el estudio, frente al 57,6% que seguían vivos, y del 6% restante no teníamos datos al respecto.

Los individuos incluidos presentaban enfermedades oncohematológicas de alto riesgo, en su mayoría leucemias agudas mieloblásticas o linfoblásticas (41,06%), síndromes linfoproliferativos (35,10%), mielomas múltiples (9,27%) y síndromes mielodisplásicos (8,61%).

Un 24,5% fueron sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos, de los cuales el 45,9% era alogénico y el 54,1% autólogo. A pesar de ello, todos los pacientes se consideraron de alto riesgo por haber recibido protocolos de quimioterapia intensiva y/o corticoides a altas dosis. Además, todos presentaron episodios de neutropenia severa al menos durante 15 días.

El porcentaje de infecciones de cualquier tipo entre los individuos de nuestra población ascendía al 75%. Las infecciones más frecuentes fueron las bacterianas (62,3%), seguidas de las fúngicas (41,1%) y por último las víricas (6,6%). Se contabilizaron un total de 201 infecciones bacterianas, siendo las más frecuentes las producidas por bacterias Gram negativas (102/201) dentro de las cuales destacaban *Escherichia coli* (39/201) y *Pseudomona aeruginosa* (20/201). Entre las infecciones por bacterias Gram positivas (88/201) destacaron *Staphylococcus* (51/201) y *Enterococcus* (20/201). En su mayoría eran bacteriemias o infecciones por catéter, aunque en muchos casos no se pudo determinar la focalidad infecciosa.

Durante el periodo del estudio se diagnosticaron un total de 64 infecciones fúngicas, siendo en su mayoría candidiasis (46/64). Las infecciones por *Aspergillus* ascendieron a 18 (18/64), de las cuales la mayoría fueron aspergilosis probables (66,6%), y solo en 4 casos (22,2%) se tenía documentación anatomo-patológica además de microbiológica y clínica.

2. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de polimorfismos de los genes *CLEC7A* y *Pentraxina-3* en pacientes oncohematológicos

Se analizaron 3 polimorfismos del gen Dectin-1 (rs1690526, rs1690531, rs2078178) y 3 polimorfismos del gen PTX-3 (rs2305619, rs3816527, rs1840680). La aplicación de la fórmula del equilibrio de Hardy-Weinberg permitió comprobar que todos los polimorfismos estaban en equilibrio.

Las frecuencias genotípicas obtenidas en nuestro grupo a estudio para los diferentes polimorfismos eran similares a las calculadas para la población española (frecuencia esperada) (Tabla 2).

GEN		Dectin-1							
SNP	RS 16910526			RS 16910631			RS 2078178		
GENOTIPO	TT	TG	GG	CC	CT	TT	CC	CT	TT
FRECUENCIA OBTENIDA	80,8%	17,2%	2%	82,8%	15,9%	1,3%	57%	40,4%	2,6%
FRECUENCIA ESPERADA	86%	12,1%	1,9%	88,8%	10,3%	0,9%	62,6%	33,6%	3,7%

GEN		PTX 3							
SNP	RS 2305619			RS 3816527			RS 1840680		
GENOTIPO	GG	GA	AA	AA	AC	CC	GG	GA	AA
FRECUENCIA OBTENIDA	27,2%	54,3%	18,5%	29,8%	51%	18,5%	26,5%	53,6%	19,9%
FRECUENCIA ESPERADA	35,5%	46,7%	17,8%	37,4%	49,5%	13,1%	35,5%	46,7%	17,8%

Tabla 2. Frecuencias genotípicas para los polimorfismos de Dectin-1 y PTX3

3. Relación entre la presencia de polimorfismos y la frecuencia de infecciones

Se realizó una separación en dos grupos: pacientes con algún tipo de infección y pacientes sin infección.

A continuación se describen las frecuencias genotípicas de los diferentes polimorfismos en ambos grupos, donde se estudió la relación de dependencia entre ellas mediante el test de χ^2 de Pearson o Test de Fisher.

