



**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**  
**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Medicina y Psiquiatría**

**INMUNOGENÉTICA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR:  
INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DEL COMPLEJO  
PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD, DEL REPERTORIO DE  
GENES KIR Y DE OTROS GENES DEL SISTEMA INMUNITARIO.**

Tesis doctoral presentada por Javier Gonzalo Ocejo Viñals para optar al Grado de Doctor por  
la Universidad de Cantabria.

Santander Enero 2016





**Facultad de Medicina**

**Departamento de Medicina y Psiquiatría**

**D.<sup>a</sup> MARÍA DEL CARMEN FARIÑAS ÁLVAREZ**, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA Y JEFE DE SECCIÓN DE MEDICINA INTERNA-ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUES DE VALDECILLA.

CERTIFICA QUE, el trabajo de investigación titulado “INMUNOGENÉTICA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR: INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD, DEL REPERTORIO DE GENES KIR Y DE OTROS GENES DEL SISTEMA INMUNITARIO” presentado por D. **JAVIER GONZALO OCEJO VIÑALS** para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, ha sido realizado en el Departamento de Medicina y Psiquiatría de la Universidad de Cantabria y en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla bajo mi dirección.

Examinado el trabajo considero que está adecuadamente elaborado para su lectura y defensa pública ante la Comisión que ha de juzgar la Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido este certificado en Santander a 28 de Enero de 2016.

Prof. M. Carmen Fariñas Álvarez



*Parte de este trabajo ha sido financiado por una beca del IFIMAV (API 10/10), actualmente  
Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL)*





*A mi familia, en especial, a mi hija Teresa*



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Carmen Fariñas, excelente profesional y mejor persona. Siempre has estado ahí, y cuando me has visto flaquear, no te ha faltado una palabra de aliento. Sin tu ayuda y dirección, este trabajo hubiera resultado del todo imposible llevar a cabo. La palabra maestra define muy bien tu quehacer. Al menos para mí lo has sido y lo continúas siendo. Tu ejemplo de vida y profesionalidad son dignos de admiración.

A mis padres, Javier y María Luisa, quienes además de la vida, me han dado siempre un ejemplo de cómo vivirla, guiada por los principios de pureza y honestidad a los que tantas veces he tenido que recurrir. Aunque muchas veces no he sabido seguirlos, sabed que creo haberlo intentado y tratado de corregir cuando me he equivocado.

A mi abuela Victoria, “madre”, quien aunque se fue joven en mi etapa de adolescente. Su recuerdo aún continúa vivo. Su bondad, generosidad y esfuerzo, trato de hacerlos míos tantas veces.... ¡Cuánto recuerdo sus sabias enseñanzas sobre las virtudes que han de guiar a uno por la senda del bien! No sé si lo podrás comprobar, pero sigo equivocándome día tras día.

A mis abuelos Jaime y Carmen, ejemplos de tesón y buen hacer. Trabajadores incansables que siempre supieron inculcarme sabios consejos. Muchas veces he tenido que recurrir a ellos para enmendar mis errores.

A Blanca, compañera durante casi media vida. A ti te debo gran parte de lo que soy. Transformaste al de la “coletilla” en un hombre creo que, o al menos eso intento, de bien. Sabes que sin ti, esto no hubiera podido hacerse realidad.

A mis hermanos, por haberme aguantado, comprendido, perdonado y ayudado tantos años. Gracias por haber estado y seguir estando ahí cuando os he necesitado.

A Tere y Tomás, mis segundos padres, quienes me acogisteis como un hijo más y siempre me lo habéis demostrado. Sé que habéis sabido perdonar mis errores y me habéis transmitido vuestro cariño no sólo cuando lo he necesitado.

A mis profesores, de la infancia, juventud, universidad y los que hoy en día seguís ejerciendo esta tarea por todo lo que me habéis enseñado, enseñáis y seguro que enseñaréis. No siempre he sabido poner en práctica vuestras enseñanzas, pero sabed que no han caído en saco roto.

A mis amigos, por eso, por serlo. ¡Qué enorme significado encierra esta palabra! Os he de agradecer vuestro cariño y ayuda. Habéis estado cuando he tenido necesidad de vosotros sin ningún interés. Como dice un proverbio chino, las buenas fuentes se conocen en las grandes sequías; los buenos amigos, en las épocas desgraciadas.

A todos los compañeros del Servicio de Inmunología, especialmente a Fernando Ausín, Elena Puente y Esther Asensio. Este trabajo es también vuestro, puesto que sin vuestra ayuda, no hubiera sido posible realizarlo.

Este agradecimiento, lo quiero hacer extensivo a los Dres. José Luis Arroyo, Director del Banco de sangre y Tejidos de la Comunidad de Cantabria, Ramón Agüero Balbín, Jefe de Servicio de Neumología, Adelaida Velasco, Alberto Ferrero y Eduardo Pedrejón, Facultativos Especialistas de Neumología y Carlos Fernández Mazarrasa, Facultativo Especialista de Microbiología, quienes tanto me han ayudado en el reclutamiento de pacientes y controles sanos.

A mis pacientes y sus familiares, a los que he atendido en la Consulta de Inmunología. He recibido muchas muestras de gratitud, que es lo más grande y bonito que un médico puede recibir. Ello me motiva para seguir trabajando en la buena dirección aunque no siempre pueda o sepa curar vuestro padecer o aliviar vuestros desvelos.

A todas las personas que desinteresadamente han participado en este trabajo, donando su sangre para que pudiera realizar los estudios necesarios para su ejecución.

A todos aquellos que sufren cualquier padecimiento, de cuerpo y / o espíritu. Vaya para ellos mi solidaridad y mi deseo de que puedan encontrar cura para su mal. Saberos partícipes de este, también vuestro trabajo.

Paco, gracias por todo. Sabes que este trabajo, en parte es también tuyo. D.E.P.

Este trabajo va dedicado a ti, Teresa, pues lo eres todo para mí. No pretendo originalidad alguna, por lo que te escribo lo que otro, más sabio, dedicó a través de una canción a su hija hace unos años:

Tan pura la vida y tú  
tan llena de paz.  
Y sólo se me ocurre amarte.  
Llenas mi vida de luz,  
llenas el cielo, la tierra y el mar.  
Y a mí tan sólo se me ocurre amarte.  
No existe un corazón que lo resista.  
Porque si lloras quiero que mis ojos  
sigan cada lagrima tuya,  
y hasta que la pierda de vista.  
La miro a ella y te miro a ti.  
Usa mi alma como una cometa,  
y yo muero de ganas  
de encontrar la forma  
de enseñarte el alma.  
Y sólo se me ocurre amarte.  
Cómo va a ser eso  
si aun cuando sale la luna  
y da en mi ventana  
ya no te puedo dejar de querer.  
Nos hemos reído y llorado los tres.  
Yo quiero darte mi alegría,  
mi guitarra y mis poesías.  
Y sólo se me ocurre amarte...

*Tomado de Alejandro Sanz (Sólo se me ocurre amarte, 2001)*

*Darí­a todo lo que sé por la mitad de lo que ignoro*  
*René Descartes (1596-1650)*



# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. La tuberculosis (TB): aspectos epidemiológicos.....	1
1.2. Antecedentes y estado actual del tema.....	8
1.2.1. Patogénesis de la tuberculosis pulmonar (TBP): infección tuberculosa latente (ITL) <i>versus</i> enfermedad activa.....	8
1.2.2. Factores de predisposición-resistencia a la infección /enfermedad...	16
1.2.3. La respuesta inmune innata frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ( <i>Mtb</i> ).....	18
1.2.3.1. Receptores tipo Toll (TLRs).....	19
1.2.3.2. Lectina de unión a manosa (MBL).....	22
1.2.3.3. Dectina-1 / CARD9.....	24
1.2.4. La respuesta inmune adquirida frente a <i>Mycobacterium</i> tuberculosis.....	26
1.2.4.1. El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).....	26
1.2.4.2. Los genes <i>KIR</i> (Killer immunoglobulin-like receptors).....	33
1.2.4.3. CCL5 (RANTES).....	39
1.2.4.4. Interleucina-17 (IL-17).....	41
1.2.5. Susceptibilidad genética a la tuberculosis pulmonar: genes implicados.....	43
<b>2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS</b> .....	47
<b>3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO</b> .....	51
<b>4. PACIENTES Y MÉTODOS</b> .....	54
4.1. Ámbito.....	54
4.2. Diseño del estudio.....	54
4.3. Población estudio.....	54
4.4. Criterios de exclusión.....	56
4.5. Obtención de muestras.....	56
4.6. Recogida de Información.....	57
4.7. Extracción de ADN.....	57
4.8. Tipificación de los antígenos leucocitarios humanos (HLA).....	58
4.9. Genotipado KIR .....	61
4.10. Genes / Polimorfismos estudiados .....	61

4.11.	Genotipado mediante sondas “TaqMan” .....	66
4.12.	Cultivo “ex vivo” y enzimoimmunoensayo (EIA) IL-17A.....	67
4.13.	Análisis estadístico.....	67
4.14.	Aspectos éticos.....	69
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
5.1.	Descripción de la población de estudio.....	73
5.2.	Distribución de los antígenos HLA de clase I.....	73
5.3.	Distribución de los antígenos HLA de clase II.....	79
5.4.	Distribución de los genes, haplotipos y genotipos <i>KIR</i> .....	81
5.5.	Interacción de los receptores <i>KIR</i> con sus ligandos HLA.....	85
5.6.	Frecuencias de genes <i>KIR</i> activadores e inhibidores.....	89
5.7.	Frecuencias de los polimorfismos en el promotor de <i>CCL5</i> .....	90
5.8.	Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo SNP <i>T1805G</i> de <i>TLR1</i> .....	93
5.9.	Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP <i>IL-17 G-152A</i> .....	94
5.10.	Niveles séricos y tras estimulación “ex vivo” de IL-17 en los grupos del estudio.....	96
5.11.	Frecuencia alélicas de las variantes estructurales y polimorfismos del promotor de <i>MBL2</i> .....	98
5.12.	Haplotipos de <i>MBL2</i> .....	98
5.13.	Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los polimorfismos de Dectina-1 y <i>CARD9</i> .....	99
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>104</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>127</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>132</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXO: Comunicaciones y Publicaciones derivadas de la Tesis</b> .....	<b>157</b>



## ABREVIATURAS

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BCG	Vacuna de Calmette-Guérin
BP	base pair (pares de bases o número de nucleótidos de una secuencia determinada)
CDs	Células dendríticas
ER	Enzima de restricción
HLA	Antígeno leucocitario humano
HWE	Equilibrio de Hardy Weinberg
IGRA	Ensayo de liberación de interferón gamma
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
Igs	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
ITL	Infección tuberculosa latente
KIR	Receptor de células Killer semejante a las inmunoglobulinas
LAM	Lipoarabinomanano
MBL	Lectina de unión a manosas
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	Célula Natural Killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR / IC95%	Odds ratio / Intervalo de confianza del 95%
PAMP	Patrón moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido (“single nucleotide polymorphism”)
SSO	Oligonucleótidos específicos de secuencia
TB	Tuberculosis
TBP	Tuberculosis pulmonar
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TST	Ensayo cutáneo de estimulación con tuberculina
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana



## **1. INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN

### 1.1. La tuberculosis: aspectos epidemiológicos

La tuberculosis (TB) continúa siendo hoy en día un grave problema de salud mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2013 se notificaron 6,1 millones de casos de TB, de los cuales 5,7 millones correspondían a nuevos diagnósticos y los 0,4 millones restantes se encontraban ya bajo tratamiento. [1] En los últimos años parece que el número de nuevos casos se ha estabilizado. De los 9 millones de personas que desarrollaron TB en el 2013, el 64% correspondían a nuevos casos, de los cuales, 1,5 millones murieron a causa de la enfermedad. Esta diferencia de aproximadamente 3 millones entre los casos de TB y los comunicados a la OMS o bien no fueron bien diagnosticados o no fueron declarados a los diferentes programas nacionales de control de la TB, por lo que se han de realizar mayores esfuerzos en este campo.

A nivel global, se estima que en 2013, el 3,5% de los casos nuevos y el 20,5% de los casos previamente tratados corresponden a casos de TB multirresistentes a los tratamientos convencionales.

Sin tratamiento, la mortalidad de la TB es elevada. En estudios sobre la evolución natural de la enfermedad entre pacientes con aislamientos positivos de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) en esputo, en sujetos no infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), aproximadamente un 70% fallecen en 10 años, y entre los casos con aislamiento negativo en esputo, pero con cultivos positivos, lo hacen un 20%. [2]

*Mtb*, (figura 1) el patógeno causante de la enfermedad, infecta aproximadamente a un tercio de la población mundial. La gran mayoría de las personas infectadas no presenta síntomas ni signos de TB y sólo un 5-10% de los individuos infectados con *Mtb* desarrolla enfermedad pulmonar activa, lo cual sugiere diferencias en la susceptibilidad o resistencia a progresión entre los distintos individuos infectados. [3]

## Introducción

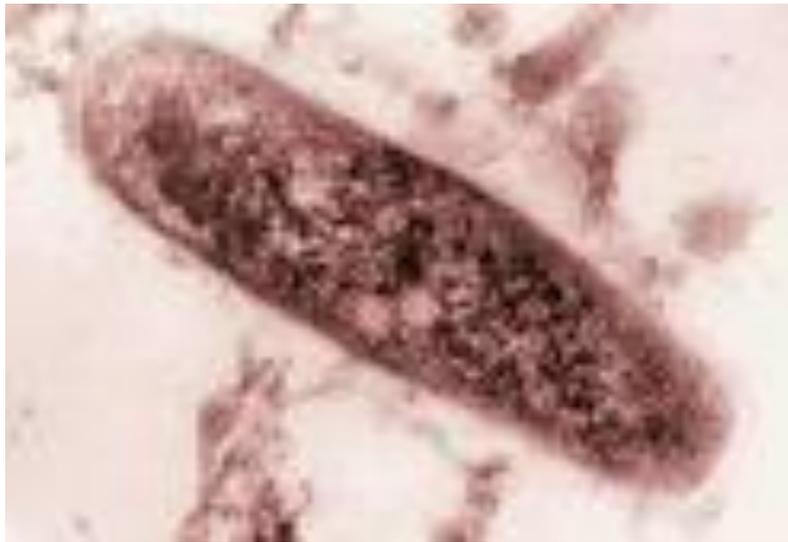


Fig. 1. Bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Fuente: <http://www.iqb.es/dermatologia/atlas/tuberculosis/tuberculosis01.htm>

En los últimos treinta años, se ha observado un aumento en la incidencia de la TB, [4] asociada principalmente a la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el mayor número de cepas multirresistentes frente a los diferentes tratamientos farmacológicos, [5] así como a una disminución de la calidad de vida de las poblaciones emergentes (los factores socioeconómicos y la predisposición genética del hospedador son factores de igual importancia que determinan, en cierto modo, la susceptibilidad a esta enfermedad). [6, 7]

El mayor riesgo de transmisión de la TB en pacientes con infección por VIH parece estar claramente demostrado, aunque la aparición de los nuevos tratamientos antirretrovirales, parece haber disminuido el riesgo en este grupo de pacientes. [8] Este mayor riesgo de transmisión actual atribuido a la infección por VIH, no resulta del todo claro, y existe cierta controversia al respecto, [9,10] atribuyendo un papel más importante a las diferencias socioeconómicas de estos pacientes en la influencia sobre el riesgo de infección tuberculosa (uso de drogas por vía parenteral, estancia en instituciones penitenciarias, nivel socioeconómico individual y del país, etc.).

La mayor parte de los casos de TB afectan al sudeste asiático y África subsahariana. Entre los países desarrollados, y más concretamente en Europa, España presenta una de las mayores tasas de incidencia y prevalencia de TB, siendo Cantabria junto con Galicia, Asturias y País Vasco, las regiones más afectadas. En los últimos años, las tasas de prevalencia e incidencia de tuberculosis en los países occidentales han ido disminuyendo gracias a políticas eficaces de prevención y tratamiento de la enfermedad (Figuras 2a y 2 b)

## Introducción

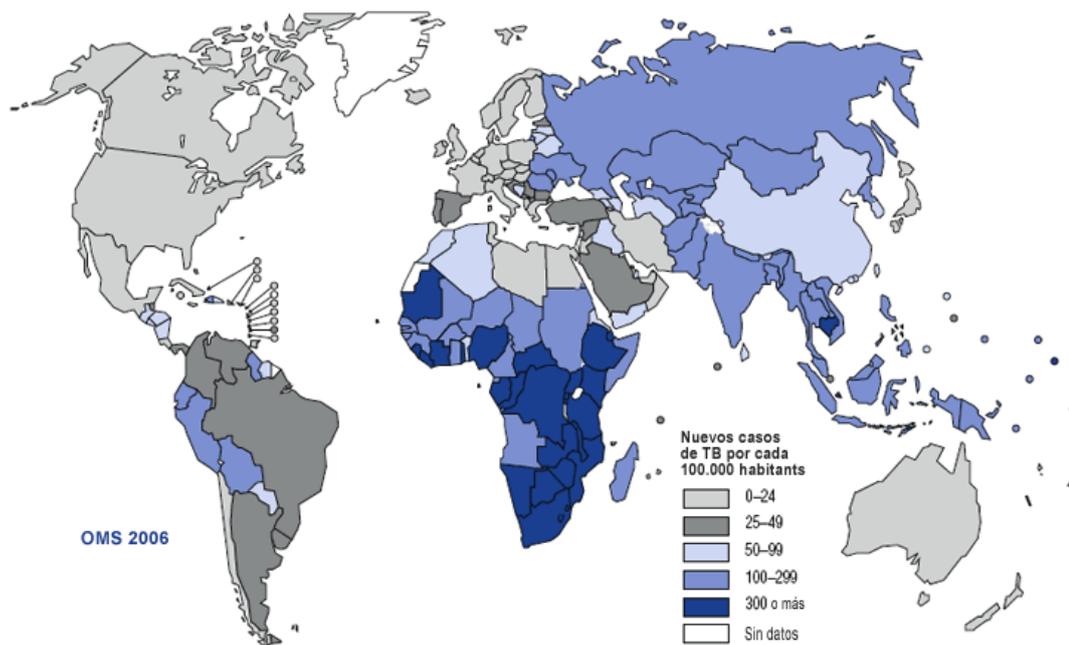


Fig. 2a. Incidencia de TB en todo el mundo. Fuente: Global tuberculosis report 2007. World Health Organization. Geneva, Switzerland: [www.who.int/tb](http://www.who.int/tb). WHO, 2007.

### Estimated TB incidence rates, 2013

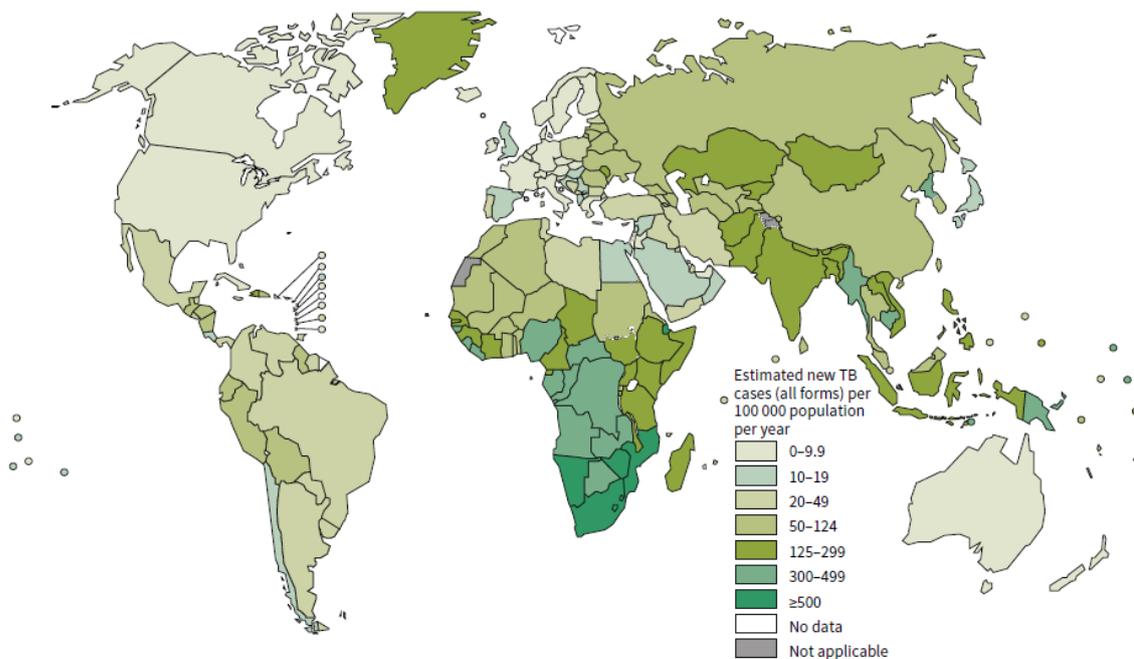


Fig. 2b. Incidencia de TB en todo el mundo. Fuente: Global tuberculosis report 2014. World Health Organization. Geneva, Switzerland: [www.who.int/tb](http://www.who.int/tb). WHO, 2014.

## Introducción

Según datos de la Dirección de salud Pública de la Consejería de Sanidad del Gobierno de Cantabria, la tasa de incidencia de tuberculosis pulmonar (TBP) ha disminuido notablemente en los últimos años, fundamentalmente desde el año 2005. Sin embargo otras formas de TB (extrapulmonares), mantienen una tasa de incidencia prácticamente constante (Tabla 1).

---

<b>Año</b>	<b>TBC respiratoria</b>	<b>Tasa de incidencia</b>	<b>Otras TBC</b>	<b>Tasa de incidencia</b>
2004	108	19,47	--	--
2005	140	24,9	31	5,51
2006	97	17,07	37	6,51
2007	101	17,63	34	5,94
2008	80	13,74	22	3,78
2009	67	11,37	27	4,58
2010	82	13,85	23	3,88
2011	71	11,97	34	5,73
2012	45	7,58	20	3,37
2013	44	7,43	31	5,24

---

Tabla 1. Incidencia de las diferentes formas de TB en los últimos años en la Comunidad Autónoma de Cantabria.

Según datos del Instituto de Salud Carlos III en el año 2014 se notificaron 50 casos de TB respiratoria con una tasa de incidencia de 8,53 por 100.000 habitantes.

Este modelo de prevalencia de la infección tuberculosa está actualmente cambiando, debido fundamentalmente, a los importantes movimientos migratorios, que debido a diferentes factores, se están produciendo desde los países donde la TB es más frecuente hacia los países occidentales. En estudios que utilizan modelos epidemiológicos y matemáticos, se estima que por ejemplo, en Holanda, en el año 2030, se habrán podido eliminar las tasas de infección tuberculosa al 1% si no ocurren cambios en el origen de la transmisión, pero que un 60% o más de las mismas se deberán a transmisión procedente de inmigrantes. [11,12]

## Introducción

Fue en el año 1882 cuando Robert Koch (figura 3), microbiólogo alemán considerado como uno de los padres de la bacteriología, descubrió el germen causante de la TB, y lo denominó *Bacterium tuberculosis*, el cual durante muchos años ha sido conocido como bacilo de Koch. En marzo de 1882, anunció ante los más ilustres médicos y científicos de Alemania, el aislamiento y cultivo del bacilo responsable de la TB, que en aquella época era responsable de una de cada siete muertes (siete millones de muertes al año), y la primera causa de mortalidad infantil en Europa. [13] Su trabajo consistió en aislar el germen causante de esta enfermedad y hacerlo crecer en un cultivo puro. Utilizando este cultivo indujo la enfermedad en animales de laboratorio. De los animales enfermos pudo de nuevo aislar el germen y verificar su identidad, comparándolo con el germen original. Esta metodología fue el principio de los llamados “Postulados de Koch”, los cuales establecen las condiciones necesarias para que un organismo sea considerado la causa de una enfermedad infecciosa.



Fig. 3. Imagen de Robert Koch (1843-1910), descubridor del *Mtb*, germen responsable de la TB. Reproducido con permiso del Colegio de Médicos de Filadelfia.

Catorce años más tarde, otros dos microbiólogos alemanes, Karl Bernhard Lehmann y Rudolf Otto Neumann acuñaron el término de *Mycobacterium* (cuyo significado es hongo-bacteria) debido a que en cultivo, este patógeno presentaba ciertas características típicas de los hongos. [14]

## Introducción

No obstante, dicho bacilo ha estado con nosotros desde el comienzo de la historia, algo que ha podido ser evidenciado a través de su hallazgo en momias egipcias y precolombinas de más de 4.000 años. Hipócrates, ya relató que la “tisis” era la enfermedad más extendida y mortal de su época.

Aunque realmente, otros investigadores apuntan a que la hipótesis más probable es que el bacilo ya estaba presente entre los primeros humanos, hace unos 15.000-20.000 años cuando el ser humano comenzó a vivir en sociedad en comunidades agrícolas y ganaderas.

Poco se oye hablar de infecciones y / o epidemias de TBP hasta los siglos XV y XVI, donde es conocida como “la gran peste blanca”, responsable de una gran parte de las muertes que acontecen en Europa en esa época. Posteriormente, la TBP sufrió una expansión durante los siglos XVIII y XIX por Europa y todo el continente americano. Sin embargo zonas donde hoy es una enfermedad endémica, como Asia y África aún no estaban prácticamente afectadas. Se estima que durante estos dos siglos, la TBP fue responsable de la muerte de mil millones de personas.

*Mtb*, el bacilo causal de la TBP, pertenece al género *Mycobacterium*, y junto con el *Mycobacterium bovis*, *africanum* y *microti* constituyen el denominado complejo *M. Tuberculosis*. Todos ellos son capaces de producir TB, aunque con enorme diferencia es *Mtb* el germen causal.

*Mtb* tiene como reservorio más frecuente, el individuo sano infectado, esto es, la persona que tiene el bacilo de manera latente en su organismo sin presentar ningún síntoma o signo de enfermedad. Cuando esta persona desarrolla la enfermedad activa, pasa a ser una fuente de transmisión del bacilo (Figura 4).