Tabla 3						
Gen_rs número	Genotipo	Infección	No infección	χ^2 de Pearson	Test de Fisher	p
Dectin-1 rs16910526	TT	92	30	-	0,512	1
	TG	20	6			
	GG	2	1			
Dectin-1	CC	95	30	-	0,693	0,776

rs16910631						
	CT	17	7			
	TT	2	0			
Dectin-1 rs2078178	CC	70	16	-	7,136	0,024
	CT	43	18			
	TT	1	3			
PTX3 rs2305619	GG	27	14	2,835	-	0,242
	GA	65	17			
	AA	22	6			
PTX3 rs3816527	AA	30	15	-	2,949	0,424
	AC	61	16			
	CC	22	6			
PTX3 rs1840680	GG	28	12	1,270		0,530
	GA	64	17			
	AA	22	8			

Se utilizó el Test de Fisher cuando en más de una casilla se espera un valor <5

Posteriormente se valoraron las frecuencias alélicas y se estudiaron las posibles relaciones de dependencia entre la presencia de un alelo y la aparición de infección.

Tabla 4

Gen_rs número	Alelos	Infección	No infección	χ^2 de Pearson	p
Dectin-1 rs16910526	T	204	66	0.02	0.887
	G	24	8		

Dectin-1 rs16910631	C	207	67	0.03	0.862
	T	21	7		
Dectin-1 rs2078178	C	183	50	4.41	0.035
	T	45	24		
PTX3 rs2305619	G	119	45	1.34	0.247
	A	109	29		
PTX3 rs3816527	A	121	46	1.35	0.245
	C	105	28		
PTX3 rs1840680	G	120	41	0.08	0.777
	A	108	33		

- Polimorfismo rs16910526: el 89,5% de los que tenían infección presentaban el alelo T, frente al 89,2% de los que no tenían infección, no habiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos.
- Polimorfismo rs16910631: el 90,8% de los que tenían infección presentaban el alelo C, frente al 90,5% de los que no tenían infección, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos.
- Polimorfismo rs2078178: el 80,3% de los que tenían infección presentaban el alelo C, frente al 67,6% de los que no tenían infección, estableciéndose una diferencia estadísticamente significativa, $p = 0,035$.
- Polimorfismo rs2305619: el 47,8% de los que tenían infección presentaban el alelo A, frente al 39,2% de los que no tenían infección; no siendo la diferencia estadísticamente significativa, $p = 0,247$.
- Polimorfismo rs3816527: el 46,1% de los que tenían infección presentaban el alelo C, frente al 37,8% de los que no tenían infección; no siendo la diferencia estadísticamente significativa, $p = 0,245$.
- Polimorfismo rs1840680: EL 47,4% de los que tenían infección presentaban el alelo A, frente al 44,6% de los que no tenían infección, no siendo la diferencia estadísticamente significativa, $p = 0,777$.

También se realizaron hipótesis de dominancia alélica entre los grupos de pacientes con y sin infección.

<i>Tabla 5</i>					
GEN	Polimorfismos	Dominancia alélica	Test de Fisher	χ^2 de Pearson	P valor
Dectin-1	rs16910526	Alelo T	0,116		0.734
Dectin-1	rs16910631	Alelo C	1,142		0,285
Dectin-1	rs2078178	Alelo C	4,617		0,032
PTX 3	rs2305619	Alelo A		3,134	0,077
PTX 3	rs3816527	Alelo C		2,598	0,107
PTX 3	rs1840680	Alelo A		0,502	0,479

Con estos datos se escogió como alelo dominante en cada polimorfismo aquel que tenía mayor significación estadística, que fue el que se utilizó para hacer las comparaciones en las frecuencias alélicas.

- En el análisis de los genes, se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre la presencia de infecciones (bacterianas, fúngicas o víricas) y el polimorfismo rs2078178 de Dectin-1. Se evidenciaron diferencias entre los dos grupos establecidos (infección – no infección) en sus distribuciones genotípicas con un valor de p de 0,024, en sus frecuencias alélicas con un p valor de 0,035, así como en las hipótesis de dominancia del alelo C con un valor de p valor de 0,032. Por el contrario, no se observó asociación alguna con los otros polimorfismos estudiados.