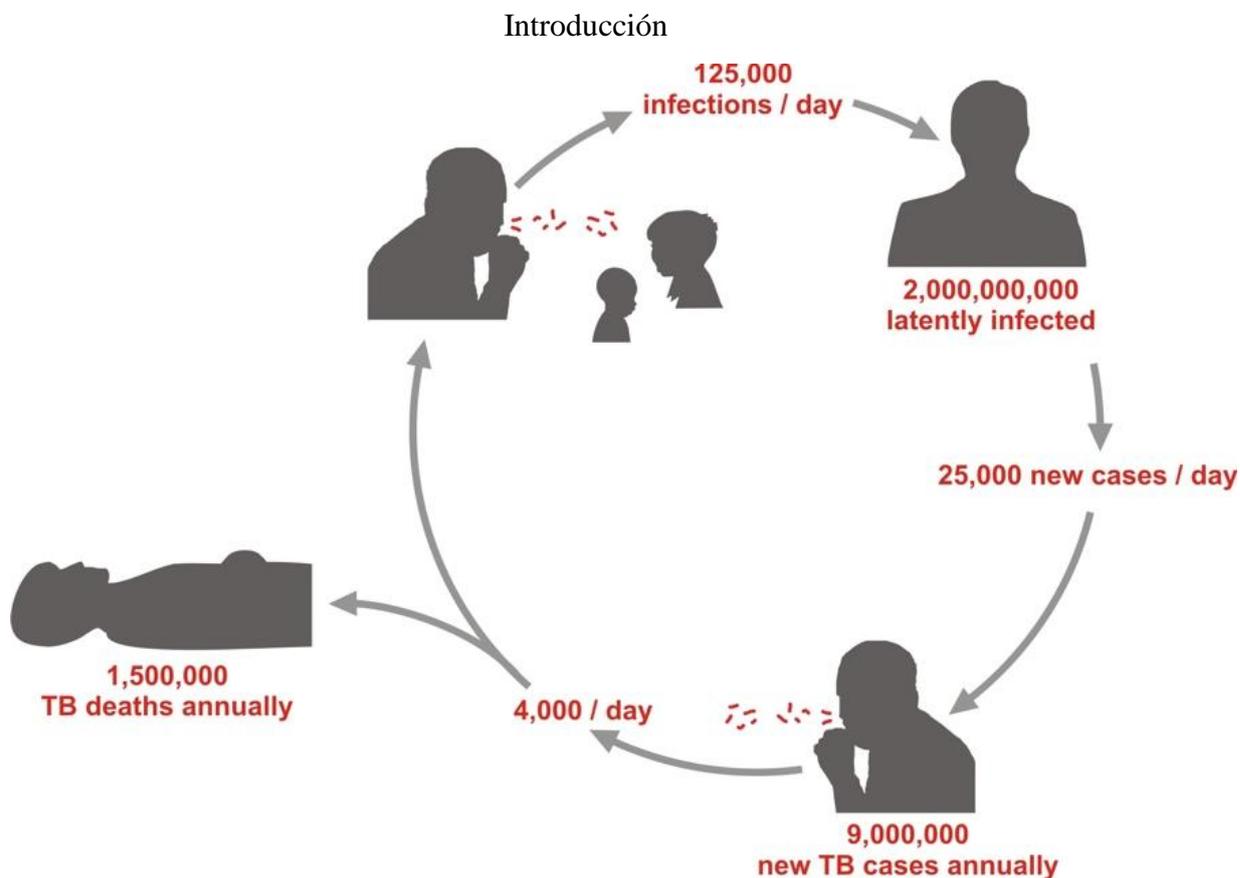


Fig. 4. Ciclo vital de *Mtb* y estadios de infección / enfermedad en el hospedador (tomado de Stefan H. E. Kaufmann, <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/research/immunology/programmes>).

Son aquellas formas de la enfermedad tuberculosa conocidas como bacilíferas las que presentan mayor riesgo de contagio (expulsan al exterior, fundamentalmente, a través de la tos, pequeñas gotas de aerosoles que contienen el bacilo). Por tanto, el mecanismo de transmisión es a través del aire y son las formas pulmonares, principalmente aquellas que presentan lesiones cavitadas en los pulmones, y las laríngeas las más contagiosas.

Factores como proximidad a un individuo contagioso, tiempo de exposición, ventilación, estado inmunitario, nutricional, etc. influyen notablemente en el riesgo de infección.

Aunque la infección por *Mtb* es necesaria, ésta no es suficiente para causar TBP en la mayoría de las personas. Aproximadamente un 90-95% de los individuos infectados por *Mtb* son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria lo suficientemente eficaz como para detener la progresión de la infección latente hacia una enfermedad tuberculosa activa. Esta susceptibilidad a la infección o enfermedad parece ser multifactorial, y el desarrollo de la enfermedad activa sería probablemente el resultado de una compleja interacción, influenciada por factores genéticos y ambientales, entre el patógeno y su hospedador. [15-21]

## 1.2. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

### 1.2.1. Patogénesis de la tuberculosis pulmonar: infección latente *versus* enfermedad activa

Tras la inhalación por parte de un individuo sano de las gotitas de saliva cargadas del bacilo *Mtb* procedentes de un individuo enfermo, estas llegan y se depositan en los alveolos distales. Se cree que es ahí donde los bacilos son reconocidos por diferentes células fagocíticas, principalmente los macrófagos alveolares, aunque también participan en este proceso otras células tales como neutrófilos, macrófagos derivados de monocitos reclutados del torrente sanguíneo y células dendríticas (CDs).

Algunas personas no son infectadas a pesar de una exposición prolongada frente a individuos con enfermedad tuberculosa activa. Esto se ha podido demostrar utilizando los ensayos cutáneos de tuberculina (TST), y más recientemente los ensayos de liberación de interferón-gamma (IGRA), más sensibles y específicos. [22]

La superficie externa de *Mtb* es relativamente compleja si se compara con la de otros patógenos (figura 5). [23]

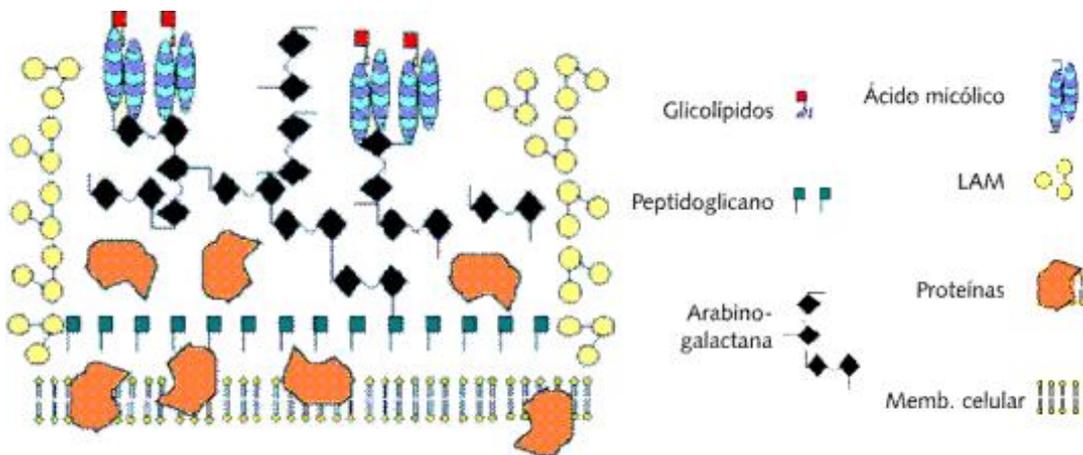


Fig. 5. Esquema de la pared celular de *Mtb*. Existe una bicapa lipídica tipo membrana citoplásmática que envuelve a la micobacteria y que se encuentra bajo una estructura de peptidoglicano rígido. Este peptidoglicano se encuentra unido a un cierto número de proteínas que también se unen a la membrana.

## Introducción

La membrana celular de *Mtb*, además de presentar características bioquímicas semejantes a las de cualquier membrana celular de otros microorganismos, se caracteriza por la presencia de derivados fosfolipídicos con un alto índice de glicosilación que dan lugar a un tipo de moléculas muy particulares, los lipoarabinomananos (LAM), los cuales parecen desempeñar un importante papel en la patogenia de la TB. [24]

La pared celular de *Mtb* está constituida fundamentalmente de lípidos y consta de cuatro capas:

-La capa interna formada por mureína o peptidoglicano, la cual le proporciona rigidez.

-Tres capas por encima de la anterior, formadas por polisacáridos, péptidos complejos y diferentes lípidos constituyendo una matriz muy homogénea.

La pared micobacteriana está formada por una estructura covalente de dos polímeros unidos entre sí, peptidoglicano y arabinogalactano, presentes aproximadamente en la misma proporción.

De todo el componente lipídico, un 50% está formado por ésteres de ácidos micólicos. Estos son ácidos grasos de estructura ramificada, de unos 50 a 90 átomos de carbono. Otro 25% corresponde a ácidos grasos de cadena corta o media, y el 25% restante a diferentes lípidos.

La capa más externa de la envoltura de *Mtb*, la cual le sirve de protección frente a numerosas agresiones exógenas, está formada principalmente de ácido micólico y glicolípidos, los cuales junto a varias de las proteínas de la pared son responsables de muchas de las propiedades antigénicas y patogénicas de estas micobacterias (Tabla 2).

## Introducción

Moléculas de origen lipídico de *M. tuberculosis* asociadas a la patogenia de la tuberculosis.

Glicolípido	Respuesta inmune del huésped	Patogénesis	Otras funciones
Peptidoglicano	Es antigénica y tiene patrones de reconocimiento para receptores fagocíticos.	Protege a la micobacteria, lisis por cambios osmóticos y por lisozima	Estructural, forma la pared celular
Ácido micólico	Evita la destrucción de micobacterias por mecanismos microbicidas del macrófago.	Forman una barrera impermeable que impide el acceso de sustancias hidrofílicas y fármacos	Es estructural y forma parte del mAGP en pared celular
Derivados del Ac. Micólico			
a) Factor cuerda	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmunomodulador</li> <li>• Toxina con actividad tumoricida</li> </ul>	Induce la producción de TNF en macrófagos y formación de granulomas. Bloquean el efecto de IFN gamma, IL-1 y TNF $\alpha$ en macrófagos e inhibe PKT. Inhiben la fusión del fagosoma con el lisosoma en macrófagos. Inhibición de la PKT	Es estructural en cápsula
b)SL	Activan neutrófilos y son antígenos de superficie		Antígeno soluble de cápsula
LOS	Antígeno de superficie	Participa en la unión de la micobacteria con los receptores del macrófago.	Estructural en cápsula. Tiene valor taxonómico.
GPL	Induce TNF- $\alpha$ y PGE2 en macrófagos	Inhibe respuesta linfoproliferativa	Antígeno de superficie de cápsula
PGL	Activa complemento	Inhibe respuesta linfoproliferativa y estallido respiratorio en macrófagos. Inhibe PKT	Antígeno estructural de cápsula
Derivados de PI PIM	Activan inmunidad específica de células NKT. Son presentados por CD1	Los PIM intervienen activamente en la interacción de la micobacteria con el macrófago y son precursores de LAM.	Son exclusivos de actinomicetales y se encuentran en la membrana
LAM	Es inmunomodulador y es presentado por CD1	Activa células T vía TRL y CD1	Tiene un gran espectro de funciones
AraLAM	Activa mecanismos microbicidas dependientes de TNF $\alpha$	Inhibición de PKT	LAM sin manosa terminal asociada a cepas no patógenas
ManLAM	Se une al RM, CD14	Induce TNF- $\alpha$ y producción de granuloma. Inhibición de PKT. Inhibe producción de citocinas proinflamatorias	LAM con manosa terminal, en cepas patógenas
PIMLAM o AraLAM	Se une a TLR-2	Induce la producción de citocinas proinflamatorias	

Abreviaturas: Sulfolípido de trehalosa (SL); Lipooligosacáridos (LOS); Glicopeptidolípidos (GPL); Fenolglicolípidos (PGL); Fosfatidil-inositol (PI); Fosfatidilinositolmanósidos (PIM); Lipoarabinomanana (LAM); Lipoarabinomanana con residuos terminales en manosa (ManLAM); Lipoarabinomanana sin residuos terminales de manosa (AraLAM); Receptores tipo Toll (TLR).

Tabla 2. Lípidos y derivados lipídicos de la envoltura de Mtb reconocidos por receptores celulares en la superficie de células del sistema inmune del hospedador implicados en la patogénesis de la TB. Tomado de Gorocica P y cols. [24]

## Introducción

El reconocimiento de *Mtb* por parte de las células del sistema inmune se realiza a través de numerosos receptores expresados fundamentalmente en la superficie de las células fagocíticas, los cuales reconocen las diferentes moléculas presentes en la envoltura de *Mtb*. [25]

Muchos de los ligandos reconocidos por estos receptores presentes en *Mtb* y el mecanismo por el que las células fagocíticas interiorizan el bacilo son conocidos. En algunos casos, se realiza mediante un fenómeno de opsonización (proceso por el que un anticuerpo se une a una proteína antigénica presente en la membrana de un patógeno a través de su fracción Fab, y a través de su componente Fc lo hace a una célula fagocítica, favoreciendo el proceso de fagocitosis).

Sin embargo, en otros casos, el mecanismo de entrada de *Mtb* en las células fagocíticas no está aún totalmente esclarecido.

De entre los receptores conocidos, merece la pena destacar:

A. Receptores no opsonizantes:

A.1. Receptores transmembrana tipo Lectina-C:

A.1.1. Recetor de manosas (CD207). Reconoce LAM cubierto de mananos, fosfatidil-inositol unido a mananos, arabinomanano, mananos, mananoproteínas.

La unión de estos ligandos a su receptor parece ejercer un efecto antiinflamatorio. Igualmente se cree que impiden la llegada de *Mtb* al lisosoma del macrófago.

A.1.2. DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin, CD209).

Reconoce LAM cubierto de mananos, fosfatidil-inositol unido a mananos, arabinomanano, lipomanano y el antígeno de 19-kD.

Al igual que en caso anterior, parecen ejercer un efecto antiinflamatorio. Además impiden la maduración de las CD impidiendo una adecuada formación del granuloma tuberculoide.

A.1.3. Dectina-1. Su ligando en *Mtb* es aún desconocido.

Se sabe que Dectina-1 reconoce  $\beta$ -glucanos en la pared de diferentes hongos interactuando con el receptor tipo Toll (TLR) de tipo 2 (TLR-2) en este reconocimiento.

## Introducción

### A.2. Receptores de la familia de las integrinas:

A.2.1. Receptor del Complemento tipo 3 (CD11b/CD18). Reconoce LAM cubierto de mananos, fosfatidil-inositol unido a mananos. Posee un dominio tipo lectina y participa en la captación de *Mtb* tanto no opsonizante como opsonizante.

### A.3. Receptores carroñeros (“scavenger”) (SRs):

A3.1. Clase A (SR-A1, MARCO).

A3.2. Clase B (CD36, SR-B1).

Se desconocen los ligandos en la superficie de *Mtb* de ambos tipos de SRs. Lo que sí se conoce de este tipo de receptores, es su gran capacidad de unión a un amplio número de ligandos presentes en la superficie de bacterias gram-positivas y gram-negativas (lipoproteínas, moléculas polianiónicas, etc.).

### B. Receptores opsonizantes:

#### B.1. Receptores de Complemento:

B.1.1. CR1 (CD35).

B.1.2. CR3 (CD11b/CD18, Mac-1).

Ambos unen iC3b, producto proteolíticamente inactivo, fruto de la excisión de C3b, pero que aún conserva capacidad opsonizante.

CR1 se encuentra en la superficie de linfocitos B, monocitos circulantes, neutrófilos y células foliculares dendríticas, todas ellas de gran importancia en la formación del granuloma tuberculoide. Es un receptor para el factor C1q del complemento, aunque también une C4b, C3b, iC3b y lectina de unión a manosas (MBL).

CR3 se encuentra en la membrana de los macrófagos. Es el principal receptor del sistema del complemento, y está implicado en la captación de *Mtb* opsonizado por proteínas del complemento. *Mtb* es capaz de activar la vía alterna del sistema del complemento y es opsonizado por C3b e iC3b.

## Introducción

### B.2. Colectinas (lectinas tipo C) solubles:

B.2.1. Proteína surfactante pulmonar A. Reconoce LAM cubierto de mananos, lipomano, glicoproteína de 60 kD y glicoproteína Apa.

B.2.2. Proteína surfactante pulmonar D. Reconoce LAM cubierto de mananos.

Ambas proteínas facilitan la aglutinación de *Mtb* lo cual hace que los macrófagos pulmonares internalicen mejor al patógeno.

B.2.3. Lectina de unión a manosa (MBL). Reconoce LAM cubierto de mananos y fosfatidilinositol unido a mananos.

El mecanismo sería similar a los anteriormente descritos. Existen estudios en los que parece evidenciarse que niveles disminuidos de MBL conferirían protección frente a la infección tuberculosa. [26]

### B.3. Receptores Fc:

B.3.1. Fc $\gamma$ R. Une la fracción Fc de la inmunoglobulina G (IgG), permitiendo la fagocitosis y posterior paso al compartimento lisosomal de *Mtb*.

Tras la entrada del bacilo en el fagocito, este se aloja en el fagosoma, donde se establecen complejas interacciones entre proteínas de *Mtb* y de la célula hospedadora que habitualmente impiden la maduración del fagosoma inhibiendo su actividad microbicida y degradadora. El éxito de estos mecanismos de inhibición determinarán si e *Mtb* permanecerá en el interior de las células en un estado de latencia con un nivel basal de replicación, proliferará lisando los fagocitos y extendiendo la infección dando lugar a enfermedad, o será eliminado. [27]

Una vez *Mtb* ha sido fagocitado, se inicia la formación del granuloma tuberculoso. Este es una organización estructurada de diferentes células del sistema inmune, principalmente macrófagos, pero también linfocitos T y B, CD4, neutrófilos y células natural killer (NK), e incluso fibroblastos. Todas ellas participan en respuesta al proceso infeccioso-inflamatorio pulmonar que se produce por la estimulación de las células hospedadoras a través de los antígenos micobacterianos. [28]

## Introducción

La formación del granuloma es iniciada por los macrófagos que residen en los alveolos pulmonares, quienes fagocitan los bacilos tuberculosos y liberan citocinas proinflamatorias, entre las que destaca el factor de necrosis tumoral de tipo alfa (TNF- $\alpha$ ). [29]

Dentro del granuloma, los macrófagos se diferencian hacia células epitelioides o se fusionan dando lugar a células gigantes multinucleadas, rodeadas por linfocitos T CD4+ que son capaces de incrementar la capacidad bactericida de los macrófagos a través de la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). [30,31]

En estadios finales de la formación del granuloma, un estrecho manto de fibroblastos engloba el mismo. Parece ser que la apropiada configuración del granuloma es la que determinará el resultado de la infección por *Mtb* (figuras 6 y 7). [30]

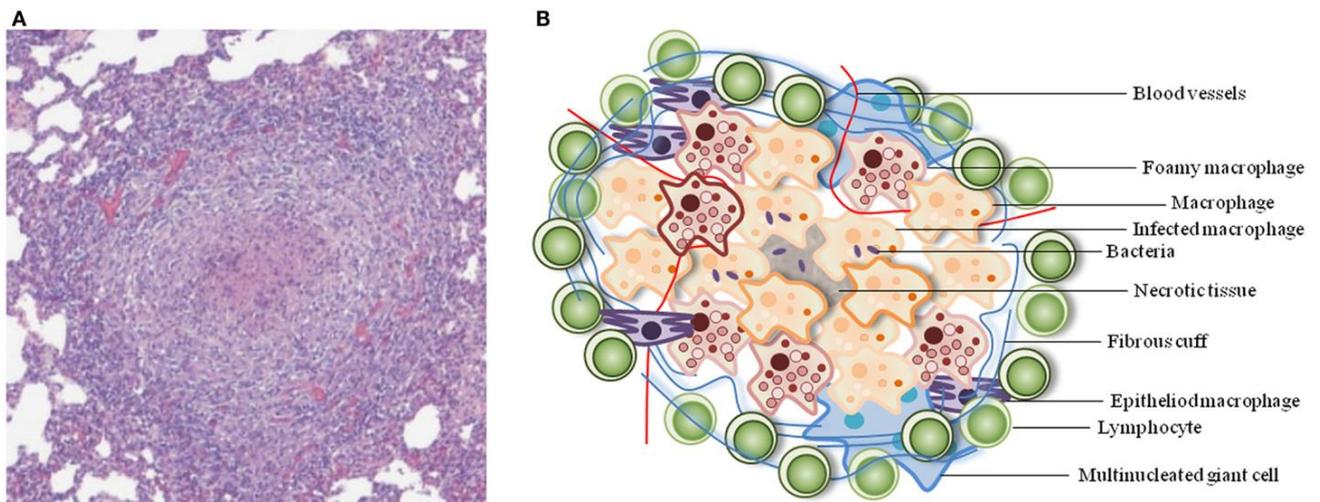
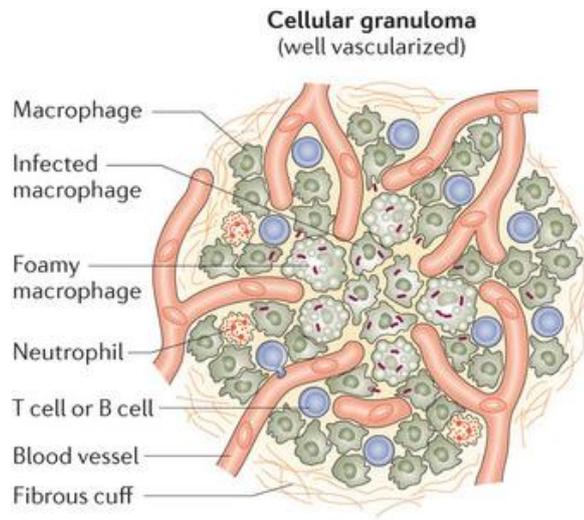
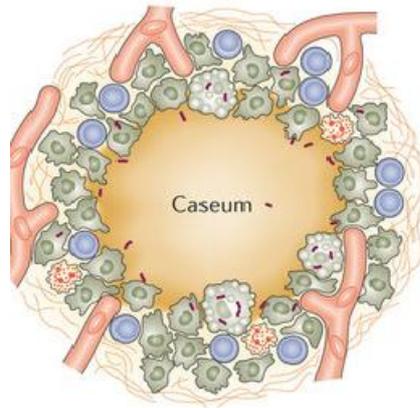


Fig. 6. Estructura típica del granuloma tuberculoso. (A) Ejemplo de un granuloma con necrosis central en tejido pulmonar. (B) Esquema de los constituyentes celulares de un granuloma tuberculoso. Tomado de Front Immunol. 2013 Apr 22;4:98. doi: 10.3389/fimmu.2013.00098.

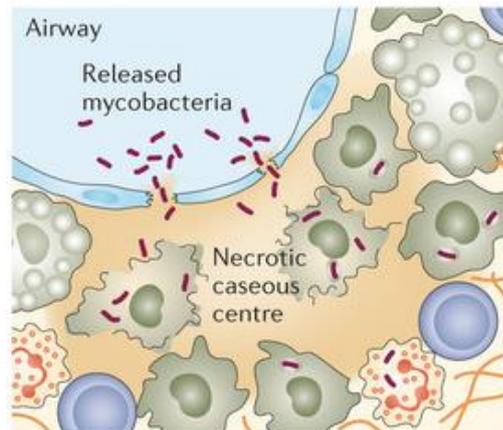
# Introducción



**Necrotic granuloma**  
(lack of vascularization in caseum)



**Cavity**  
(in contact with airway)



## Introducción

Fig. 7. Proceso evolutivo del granuloma tuberculoso en la TBP. El granuloma, inicialmente denominado granuloma celular, consta de un gran número de células del sistema inmune inicialmente y está muy vascularizado. *Mtb* se encuentra en el medio extracelular y dentro de los macrófagos espumosos activados. A medida que madura, comienza un proceso de necrosis desde el centro hacia la periferia con una disminución progresiva de la vascularización (esta persiste en el anillo fibroso y en la capa celular) *Mtb* se encuentra en el caseum necrótico y en el interior de células del sistema inmune. Cuando un granuloma encuentra una vía aérea, el centro necrótico se fusiona a ella y forma una cavidad o caverna. En este momento las micobacterias se encuentran en el medio extracelular, en el caseum de la caverna y dentro de macrófagos y neutrófilos. Tomado de Nature Reviews Microbiology 2014;12:159-167.

### 1.2.2. Factores de predisposición-resistencia a la infección / enfermedad

En aproximadamente un 90% de las personas infectadas por *Mtb*, la respuesta del sistema inmunitario es suficiente para prevenir la enfermedad tuberculosa. [32-34] La supervivencia de *Mtb* en el interior del granuloma se acompaña de una serie de cambios en el metabolismo de la micobacteria y en las propias células hospedadoras. Estos cambios son producidos en parte por la acción de proteínas y glicolípidos de *Mtb*. [35,36] En el interior del granuloma, *Mtb* está continuamente sometido a situaciones de estrés metabólicas: hipoxia, déficit de nutrientes, pH ácido, liberación de óxido nítrico, los cuales inhiben procesos respiratorios, etc. Estos mecanismos le induce a permanecer en un estado de latencia, minimizando su metabolismo y actividad de replicación, al igual que inhibiendo su crecimiento y desarrollo. Todo ello le hace evadir el ataque y eliminación por parte de las células del sistema inmune del individuo infectado. [25,37,38] En el interior del granuloma, los macrófagos cargados de pequeñas gotas de lípidos (los llamados “macrófagos espumosos”) constituyen un reservorio rico en nutrientes para mantener la supervivencia de los bacilos tuberculosos en estado de latencia. [39]

Como resumen de lo anteriormente expuesto podemos decir que en la mayor parte de las personas que padecen una primoinfección por *Mtb*, se induce el desarrollo de mecanismos inmunitarios del denominado sistema inmune adquirido, mediado por células del sistema inmunológico, que inhiben el crecimiento de las micobacterias pero que no logran su total erradicación. A este estado, se le denomina infección tuberculosa latente (ITL). En estos individuos, los bacilos tuberculosos persisten en un estado de “aletargamiento”.

Tras permanecer dormidos durante años, los bacilos tuberculosos pueden de nuevo modificar su metabolismo. Este proceso de reactivación, influiría sobre la presión del granuloma, y daría lugar

## Introducción

a un proceso de muerte celular por necrosis. [35] Como se mencionó anteriormente, en la infección por *Mtb*, la correcta formación del granuloma es crucial para limitar el crecimiento de las micobacterias, al igual que para evitar el daño tisular y la diseminación, dos componentes claves de la enfermedad tuberculosa activa.

Existen diferentes fenotipos de granulomas que se relacionan con el estado de latencia / actividad de *Mtb* (granuloma sólido en la infección latente vs granuloma necrótico y granuloma caseoso en la enfermedad activa o caseoso-fibrótico en la residual). [39] En la ITL predominan los bacilos “dormidos” y sólo un pequeño número de bacilos permanecen “vigilantes” en busca de señales del ambiente a su alrededor que estimulen su crecimiento, el cual se mantiene en un estado mínimo (replicación residual), en el interior del granuloma.

Algunas micobacterias despiertan al azar para mantener ese grupo de vigías. Cuando el microambiente que rodea el granuloma proporciona condiciones más favorables para inducir la formación de un granuloma caseificante, las micobacterias vigilantes despiertan a las micobacterias dormidas probablemente a través de la secreción de factores promotores de la resucitación. [39]

Unas pocas micobacterias permanecerían aún dormidas, lo cual podría explicar su resistencia a los fármacos antituberculosos y el largo tiempo necesario para curar la TBP activa. Del mismo modo, estos bacilos dormidos también serían más resistentes a su eliminación a través de mecanismos inmunológicos efectores.

Por otro lado, se ha demostrado en modelos murinos que una expresión insuficiente de moléculas de adhesión en los linfocitos circulantes puede dificultar la localización de linfocitos específicos frente a antígenos de *Mtb* en los pulmones de individuos infectados. Como resultado de esto, la formación de un granuloma de manera adecuada capaz de inhibir el crecimiento de *Mtb* se ve afectada. [40]

Factores dependientes tanto del patógeno (factores de virulencia distintos según las cepas, lipoproteínas y glicolípidos de *Mtb*, etc.) como del hospedador son capaces de generar un desbalance a favor o en contra de la progresión desde un estado de latencia hacia una enfermedad activa o contribuir al establecimiento de la enfermedad activa desde el inicio de la infección.