4. Relación entre la presencia de polimorfismos y la frecuencia de infecciones fúngicas

Se realizó una separación en dos grupos: pacientes con infección fúngica y pacientes sin infección fúngica.

- A continuación se describieron las frecuencias genotípicas de los diferentes polimorfismos en ambos grupos, donde se valoró la posible relación de dependencia entre ellas, mediante el test de la χ^2 de Pearson o el test de Fisher.

<i>Tabla 6</i>						
Gen_rs número	Genotipo	Micosis	No micosis	χ^2 de Pearson	Test de Fisher	p
Dectin-1 rs16910526	TT	47	75	-	2.105	0.362

	TG	13	13			
	GG	2	1			
Dectin-1 rs16910631	CC	51	74	-	1.275	0,575
	CT	11	13			
	TT	0	2			
Dectin-1 rs2078178	CC	37	49	-	0.595	0,777
	CT	24	37			
	TT	1	3			
PTX3 rs2305619	GG	16	25	2,240	-	0,340
	GA	31	51			
	AA	15	13			
PTX3 rs3816527	AA	13	32	-	5.096	0,127
	AC	35	42			
	CC	13	15			
PTX3 rs1840680	GG	14	26	2.555		0,279
	GA	32	49			
	AA	16	14			

Posteriormente se valoraron las frecuencias alélicas, estudiando también su relación de dependencia con la presencia de infección fúngica.

Tabla 7

Gen_rs número	Alelos	Micosis	No micosis	χ^2 de Pearson	p
Dectin-1 rs16910526	T	107	163	2,15	0,142
	G	17	15		

Dectin-1 rs16910631	C	113	161	0,04	0,841
	T	11	17		
Dectin-1 rs2078178	C	98	135	0,42	0,516
	T	26	43		
PTX3 rs2305619	G	63	101	1,04	0,307
	A	61	77		
PTX3 rs3816527	A	61	106	2,68	0,101
	C	61	72		
PTX3 rs1840680	G	60	101	2,05	0,152
	A	64	77		

- Polimorfismo rs16910526: el 86,3% de los que tenían micosis presentaban el alelo T, frente al 91,6% de los que no tenían micosis, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, $p = 0,142$.
- Polimorfismo rs16910631: el 91,1% de los que tenían micosis presentaban el alelo C, frente al 90,4% de los que no tenían micosis, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.
- Polimorfismo rs2078178: el 79% de los que tenían micosis presentaban el alelo C, frente al 75,8% de los que no tenían micosis, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, $p = 0,516$.
- Polimorfismo rs2305619: el 50,8% de los que tenían micosis presentaban el alelo G, frente al 56,7% de los que no tenían micosis, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, $p = 0,307$.
- Polimorfismo rs3816527: el 50% de los que tenían micosis presentaban el alelo C, frente al 59,5% de los que no tenían micosis, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, $p = 0,101$.
- Polimorfismo rs1840680: EL 48,4% de los que tenían micosis presentaban el alelo G, frente al 56,7% de los que no tenían micosis, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, $p = 0,152$.

También se realizaron hipótesis de dominancia alélica entre los grupos de pacientes con y sin infección fúngica.

Tabla 8

GEN	Polimorfismos	Dominancia alélica	χ^2 de Pearson	Test de Fisher	P valor
Dectin-1	rs16910526	Alelo G	1,243		0.265
Dectin-1	rs16910631	Alelo C		2,106	0,147
Dectin-1	rs2078178	Alelo T	0,464		0,496
PTX 3	rs2305619	Alelo G	2,376		0,123
PTX 3	rs3816527	Alelo C	3,696		0,055
PTX 3	rs1840680	Alelo G	1,822		0,177

- Por tanto, no se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre los polimorfismos de los dos genes estudiados con las infecciones fúngicas.