## Introducción

De este modo, la respuesta del linfocito T dentro del granuloma depende fundamentalmente de los mecanismos de presentación antigénica.

Existen varias moléculas de *Mtb*, como la lipoproteína de 19-kDa, el complejo manosa unida a LAM, dimicolato de trehalosa y otras, que pueden modular el procesamiento antigénico y la presentación en superficie de proteínas de las micobacterias y de antígenos glicolipídicos a través de moléculas de histocompatibilidad de clase I y II (MHC clase I y II) y otras moléculas presentadoras. [41]

De esta forma, los bacilos tuberculosos pueden ejercer un efecto supresor en los macrófagos impidiendo la presentación de antígenos de *Mtb* a linfocitos T. [42,43]

Debido a lo anterior, una activación insuficiente de células CD4+ y CD8+ efectoras y citolíticas da lugar a una función microbicida defectuosa por parte de estas últimas y de los macrófagos, lo cual implicaría una mayor respuesta inflamatoria que conduciría a un incremento del daño tisular facilitando la diseminación de *Mtb*. [41-44]

Según numerosos estudios epidemiológicos, se sabe que el riesgo de reactivación de la ITL en sujetos inmunocompetentes es aproximadamente de un 5-10% a lo largo de la vida. [34,45] Además, este riesgo de evolucionar a una enfermedad activa se produce en los 5 primeros años tras la infección en un 50% de los sujetos infectados. Sin embargo, los factores que favorecen la progresión de la enfermedad no son totalmente conocidos. [46,47]

Dentro de los que sí son conocidos, destacan los siguientes: coinfección con VIH, tratamientos con inmunosupresores y corticoides, tratamientos biológicos con anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , tratamientos antineoplásicos, malnutrición, tabaco, alcoholismo, cáncer, diabetes e insuficiencia renal. [27, 34,48] Sin embargo, en la mayor parte de los casos, la causa específica de la reactivación es desconocida. [47]

### **1.2.3. La respuesta inmune innata frente a *Mycobacterium tuberculosis***

Actualmente, los motivos que determinan si un individuo infectado por *Mtb* va a desarrollar una enfermedad activa mientras otros no lo harán, y permanecerán como personas con ITL no son del todo conocidos.

## Introducción

El papel que juegan los factores “innatos” o congénitos en la susceptibilidad frente a *Mtb* fue evidenciado hace muchos años, en 1926, de manera accidental tras un episodio ocurrido en la ciudad alemana de Lübeck. Un grupo de niños recién nacidos recibieron por error, bacilos vivos de *Mtb* en lugar de la vacuna de Calmette-Guérin (BCG). Algunos de esos niños enfermaron gravemente, mientras otros no sufrieron patología alguna. [49] Esto sugirió que al menos algunos individuos tenían respuestas inmunes eficaces frente a *Mtb*, y que estas podrían determinar en parte el resultado de la infección. Además, al carecer aún de una inmunidad adquirida madura también permitiría concluir que la inmunidad innata del hospedador jugaría un papel importante en la defensa frente a las micobacterias.

Tras la inhalación de *Mtb*, éste llega a los alveolos pulmonares e infecta los macrófagos alveolares estableciendo el inicio de la infección. El hospedador, por su parte, inicia una serie de mecanismos de defensa a través de una secuencia de eventos de activación de su sistema inmunitario. Estos eventos son una combinación de mecanismos pertenecientes a las respuestas inmunes innata y adquirida. Los mecanismos de la respuesta inmune adquirida, fundamentalmente mediados por respuestas inmunitarias de tipo Th1 a través de la producción de IFN- $\gamma$  han sido bien esclarecidos y hablaré de ellos más adelante.

Existen múltiples vías de reconocimiento y señalización celular, fundamentalmente en las células presentadoras de antígeno pertenecientes al llamado sistema inmune innato. El objetivo no es abarcar todas ellas, por las que nos centraremos en algunas de las más importantes.

Habitualmente, el inicio de la respuesta inmune innata comienza con el reconocimiento de patrones de estructuras microbianas denominadas “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMP). El reconocimiento de estos PAMPs se lleva a cabo principalmente por una serie de receptores expresados en células del sistema inmune y denominados “receptores de reconocimiento de patrones” (PRRs). [50] A continuación, se exponen algunos de los principales receptores implicados en este tipo de reconocimiento.

### **1.2.3.1. Receptores tipo Toll (TLRs)**

Los receptores tipo Toll (o Toll-like receptor TLRs) constituyen uno de los grupos más importantes del sistema inmune innato. Son receptores y reconocen los PAMPs expresados en un gran número de microorganismos dando lugar a un gran número de respuestas inflamatorias. Se conocen actualmente 13 TLRs, y cada uno de ellos reconoce diferentes ligandos en la

## Introducción

superficie o compartimentos de distintos tipos de microorganismos (Tabla 3). Igualmente, estos TLRs se expresan en diferentes tipos celulares.

Receptor	Ligand	Origin of ligand
TLR1	Triacyl lipopeptides Soluble factors	Bacteria and mycobacteria <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoprotein/lipopeptides Peptidoglycan Lipoteichoic acid Lipoarabinomannan Phenol-soluble modulín Glycoinositolphospholipids Glycolipids Porins Atypical lipopolysaccharide Atypical lipopolysaccharide Zymosan Heat-shock protein 70*	Various pathogens Gram-positive bacteria Gram-positive bacteria Mycobacteria <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Fungi Host
TLR3	Double-stranded RNA	Viruses
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol Fusion protein Envelope protein Heat-shock protein 60* Heat-shock protein 70* Type III repeat extra domain A of fibronectin* Oligosaccharides of hyaluronic acid* Polysaccharide fragments of heparan sulphate* Fibrinogen*	Gram-negative bacteria Plants Respiratory syncytial virus Mouse mammary-tumour virus <i>Chlamydia pneumoniae</i> Host Host Host Host
TLR5	Flagellin	Bacteria
TLR6	Diacyl lipopeptides Lipoteichoic acid Zymosan	<i>Mycoplasma</i> Gram-positive bacteria Fungi
TLR7	Imidazoquinoline Loxoribine Bropirimine Single-stranded RNA	Synthetic compounds Synthetic compounds Synthetic compounds Viruses
TLR8	Imidazoquinoline Single-stranded RNA	Synthetic compounds Viruses
TLR9	CpG-containing DNA	Bacteria and viruses
TLR10	N.D.	N.D.
TLR11	N.D.	Uropathogenic bacteria

Tabla 3. TLRs y sus ligandos. Tomado de Akira S y Takeda K. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.

En la respuesta inmune frente a las micobacterias, TLR1, 2, 4, 6 y 9 parecen ser los más relevantes (figura 8). [51]

## Introducción

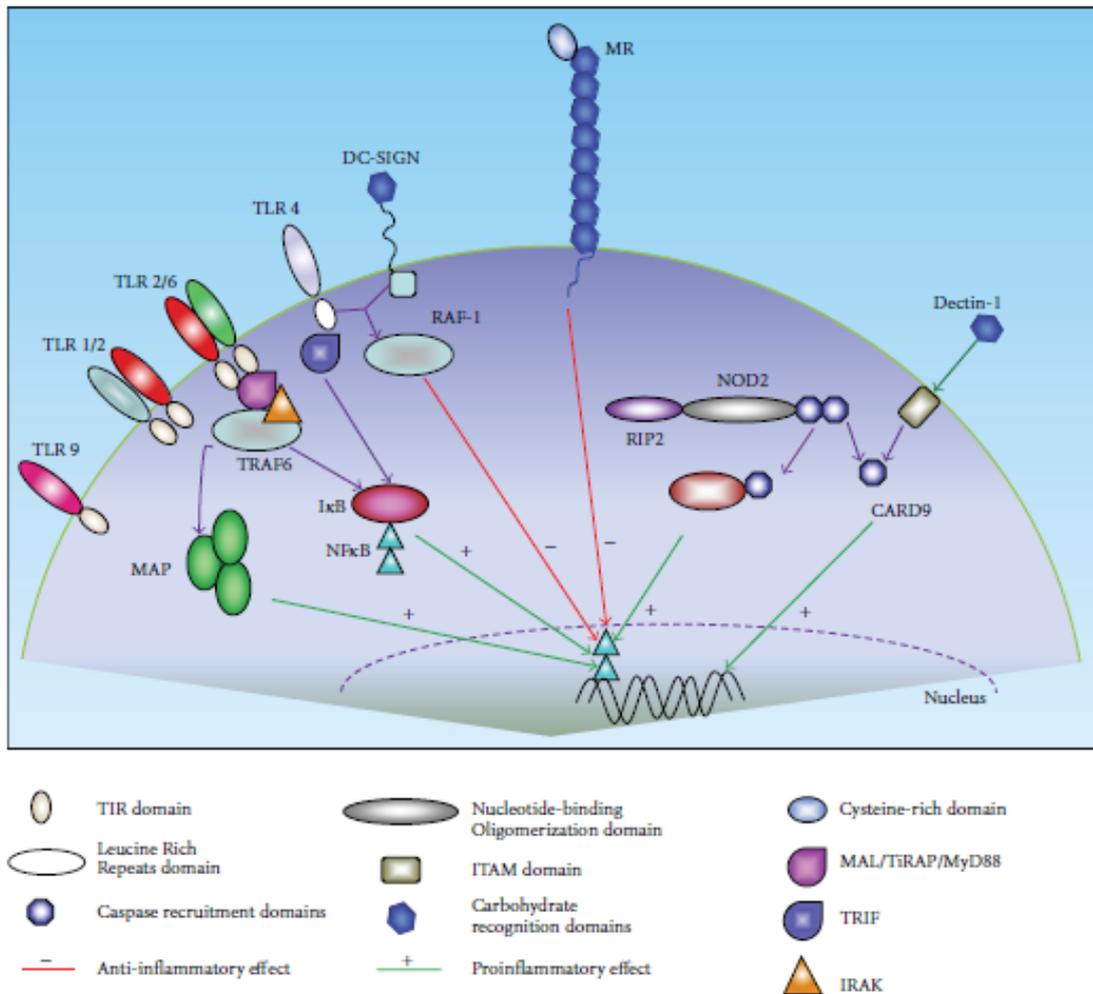


Fig. 8. PRRs en el reconocimiento de *Mtb* y vías de señalización. (tomado de Kleinnijenhuis J et al. Clin Dev Immunol 2011, doi:10.1155/2011/405310).

De hecho, existen numerosos estudios sobre la relación entre TLR2 y TLR4 y la TB. Como TLR2 forma heterodímeros con TLR1 o TLR6 y el resultado de la formación de los mismos permite el reconocimiento de varios PAMPs en la superficie de las micobacterias (diacil-lipopéptidos y peptidoglicanos), [52,53] parecería evidente pensar que defectos en estos genes podrían influir sobre el reconocimiento de estos ligandos en la superficie de *Mtb*. De este modo, se alteraría la respuesta inmune innata del hospedador frente a *Mtb* afectando por tanto a la susceptibilidad frente a la infección tuberculosa.

Tras la interacción de los ligandos presentes en la pared de las micobacterias con los distintos TLRs, las vías de señalización son activadas. En ellas participan importantes proteínas citoplasmáticas: molécula adaptadora 88 de respuesta primaria en diferenciación mieloide (MyD88), cinasas tales como la cinasa asociada al receptor de la interleucina-1 (IRAK), factor 6 asociado al receptor del TNF- $\alpha$  (TRAF 6), cinasa activada por TGF- $\alpha$  (TAK1) y proteína

## Introducción

activada por mitógenos (MAPK), originando una cascada de señales que llevan a la activación de factores de transcripción nucleares, fundamentalmente (NF)- $\kappa$ B. [54]

Los heterodímeros TLR1/TLR2 y TLR2/TLR6 anteriormente mencionados han sido involucrados en el reconocimiento de glicolípidos de la pared celular de *Mtb*, concretamente LAM, lipomanano, glicoproteínas micobacterianas de 19 y 38 kDa, y lipoproteínas como el manósido fosfatidilinositol triacilado (TLR1/TLR2) o diacilado (TLR2/TLR6). [55,56]

Se piensa que TLR2, a través de un efecto estimulador sobre la producción de TNF- $\alpha$  por parte de los macrófagos infectados por *Mtb*, jugaría un papel importante en las fases iniciales de la respuesta inmune innata. [57] Igualmente, induciría la producción de interleucina-12 (IL-12) en estas mismas células. [58]

Evidencias experimentales apoyarían el papel importante de TLR2 en la defensa frente a la infección tuberculosa: ratones modificados genéticamente TLR2  $-/-$  (“ratones knockout”) muestran defectos en la formación de granulomas tras ser infectados con altas dosis de *Mtb* y además tienen una gran susceptibilidad frente a la enfermedad comparados con cepas normales (“wild-type”). [59]

Efectos igualmente importantes jugaría otro TLR, TLR4, como lo demostrarían datos obtenido en modelos experimentales murinos. [60].

### **1.2.3.2. Lectina de unión a manosa (MBL)**

La MBL es una proteína perteneciente a un grupo de proteínas denominadas colectinas que presentan dominios de colágeno y de tipo lectina (dominios de reconocimiento de carbohidratos). MBL es una lectina tipo C que contiene muchos de estos últimos dominios, y que es capaz de unir beta-glucanos presentes en la superficie de un gran número de microorganismos y activar la cascada del complemento a través de la denominada vía de las lectinas. Se comportaría así como una molécula soluble con actividad de PRR. [61]

MBL se sintetiza en el hígado, y aunque predominantemente circula como una proteína en el suero, puede ser detectada también en otras muchas localizaciones (oído medio, líquido sinovial, líquido amniótico, secreción nasofaríngea, etc.).

En la figura 9 se puede observar la estructura del gen que codifica la MBL (*MBL2*).

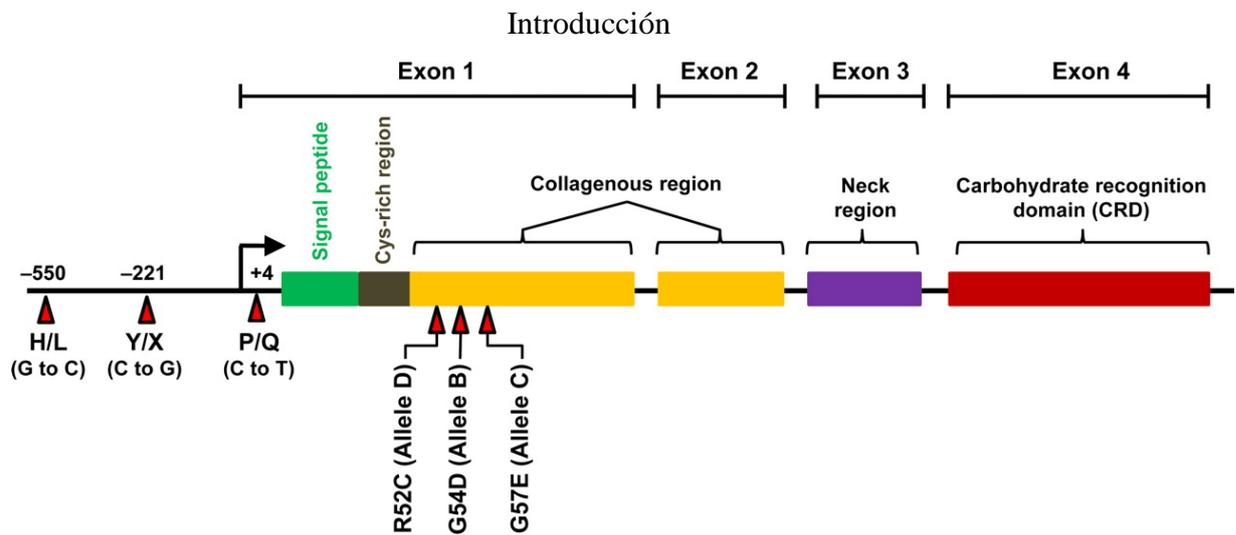


Fig. 9. Organización estructural del gen *MBL2* mostrando los polimorfismos en el promotor y las variantes estructurales en el exón 1 del gen, los cuales determinan sus niveles de expresión.

La expresión de MBL funcional (formando oligómeros) viene determinada genéticamente. Tres variantes estructurales en el exón 1 del gen, localizadas en las posiciones 52, 54 y 57 dan lugar a sustituciones de aminoácidos en la proteína: arginina/cisteína, glicina/ácido aspártico y glicina/ácido glutámico respectivamente. Estas sustituciones ocurren en el dominio tipo colágeno de la proteína, lo cual hace que la MBL sea incapaz de oligomerizarse impidiendo por tanto que ejerza su función. Estas mutaciones o variantes estructurales se denominan *D*, *B* y *C* respectivamente. La variante normal es denominada *A*. Las variantes estructurales son denominadas en conjunto variantes *O*.

Igualmente, en la región promotora del gen, existen dos polimorfismos (*H/L* y *X/Y*) que también determinan los niveles séricos de la proteína regulando la expresión de la misma. Un tercer polimorfismo (*P/Q*) situado en la posición +4 del gen es también identificado, aunque su papel es menos conocido. [62]

Debido al elevado desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos del promotor y las variantes estructurales del exón 1 del gen *MBL2*, se pueden generar 7 haplotipos:

- HYPA
- LYPA
- LXPA
- LYQA
- HYPD
- LYPB
- LYQC.

## Introducción

La combinación de estos 7 haplotipos da lugar a 28 posibles diplotipos o genotipos. [63]

La presencia de otros dos raros haplotipos, *HXPA* y *LYPD*, ha sido también descrita, pero su frecuencia es extremadamente rara y su relación con los niveles séricos de MBL no es muy clara.

Por otro lado, cabe señalar que MBL interviene en la defensa frente a los microorganismos infecciosos a través de facilitar su fagocitosis de forma directa además de activando el complemento por la vía de las lectinas. Recientemente, se ha descubierto un nuevo papel de la MBL actuando de forma sinérgica, como un correceptor del dímero TLR2/TLR6 en el interior de la célula, direccionando la señalización intracelular. [64]

Los diferentes genotipos de *MBL2* se asocian con diferentes niveles de expresión y concentración sérica de MBL. A su vez, estos distintos niveles de MBL en suero han sido relacionados con diversas patologías tanto en humanos como en modelos experimentales, incluida la susceptibilidad a la infección por *Mtb*, en este último caso, con resultados controvertidos. [65-69]

### 1.2.3.3. Dectina-1 / CARD9

Dectina-1, otro miembro de los receptores de lectina tipo C y PRR, presenta un dominio extracelular de reconocimiento de carbohidratos (beta-glucanos), y un dominio intracelular ITAM (motivo de inmunorreceptor activable por tirosina). Inicialmente, tras su identificación, se pensó que sólo se expresaba en la superficie de las CDs, pero posteriormente se vio que también se encontraba en la superficie de monocitos, macrófagos, neutrófilos y un subtipo de linfocitos T. [70] En humanos, Dectina-1 también puede encontrarse en linfocitos B, eosinófilos y mastocitos.

Los niveles de expresión de Dectina-1 pueden verse modificados por diversos factores. [71] Así, IL-4, IL-13 y GM-CSF estimulan su expresión, mientras que IL-10, lipopolisacáridos bacterianos y corticoides la inhiben.

Dectina-1 reconoce principalmente beta-glucanos, los cuales se comportan como PAMPs de tipo carbohidrato), presentes en la superficie de diferentes hongos patógenos (*Candida*, *Pneumocystis*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Coccidioides*, etc.). Sin embargo, se ha sugerido que también jugaría un papel en el reconocimiento de micobacterias, incluida *Mtb*, las cuales no

## Introducción

poseen en su pared beta-glucanos (algo controvertido en *Mtb*, [72]), por lo que el / los PAMP que dan lugar a su reconocimiento a través de Dectina-1 en estos microorganismos son aún desconocidos, sugiriendo que este reconocimiento tendría lugar fruto de una interacción entre Dectina-1 y TLR2. [73-75]

Recientemente, se ha objetivado la importancia de Dectina-1 en el reconocimiento de *Mtb*, independientemente del papel de TLR2. [76]

De los datos anteriormente expuestos se deduce por tanto el importante papel que Dectina-1 jugaría en la inmunidad frente a los hongos. De hecho, existen evidencias de que variaciones genéticas en el gen *CLEC7A*, que codifica la Dectina-1, dan lugar a una susceptibilidad frente a infecciones fúngicas severas tanto en humanos como en modelos experimentales. [77-79]

Tras el reconocimiento de los beta-glucanos presentes en la superficie de distintos patógenos, fundamentalmente hongos, se inician una serie de eventos de señalización intracelular que implican la activación y participación de una serie de proteínas adaptadoras entre las que destacan la tirosin-cinasa de bazo (Syk), y el miembro 9 de la familia con dominios para el reclutamiento de caspasas (CARD9), además de Bcl-10 y Malt1, los cuales activan el factor de transcripción nuclear NF-kB. [80,81]

Por tanto, el reconocimiento de beta-glucanos en la pared de ciertos hongos, y probablemente de otras moléculas aún no conocidas en la superficie de micobacterias daría lugar a una serie de respuestas celulares en el hospedador, favoreciendo la captación y muerte del patógeno, y a la producción de citosinas inflamatorias y quimiocinas. Se ha demostrado que Dectina-1 estimula la producción de IL-10, una citocina anti-inflamatoria, lo cual no sería conveniente en procesos infecciosos, por lo que se cree que su papel sería el de regular el daño tisular inducido durante la inflamación. [77]

Dectina-1 es capaz de activar otras rutas del sistema inmune adquirido, incluyendo respuestas Th1, Th17 y activación de linfocitos citolíticos, aunque estos mecanismos de activación aún no han sido esclarecidos en su totalidad.

### **1.2.4. La respuesta inmune adquirida frente a *Mycobacterium tuberculosis***

### **1.2.4.1. El Complejo Principal de Histocompatibilidad. [82,83]**

Al igual que existe una respuesta inmune innata, la cual no es específica de ningún tipo de patógeno en concreto, existe otro tipo de respuesta inmune, denominada adquirida o adaptativa. En esta, el antígeno es reconocido por dos grupos distintos de moléculas receptoras altamente polimórficas, es decir, de una enorme variabilidad: por un lado las inmunoglobulinas de superficie que sirven como receptores antigénicos de los linfocitos B, y por el otro lado el receptor específico de antígeno del linfocito T. Los linfocitos T sólo reconocen antígenos que son expresados en la superficie celular.

Estos antígenos pueden derivar de patógenos que se replican en el interior de las células (virus o bacterias intracelulares), o de microorganismos o de sus productos que las células han captado del medio extracelular. En este último caso, las células muestran en su superficie fragmentos peptídicos derivados de dichos microorganismos, y de este modo la presencia de células infectadas y los antígenos extraños pueden ser detectadas por los linfocitos T.

Los péptidos derivados de los patógenos son llevados a la superficie celular por glicoproteínas especializadas, las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Estas moléculas son codificadas por un gran grupo de genes complejos, que son los genes del MHC.

Dentro de las llamadas células presentadoras de antígenos, las proteínas procedentes de diferentes patógenos son degradadas en péptidos que son llevados a la superficie unidos a moléculas MHC. Existen dos tipos de moléculas MHC conocidas como MHC de clase I y MHC de clase II, las cuales se unen a los péptidos en diferentes localizaciones.

De un modo simplificado, aquellos péptidos derivados del citosol son transportados hacia el retículo endoplásmico donde se unen a moléculas de clase I recién sintetizadas, y posteriormente transportadas a la superficie celular. Este complejo MHC de clase I-péptido es reconocido por linfocitos T CD8.

Los péptidos derivados de la degradación proteica en los endosomas intracelulares se unen a moléculas MHC de clase II, llevados a la superficie celular y son reconocidos por linfocitos T CD4 (figura 10).

## Introducción

Las células CD4 y CD8 tienen una gran variedad de funciones eficaces frente a diferentes tipos de patógenos. Por tanto, la clase de molécula MHC que presente péptidos de un patógeno será crucial en asegurar su reconocimiento por parte del linfocito T, CD4 o CD8, la cual será capaz, en condiciones normales, de eliminar a dicho patógeno.

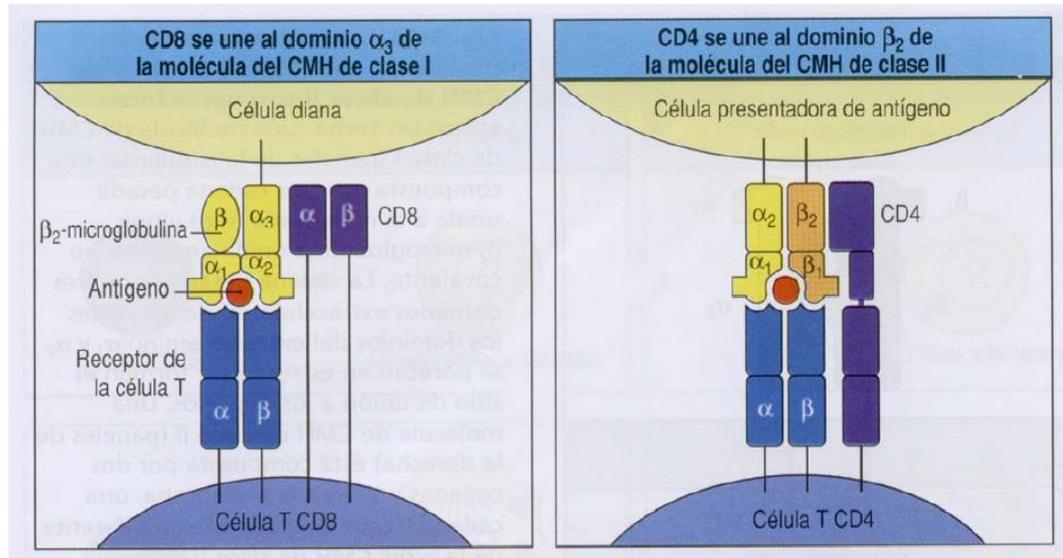


Fig. 10. Presentación del antígeno-MHC clase I y II a los linfocitos T CD4 o CD8

Independientemente de si hay o no un proceso infeccioso, las moléculas MHC unen de forma rutinaria péptidos derivados de proteínas propias (autoantígenos) y los expresan en la superficie celular. Existen complejos mecanismos de tolerancia que hacen que estos péptidos no sean reconocidos por los linfocitos. En ocasiones, estos mecanismos se ven alterados, dando lugar a fenómenos autoinmunes.

Los genes que codifican las proteínas del MHC constituyen una familia de genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 (Figura 11). En humanos, los genes del MHC conforman el denominado sistema HLA (del inglés human leukocyte antigen), porque estas proteínas se descubrieron como antígenos en los leucocitos, que podían detectarse con anticuerpos.