5. Asociación entre el polimorfismo rs2078178 de Dectin1 y la probabilidad de infección

Una vez establecida la relación de dependencia entre el polimorfismo rs2078178 de Dectin-1 y la probabilidad de presentar una infección bacteriana, vírica o fúngica, se estudió la asociación entre ambos. Para ello, se realizó un análisis de asociación mediante Odds Ratio (OR) en el que comparamos:

- el genotipo de mayor riesgo (CC) frente al de menor riesgo (TT), y se obtuvo un valor de OR de 13, 125; con un IC de 1,28-134,551; $p=0,030$.
- el alelo de mayor riesgo (C) frente al de menor riesgo (T), y se obtiene un valor de OR de 1,952; con un IC de 1,807-3,507; $p=0,025$.

6. Expresión del receptor en donantes sanos con el polimorfismo rs2078178 de Dectin-1

Se realizó el estudio de expresión de dectin-1 en personas sanas para valorar las consecuencias que este polimorfismo en sus diferentes genotipos podía tener sobre la proteína.

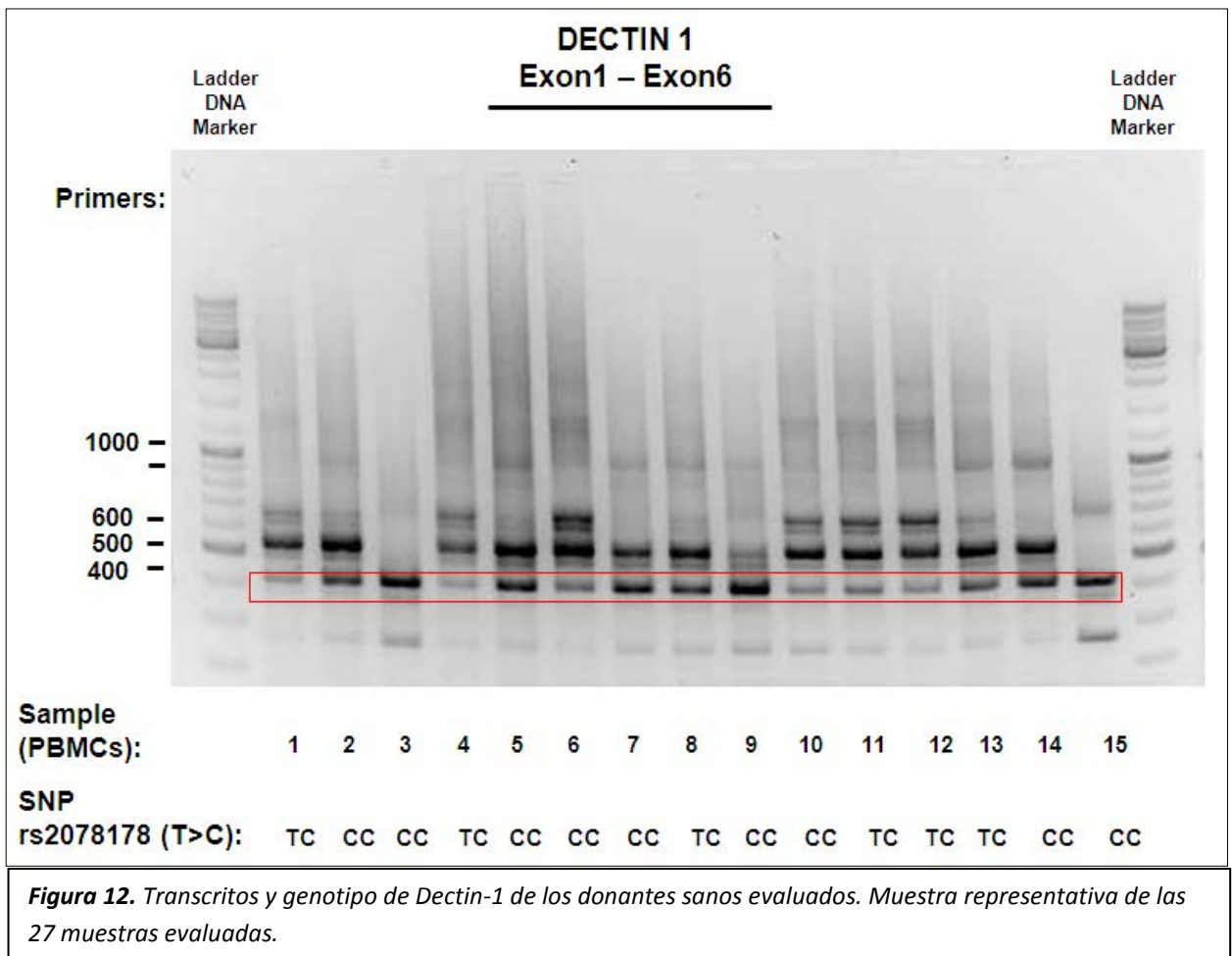
Dado que en el gen CLEC7A se producen splicing alternativos que pueden dar lugar a diferentes isoformas, asociamos el tamaño de los transcritos amplificados en la PCR realizada con los cebadores en los exones 1 y 6 con las distintas isoformas descritas actualmente (Tabla 12).

Tabla 12

Dectin-1 Isoform	A	B	C	D	E	F
Exon1 Exon6	669 pb	531 pb	550 pb	421 pb	432 pb	X

La isoforma funcional mayoritaria es la B en la que no se encontraron diferencias al comparar los resultados de los distintos genotipos. La segunda isoforma funcional en frecuencia es la A, en la que si se observaron diferencias. Por otro lado, se valoraron las isoformas minoritarias no funcionales, producto del *splicing* alternativo, en concreto la isoforma D.

Se encontraron diferencias cualitativas entre los individuos homocigotos para el alelo C, que mostraron una tendencia a presentar mayor cantidad de isoforma D que los heterocigotos (Figura 12). Además, en todos los casos en los que la isoforma D estaba aumentada, la isoforma A estaba disminuida o era inexistente. En dos de los casos homocigotos para el alelo mutante C, se observó como única isoforma del receptor de Dectin-1, la tipo D (Figura 12).



DISCUSIÓN

La susceptibilidad a sufrir infecciones fúngicas viene determinada por factores ambientales y genéticos. En este estudio, los factores ambientales son los desencadenados por la patología de base de estos pacientes y los tratamientos administrados, mientras que los factores genéticos corresponderían a determinados polimorfismos genéticos que afectan al sistema inmune y comprometen la función de reconocimiento de patógenos, existiendo numerosos estudios que analizan situaciones similares a las de este estudio. Así, se planteó la hipótesis de si la presencia de algún polimorfismo en los genes que codifican Dectin-1 y PTX3 podría implicar un aumento del riesgo de infecciones fúngicas o de otra naturaleza.

Los resultados obtenidos sobre una amplia muestra mostraron que la presencia del alelo C del polimorfismo rs2078178 de Dectin-1 se correlacionaba con un mayor riesgo de desarrollar infecciones en pacientes oncohematológicos. De tal forma que el genotipo CC aumentaba hasta 13 veces la probabilidad de sufrir infección respecto al genotipo de menor riesgo que sería el homocigoto para el alelo TT. Sin embargo, en ninguno de los 6 polimorfismos estudiados se encontró asociación con la aparición de infecciones fúngicas. Estos datos sugieren que Dectin-1 podría jugar un papel más amplio del inicialmente descrito en el reconocimiento de patrones bacterianos (Tsoni, 2008).

En el momento actual, el tratamiento en pacientes oncohematológicos con alto riesgo de desarrollar infecciones fúngicas implica la aplicación de medicación preventiva en presencia de fiebre persistente durante 5 o 7 días, siempre que se esté administrando antibioterapia empírica de amplio espectro y los cultivos microbiológicos sean negativos. Estas pautas de tratamiento pueden disminuir la incidencia de infecciones fúngicas detectadas a pesar de que existan polimorfismos que limitan el reconocimiento de patrones fúngicos.

Dada la incidencia limitada de algunos de los polimorfismos, se necesitaría un número de pacientes mayor para poder obtener resultados estadísticamente significativos y con suficiente validez externa que nos permitiera su aplicación en la práctica clínica habitual.