## Introducción

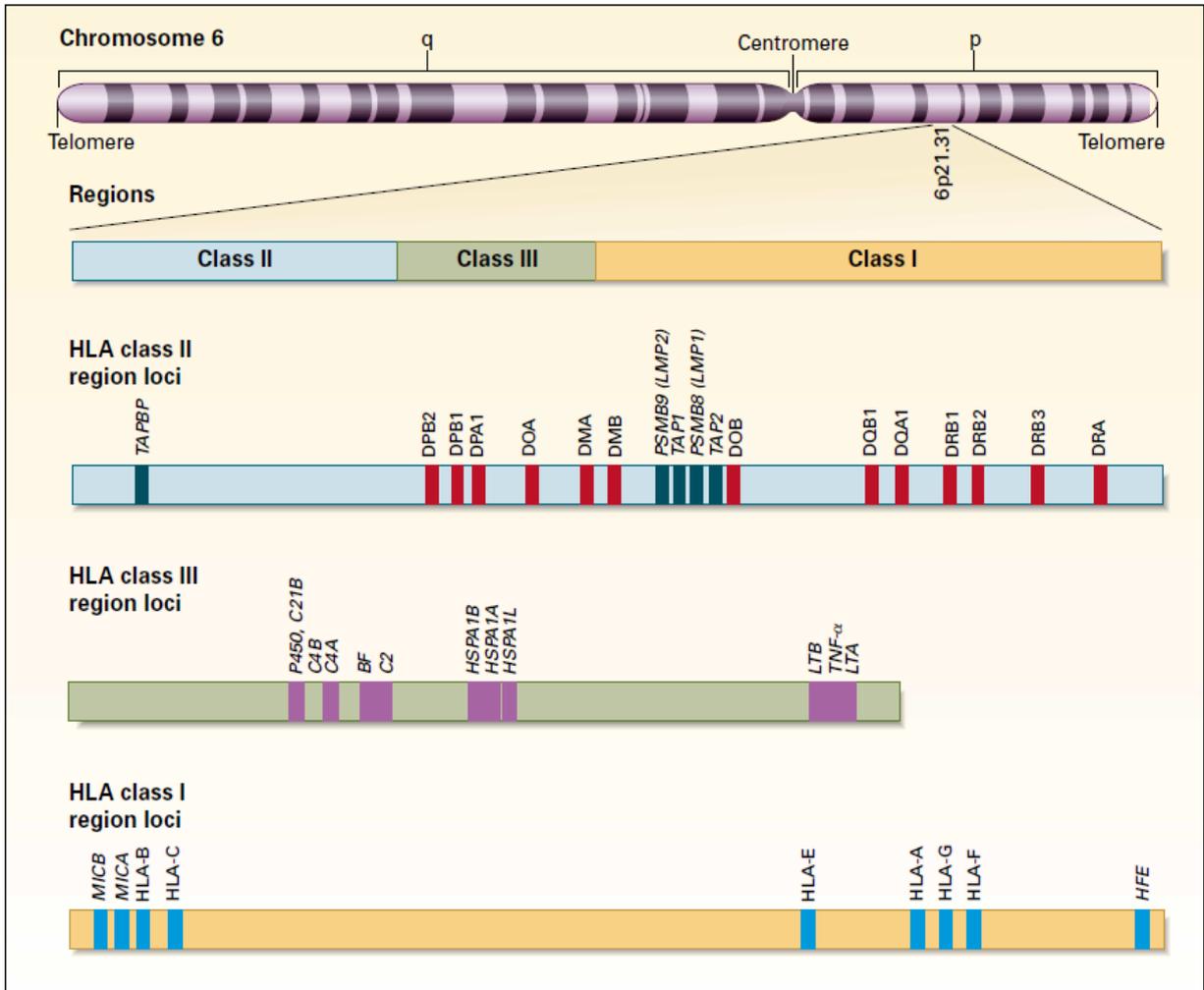


Fig. 11. Organización de los genes del *MHC* o *HLA* en el cromosoma 6. Tomado de N Engl J Med 2000;343:702-709. [84]

Los genes del MHC de clase I codifican glicoproteínas, con estructura de inmunoglobulina: presentan una cadena pesada tipo  $\alpha$  que se subdivide en tres regiones:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . Estas tres regiones están expuestas al espacio extracelular y unidas a la membrana de la célula mediante una región transmembrana. La cadena  $\alpha$  está siempre asociada a una molécula de  $\beta 2$  microglobulina, que esta codificada por una región independiente en el cromosoma 15.

La principal función de los proteínas MHC o HLA de clase I es la presentación de péptidos antigénicos intracelulares a los linfocitos T citolíticos (CD8+). El péptido antigénico se aloja en una hendidura que se forma entre las regiones  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la cadena pesada.

## Introducción

En humanos, existen muchos isotipos (genes diferentes) de las moléculas de clase I, que pueden agruparse en:

- "clásicas", cuya función consiste en la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8: dentro de este grupo tenemos HLA-A, HLA-B y HLA-C.
- "no clásicas" (también llamadas MHC clase IB), con funciones especializadas: no presentan antígenos a los linfocitos T, sino que se unen a receptores inhibidores de las células NK; dentro de este grupo se encuentran HLA-E, HLA-F, HLA-G.

Los genes del MHC de clase II codifican glicoproteínas con estructura de inmunoglobulina, pero en este caso el complejo funcional está formado por dos cadenas, una  $\alpha$  y una  $\beta$  (cada una de ellas con dos dominios,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ).

Cada una de las cadenas está unida a la membrana por una región transmembrana, y ambas cadenas están enfrentadas, con los dominios 1 y 2 contiguos, en el exterior celular (figura 12).

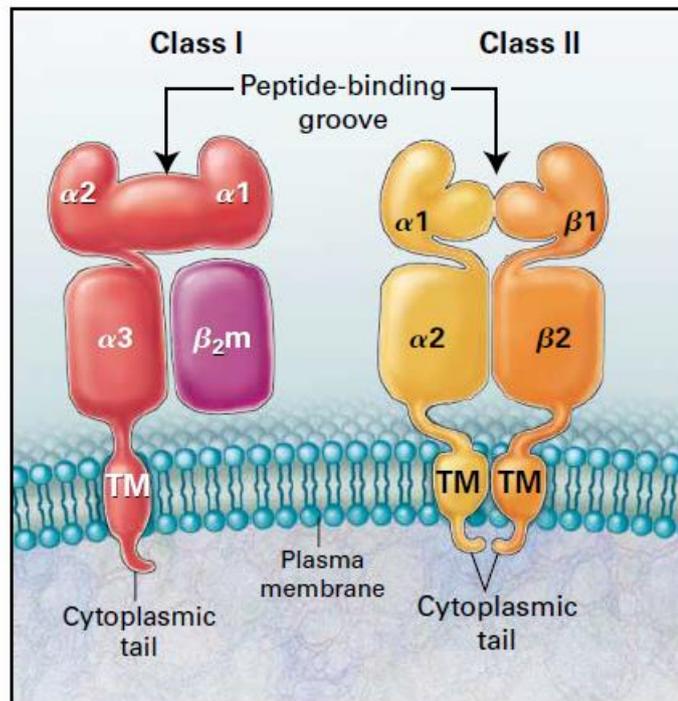


Fig. 12. Estructura de las moléculas MCH de clase I y II. Tomado de N Engl J Med 2000;343:702-709. [84]

## Introducción

La  $\beta$ 2-microglobulina es como la cadena ligera de la molécula de clase I. La cadena  $\alpha$  tiene dos dominios de unión a péptidos ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ), un dominio semejante al de las inmunoglobulinas (Igs) ( $\alpha 3$ ), la región transmembrana y una cola citoplasmática.

En el caso de las moléculas de clase II, la estructura es diferente. Constan de una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ . El dominio de unión al péptido está formado por los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ ; el dominio semejante al de las Igs está formado por los dominios  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ . Igualmente existe una región transmembrana y una cola citoplasmática.

Estas moléculas se expresan sobre todo en las células presentadoras de antígeno (dendríticas y fagocíticas, así como los linfocitos B), donde presentan péptidos antigénicos extracelulares procesados a los linfocitos T cooperadores (CD4+). El péptido antigénico se aloja en una hendidura formada por los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ .

Las moléculas MHC-II en humanos presentan 5-6 isotipos, y pueden agruparse en:

- "clásicas", que presentan péptidos a los linfocitos T4; dentro de este grupo tenemos HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR
- "no clásicas", accesorias, con funciones intracelulares (no están expuestas en la membrana celular, sino en membranas internas, de los lisosomas); normalmente, cargan los péptidos antigénicos sobre las moléculas MHC-II clásicas; en este grupo se incluyen HLA-DM y HLA-DO.

Además de las moléculas MHC-II, en la región Clase-II se encuentran genes que codifican moléculas procesadoras de antígenos, como TAP (del inglés transporter associated with antigen processing) y Tapasin.

El juego de alelos presente en cada cromosoma se denomina haplotipo. En humanos, cada alelo *HLA* recibe un número. Por ejemplo, para un individuo dado, su haplotipo puede ser *HLA-A2*, *HLA-B5*, *HLA-DR3*, etc. Cada individuo heterocigoto tendrá dos haplotipos HLA, uno en cada cromosoma (uno de origen paterno y otro de origen materno).

Los genes del MHC son los genes más polimórficos de todo el genoma, lo que significa que existen muchos alelos distintos en los diferentes individuos de la población.

## Introducción

Además, existe un elevado grado de asociación entre los genes del MHC, especialmente entre los genes del MHC de clase II, lo que se conoce como desequilibrio de ligamiento. Esto hace que los genes DRB, DQA y DQB se hereden juntos (en bloque), por lo que se pueden inferir muchos de los haplotipos del MHC de clase II:

*DRB1\*01; DQA1\*01; DQB1\*05*

*DRB1\*03; DQA1\*05; DQB1\*02*

*DRB1\*04; DQA1\*03; DQB1\*03*

*DRB1\*07; DQA1\*02; DQB1\*02*

*DRB1\*08; DQA1\*04; DQB1\*04*

*DRB1\*09; DQA1\*03; DQB1\*03*

*DRB1\*10; DQA1\*01; DQB1\*05*

*DRB1\*11; DQA1\*05; DQB1\*03*

*DRB1\*12; DQA1\*05; DQB1\*04*

*DRB1\*13; DQA1\*01; DQB1\*06*

*DRB1\*14; DQA1\*01; DQB1\*05*

*DRB1\*15; DQA1\*01; DQB1\*06*

*DRB1\*16; DQA1\*01; DQB1\*05*

Muchos de estos haplotipos “extendidos” han sufrido procesos de recombinación a lo largo de la evolución del ser humano, fundamentalmente condicionados por los fenómenos migratorios y los mecanismos de adaptación a nuevos factores medioambientales y de exposición a diferentes estímulos antigénicos. Ejemplos de estos fenómenos reecombinatorios podrían ser:

*DRB1\*04; DQA1\*03; DQB1\*02*

*DRB1\*07; DQA1\*02; DQB1\*03*

*DRB1\*08; DQA1\*01; DQB1\*06*

*DRB1\*08; DQA1\*06; DQB1\*03*

*DRB1\*11; DQA1\*01; DQB1\*05*

*DRB1\*13; DQA1\*03; DQB1\*03*

Etc.

En todas las poblaciones del mundo existe un elevado nivel de polimorfismo HLA, el cual asegura a una mayoría de personas una heterocigosidad genética. Además, la comparación en la distribución de las frecuencias de antígenos HLA entre las distintas poblaciones refleja grandes

## Introducción

diferencias. De hecho, una gran mayoría de alelos HLA de clase I y II son característicos de poblaciones pertenecientes a regiones geográficas localizadas. Es por ello que existen alelos que son característicos de poblaciones asiáticas, africanas, amerindias, aborígenes australianas y europeas. Sin embargo, existen otros alelos con una frecuencia muy elevada a nivel mundial (v.g. A02: frecuencia media de un 16% en negros, 25% en caucásicos, 27% en orientales, 25% en amerindios, y 8% en aborígenes australianos). [85]

Existe una clara asociación de ciertos antígenos o alelos del sistema HLA con diferentes enfermedades, fundamentalmente enfermedades autoinmunes (Tabla 4). Del mismo modo, se ha ido conociendo cada vez más que esta asociación también aparece en relación con la patología infecciosa, y que por tanto la presencia o ausencia de ciertos antígenos o alelos del MHC favorecen una mayor susceptibilidad o resistencia frente a diferentes patógenos (Tabla 5).

Associations of HLA genotype with susceptibility to autoimmune disease			
Disease	HLA allele	Relative risk	Sex ratio (♀:♂)
Ankylosing spondylitis	E27	87.4	0.3
Acute anterior uveitis	E27	10.04	<0.5
Gonococcal arthritis	DR2	15.9	~1
Multiple sclerosis	DR2	4.8	10
Graves' disease	DR3	3.7	4-5
Myasthenia gravis	DR3	2.5	~1
Systemic lupus erythematosus	DR3	5.8	10-20
Insulin-dependent diabetes mellitus	DR3 and DR4	3.2	~1
Rheumatoid arthritis	DR4	4.2	3
Pemphigus vulgaris	DR4	14.4	~1
Hashimoto's thyroiditis	DR5	3.2	4-5

© 1997 Current Biology Ltd. / Garland Publishing, Inc.

Tabla 4. Antígenos del sistema HLA asociados con enfermedades autoinmunes.

Disease	Effect
<b>Class I</b>	
B8	Pulmonary tuberculosis
B35	AIDS
B53	Severe malaria
B57	AIDS
<b>Class II</b>	
DRB1*1302	Hepatitis B
DRB1*1352	Malarial anaemia
DRB1*1101	Hepatitis C
DRB1*04	Typhoid fever
DR2	Pulmonary tuberculosis
DR2	Leprosy
DR7	Hepatitis B

## Introducción

Tabla 5. Asociación entre diferentes antígenos / alelos del sistema HLA y enfermedades infecciosas.

En el caso concreto de la TB, existen varios estudios demostrando la asociación de ciertos antígenos / alelos y haplotipos con susceptibilidad o resistencia frente a la misma. Estos estudios han evidenciado distintas asociaciones, principalmente de genes MHC de clase II en función, fundamentalmente de la etnia de la población estudiada. [86] En lo referente a los antígenos de clase I existe una mayor discordancia entre los diferentes estudios. Así, en un meta-análisis de 21 estudios, DRB1\*15 y DRB1\*08:03 presentaban una mayor frecuencia en pacientes con TBP. Sin embargo, DRB1\*03, DRB1\*11, DRB1\*11:03 y DRB1\*12:02 presentaban menor frecuencia en estos sujetos que en la población general. En la población de origen asiático DRB1\*03 y DRB1\*07:01 se asociaron con una menor incidencia de TBP mientras que DRB1\*15 y DRB1\*08:03 se asociaron con una incidencia aumentada de TBP.