Si se encontrara un polimorfismo que realmente incrementa el riesgo de sufrir infecciones fúngicas en contextos favorables, se podría limitar esta estrategia preventiva a estos pacientes, lo cual supondría una disminución de la comorbilidad para el paciente y un ahorro económico para los centros hospitalarios importantes. Quedando de esta forma limitado el uso de antifúngicos a pacientes con síntomas clínicos y/o signos radiológicos o microbiológicos de infección fúngica.

El receptor de β -glucanos es un receptor transmembrana tipo II con un dominio extracelular de reconocimiento de carbohidratos y una cola intracitoplasmática con un motivo de activación de tirosina. El gen *CLEC7a* que codifica este receptor consta de 6 exones con sus correspondientes intrones, y se sabe que en el receptor humano se produce un *splicing* alternativo que dará lugar a diferentes isoformas. Hay descritas 8 isoformas (A-H) siendo las más frecuentes las isoformas A y B, mientras que las otras

6 son transcritos que presentan variaciones respecto a las principales y generan codones stop que dan lugar a proteínas disfuncionantes en todos los casos menos en la isoforma E.

El polimorfismo rs2078178 se localiza en el intrón 4 del gen *CLECTA*, y por tanto podría modificar el splicing alternativo y alterar el porcentaje habitual de expresión de las diferentes isoformas del receptor de β -glucano.

Los análisis de PCR realizados del ADNc de los donantes sanos con el polimorfismo rs2078178 de Dectin-1 presentan variaciones en la expresión de las diferentes isoformas según el genotipo. De tal forma que en los individuos con el genotipo CC se observa una tendencia a expresar mayor cantidad de la isoforma D que daría lugar a una proteína incapaz de establecer el reconocimiento de los patógenos. Además este hallazgo se asocia a una disminución de la expresión o incluso desaparición de la isoforma funcional A, no habiendo una clara relación con la isoforma B. Así se podría justificar el mayor riesgo de infecciones detectado en estos pacientes. Sin embargo, son resultados preliminares, y con este tamaño muestral no podemos ofrecer la evidencia científica suficiente para confirmar la hipótesis.

Para completar el estudio, se están realizando análisis funcionales mediante el estudio de fagocitosis de zymosan por parte de monocitos por citometría de flujo. Otro estudio en esta dirección podría ser a través de los patrones de expresión de citocinas producidas por activación del receptor Dectin-1 y PTX3, para ver si los polimorfismos que se relacionan con aumento del riesgo de infección se correlacionan a su vez con una disminución cuantitativa de interleuquinas pro-inflamatorias.

CONCLUSIONES

- No se observan asociaciones estadísticamente significativas entre la presencia de los diferentes polimorfismos estudiados de los genes Dectin-1 y PTX3, y el riesgo de infecciones fúngicas, posiblemente por el tamaño muestral.
- La presencia del alelo C del polimorfismo del gen Dectin-1 rs2078178 se correlaciona con mayor riesgo de infecciones en la población estudiada. Por tanto, parece que el receptor β -glucano podría participar también en el reconocimiento de otros patógenos no fúngicos.
- Los individuos homocigotos para el alelo C del polimorfismo rs2078178 del gen Dectin-1 tienen una tendencia a presentar mayor proporción de la isoforma D del receptor β -glucano que es muestra una escasa funcionalidad. Además, parece que el aumento de la isoforma D podría ser inversamente proporcional a la cantidad de isoforma A.

BIBLIOGRAFÍA

- Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002;34:7-14.
- Tsoni SV, Brown GD: β -Glucans and Dectin-1. *Ann N Y Acad Sci* 2008, 1143:45-60.
- Dennehy KM, Ferwerda G, Faro-Trindade I et al. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol* 2008; 38:500-506.
- Reid DM, Gow NAR and Brown GD. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Current Opinion in Immunology* 2009, 21:30–37
- Uchiyama R, Tsutsui H. Caspases as the key effectors of Inflammatory responses against bacterial infection. *Arch Immunol Ther Exp* 2015; 63:1-13.
- Jouault, T., Ibata-Ombetta, S., Takeuchi, O., Trinel, P.A., Sacchetti, P., and Lefebvre, P. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J. Infect. Dis* 2003; 188(1):165-172.
- Wójtowicz A, Bochud PY. Host genetics of invasive *Aspergillus* and *Candida* infections. *Semin Immunopathol* 2015; 37: 173-186.
- Gantner BN, Simmons RM, Canaver SJ et al. Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2002; 193 (9): 1107-1117.
- Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R et al (2002) Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in antifungal innate immune response. *Nature* 2002; 420:182–186.
- Moalli, F., Paroni, M., Veliz Rodriguez, T., Riva, F., Polentarutti, N., Bottazzi, B., et al. The therapeutic potential of the humoral pattern recognition molecule PTX3 in chronic lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Immunol*, 2011; 186: 5425–5434.
- Qu X, Che Ch, Gao A, Lin J et al. Association of Dectin-1 and DC-SIGN gene single nucleotide polymorphisms with fungal keratitis in the northern Han Chinese population. *Molecular Vision* 2015; 21:391-402.
- Plantinga TS, van der Velden WJ, Ferwerda B, van Spruiel AB, Adema G, Feuth T, Donnelly JP, Brown GD, Kullberg BJ, Blijlevens NM, Netea MG. Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased *Candida* colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2009; 49:724-32.
- Plantinga TS¹, Johnson MD, Scott WK, Joosten LA et al. Human genetic susceptibility to *Candida* infections. *Med Mycol.* 2012; 50(8):785-94
- Rosentul DC, Delsing CE, Jaeger M, Plantinga TS, Oosting M et al. Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. *Frontiers in Microbiology* 2014; 5 (483): 1-7.
- Sainz J, Lupiáñez CB, Segura-Catena et al. Dectin-1 and DC-SIGN Polymorphisms associated with invasive pulmonary aspergillosis infection. *Plos One* 2012; 7(2): e32273.
- Empiric antifungal therapy in febrile granulocytopenic patients. EORTC International Antimicrobial Therapy Cooperative Group. *Am J Med* 1989, 86:668-72

- Maertens J., Marchetti O., Herbrecht R., Cornely O.A., Fluckiger U., Frere P. et al. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3-2009 Update. *Bone Marrow Transplant*. 2011; 46:709-18.
- 2008 Best Practices for Repositories. Collection, Storage, Retrieval and Distribution of Biological Materials for Research". International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). *Cell Preservation Technology*, 2008; 6 (1).
- Semagn K et al. 2014. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol. Breed*. 33: 1-14.
- Tamay L, Ibarra C and Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad* 2013; 2(2): 70-78.
- Mummidi, S., et al., Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts. *J Biol Chem*, 2001. 276(35): 33196-212.
- Olesen, R., et al., DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans. *Genes Immun*, 2007. 8(6): 456-67.
- Liu, H., et al., Isolation and characterization of the human DC-SIGN and DC-SIGNR promoters. *Gene*, 2003. 313: 149-59.
- Tacke, P.J., et al., Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood*, 2005. 106(4): 1278-85.
- Cambi, A., et al., The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2003. 33 (2): 532-8.
- Serrano-Gomez, D., et al., Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol*, 2004. 173(9): 5635-43
- Willment JA, Gordon S and Brown GD. Characterization of the Human β -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. 47 (276): 43818-43823.
- Levitz SM. Innate Recognition of Fungal Cell Walls. *PLoS Pathog*, 2010. 6(4): e1000758.
- Sukhithasri V, Nisha N and Biswas L. Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. *Microbiological Research*, 2013. 168: 396-406.
- Dambuza IM and Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments. *Current Opinion in Immunology*, 2015; 32: 21-27.
- Fischer M, Spies-Weisshart B, Schrenk K et al. Polymorphisms of Dectin-1 and TLR2 predispose to invasive fungal disease in patients with acute myeloid leukemia. *Plos one*, 2016; 11(3):e0150632.
- Chai LY, de Boer MG, Van der Velden WJ, Plantinga TS, Netea MG et al. The Y238X stop codon polymorphism in the human β -glucan dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *Journal Infectious Disease*, 2011; 203(5): 736-43.