En otro meta-análisis reciente se ha observado que HLA-DRB1\*04, \*09, \*10, \*15, y \*16 se asocian con mayor riesgo de TBP, especialmente en el este del continente asiático mientras que HLA-DRB1\*11 parece ser un factor de protección. [87]

Vista la gran diversidad de resultados entre poblaciones, podría concluirse de estos estudios, que el background genético de la población jugaría un importante papel en conferir susceptibilidad o protección frente a la TBP, probablemente y en parte, fruto de la convivencia durante miles de años del ser humano junto con *Mtb*. Parecería por tanto relativamente obvio que en diferentes grupos étnicos, la misma enfermedad estuviera asociada con diferentes antígenos HLA, ya que el patrón de distribución de la frecuencia de los mismos, y el desequilibrio de ligamiento existente dentro de un sistema tan polimórfico serían diferentes.

### **1.2.4.2. Los genes *KIR* (Killer immunoglobulin-like receptors)**

Las células NK son células del sistema inmune innato que luchan frente a la infección mediante la producción de citocinas y matando directamente a las células infectadas a través de otros mecanismos (producción de perforinas, citotoxicidad dependiente de anticuerpos, etc.). Sin embargo, parte de su actividad, depende de otros mecanismos mediados por la interacción de receptores en su superficie, entre los que destacan los receptores de células Killer semejantes a las inmunoglobulinas (*KIR*, del inglés killer immunoglobulin-like receptors) y moléculas HLA expresadas en la superficie de la célula diana. La expresión de estas moléculas HLA depende en

## Introducción

gran medida de la intervención de otro tipo de células, fundamentalmente macrófagos, linfocitos T, etc. a través de la producción y liberación de citocinas.

Las células NK expresan en su superficie más de un tipo de receptor KIR y estos receptores pueden tener una función activadora o inhibidora de la célula NK. Existen 14 genes KIR y dos pseudogenes localizados en el cromosoma 19q13.4. [88] Las células NK expresan varias combinaciones de estos 16 genes dando lugar a dos haplotipos en función del número de genes activadores que se expresen.

Haplotipo A en el que sólo se expresa un gen activador el KIR2DS4, y haplotipo B, en el que se expresan varios genes estimuladores (Figura 13).

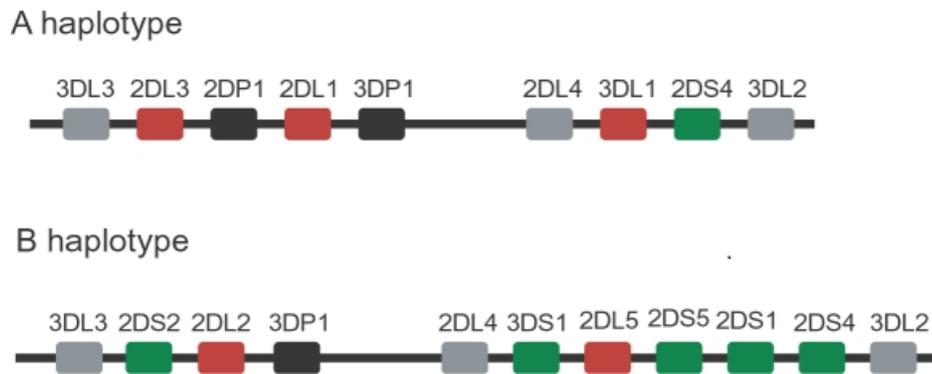


Fig. 13. Haplotipos KIR A y B. En verde, genes estimuladores; en rojo, genes inhibidores; en gris, genes de expresión constitutiva y en negro, pseudogenes.

La nomenclatura de los genes KIR se basa en la presencia de dos o tres dominios extracelulares semejantes a los de las inmunoglobulinas (KIR2D o KIR3D) en los receptores codificados por dichos genes. Independientemente del número de dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, los dominios citoplasmáticos de los receptores KIR pueden ser largos (denominados L) o cortos (S). Receptores KIR con dominios citoplasmáticos largos son inhibidores, ya que contienen secuencias o “patrones” de inhibición basados en inmunorreceptores de tirosina (ITIMs). Los KIR con dominio citoplasmático corto transmiten señales activadoras a la célula NK a través de una proteína adaptadora denominada DAP-12 o KARAP (Killer cell activating receptor-associated protein), la cual contiene patrones o secuencias de activación basadas en inmunorreceptores de tirosina (ITAMs). [89-91]

Existen dos pseudogenes (2DP1 o 3DP1) semejantes en sus secuencias con otros genes KIR, y que podrían representar genes ancestrales. La nomenclatura de los genes KIR es proporcionada

## Introducción

por la base de datos de los polimorfismos del sistema inmune (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/nomenclature.html>).

Como se ve en la figura 13, los haplotipos KIR difieren en el número y tipo de genes presentes: los genes 2DL4, 3DP1, 3DL2, y 3DL3 están presentes en prácticamente todos los haplotipos y por ello han sido denominados loci “framework” (estructura particular). El resto de genes se expresan de manera fraccionada dentro del total de haplotipos.

El número de genes expresados, presentes en un haplotipo varía de 7 a 12, dependiendo en primer lugar de la presencia o ausencia de loci activadores. Como mencioné anteriormente, basándonos en el contenido de los diferentes genes, los haplotipos han sido divididos en dos grupos llamados A y B.

El haplotipo A contiene 7 loci: 2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DS4, 3DL1, 3DL2 y 3DL3. La diferencia más relevante entre ambos haplotipos es el número de genes estimuladores presentes en cada uno de ellos: el haplotipo A sólo contiene el gen KIR2DS4, mientras que el haplotipo B contiene varias combinaciones de genes *KIR 2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5*, *3DS1*, y *2DS4*. Además, el gen *2DS4* presenta un alelo nulo con una frecuencia aproximada de un 80-85%. De esta forma, pueden existir individuos homocigotos para el haplotipo A que no expresan genes activadores. La frecuencia de los haplotipos A y B en las diferentes poblaciones caucásicas es casi la misma, pero si nos fijamos en el contenido de los genes del haplotipo B podemos observar una gran variedad de subtipos que difieren en su frecuencia entre las distintas poblaciones. Del mismo modo, la frecuencia de estos haplotipos varía entre diferentes poblaciones: la frecuencia del haplotipo A es de un 75% en japoneses, pero no llega al 20% en aborígenes australianos.

Los patrones de desequilibrio de ligamiento son fijos en el haplotipo A para los genes, pero no para los alelos de estos. Dentro del haplotipo B, existe también un elevado desequilibrio de ligamiento, pero generalmente, entre pares de genes. Hasta la actualidad se han descrito 553 genotipos distintos en 18.312 individuos pertenecientes a 151 poblaciones (<http://www.allelefrequencias.net/kir6001a.asp>).

Al igual que ocurría con el MHC, se ha descrito la asociación de los genes KIR con un gran número de patologías, fundamentalmente enfermedades autoinmunes, trasplante de progenitores hematopoyéticos, abortos de repetición, tumores e infecciones: ([http://www.allelefrequencias.net/diseases/kddb\\_query.asp](http://www.allelefrequencias.net/diseases/kddb_query.asp)).

## Introducción

La interacción de la célula NK a través de los receptores KIR se realiza con ligandos en la superficie de las células diana, fundamentalmente moléculas HLA de clase I, y más concretamente con moléculas HLA-C en su mayoría.

En las Tablas 6 y 7 podemos ver los ligandos de los diferentes receptores KIR:

<b>KIR</b>	<b>Ligand</b>
2DL1	C2
2DL2	C1 and some C2
2DL3	C1
2DL4	HLA-G1
2DL5	Unknown
2DS1	C2
2DS2	Unknown
2DS3	Unknown
2DS4	HLA-A*11, some C1 (*1601 > *0102,1402), C2 (*0502 > 0202 > 0401), and non-identified melanoma antigen
2DS5	Unknown
3DL1	HLA-Bw4
3DL2	HLA-A*03, A*11, and microbial CpG DNA
3DL3	Unknown
3DS1	Unknown (HLA-Bw4?)

*HLA-C allele groups (i.e., KIR2D ligands):*

*C1 (Asn80) – C\*01,03,07,08,12,13,1402,1507,1601; HLA-B46.*

*C2 (Lys80) – C\*02,04,05,06,0707,12042,1401,15(without 1507),1602,17.*

Tabla 6. Receptores KIR y sus ligandos (tomado de Piotr Kuśnierczyk, Front Immunol 2013;29 <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00008>).

## Introducción

2DL1 and 2DS1	2DL2/3 and 2DS2	3DL1/S1	3DL2	2DL4	2DS4
<b>HLA-C grp 2</b>	<b>HLA-C grp 1</b>	<b>HLA-B Bw4</b>	<b>HLA-A</b>	<b>HLA-G</b>	
C*02	C*01	B*08	A*03		C*04
C*04	C*03	B*13	A*11		
C*05	C*07	B*27			
C*06	C*08	B*44			
		B*51			
		B*52			
		B*53			
		B*57			
		B*58			

Ligands for 2DL5, 2DS3, 2DS5, and 3DL3 remain undefined

Tabla 7. Especificidad de la unión de los receptores KIR con sus ligandos. [77]

En el caso de la TBP existen varios estudios, realizados en diferentes poblaciones y con resultados inconsistentes. La asociación de *KIR2DL3* con susceptibilidad a TBP, aunque presente en algunas poblaciones (mestizos de México, Líbano, China, India, Argentina), no ha sido encontrada en otras (Irán, China, Canadá). Varios de los estudios donde se han encontrado diferencias en la frecuencia de genes *KIR*, o de haplotipos / genotipos, o de genes centroméricos / teloméricos, o de asociaciones de receptores KIR-ligando carecen de un gran poder estadístico debido al escaso número de pacientes y / o controles analizados, o bien o realizan un análisis estadístico inapropiado, evitando utilizar los ensayos de corrección para comparaciones múltiples. [92-102]. El primer estudio publicado en 2006 estudió la frecuencia de los genes *KIR* en una población muy pequeña (97 pacientes con TBP y 51 controles) encontrando una asociación estadísticamente significativa de *KIR2DL3* con riesgo de TBP.

Otro estudio posterior, realizado en Líbano, publicado en 2011 estudió 103 pacientes y 38 controles, encontrando la misma asociación ( $p = 0.03$ ). Curiosamente, señalan que la significación estadística se mantenía tras corrección para comparaciones múltiples (test de Bonferroni), lo cual es una contradicción, pues esa significación desaparece.

El estudio de Takij y colaboradores en población Iraní, no encontró ninguna asociación en la frecuencia de genes KIR entre individuos con TBP y controles sanos.

Otro estudio (Shahsavari F y col), realizado en Irán en el que sólo se incluyeron 50 pacientes con TB observó una disminución en la frecuencia de *KIR3DS1* y de *KIR3DS1 con HLA-B Bw4 Ile80* en pacientes. Este estudio no disponía de grupo control propio y usó el de Takij y col.

## Introducción

Un primer estudio de Lu C y col en la etnia Han de China (109 pacientes con TBP y 110 controles) encontró que las frecuencias de *KIR2DS1*, *2DS3* y *3DS1*, del grupo *KIR3DS1-2DL5-2DS1-2DS5* eran mayores en pacientes, y aunque mencionan que realizan corrección de Bonferroni, no la aplicaron para todos los hallazgos (*3DS1*, y grupo *KIR3DS1-2DL5-2DS1-2DS5*) sobre el que centran gran parte de la discusión y conclusiones.

En otro trabajo, este mismo grupo, con 109 pacientes y 30 controles, realizan una subdivisión de los pacientes según si encuentran o no bacilos en el esputo, y reportan que dos genotipos (*AH* y *FZ14*) podrían estar relacionados con la eliminación de *Mtb*. El poder estadístico de este estudio es muy pequeño.

Curiosamente, este mismo grupo en un tercer trabajo, analizando 200 pacientes y 200 controles del mismo origen, no encuentran ninguna diferencia en la frecuencia de genes *KIR*, entre pacientes con TBP y controles.

El trabajo de Pydi SS y col. realizado con 144 pacientes (140 TBP y 4 extrapulmonares) y 144 controles presenta un sesgo que los autores mencionan casi como una fortaleza. Al ser una zona endémica de TB, muchos de los controles podrían estar infectados de forma latente por *Mtb*. Los autores señalan que tanto el TST como los IGRA tienen un valor limitado. Muy al contrario, servirían para excluir de la población control, individuos con ITL, lo cual podría dar lugar a un sesgo en los resultados. Encuentran que los genes inhibidores *KIR3DL1* y *KIR2DL3* y activadores *KIR2DS1* y *KIR2DS5* confieren susceptibilidad frente a TB bien de forma individual o en combinaciones de haplotipos.

Un primer estudio de Braun K y col. en Canadá, incluye 93 individuos de Manitoba con enfermedad activa, latente o no infectados de las "primeras naciones canadienses" (63 Dene: 38 sanos, 10 con ITL y 15 con enfermedad activa; 19 Cree: 11 sanos, 4 con ITL y 4 con enfermedad activa y 11 Ojibwa: 10 sanos y uno con enfermedad activa) y 75 controles caucásicos no infectados. Encuentran diferencias, no en las frecuencias de genes aislados sino cuando los agrupan en localización centromérica y telomérica, sin especificar qué genes incluyen en las comparaciones y además considerando todos juntos: controles sanos, individuos con ITL y enfermos con TB (figura 14).

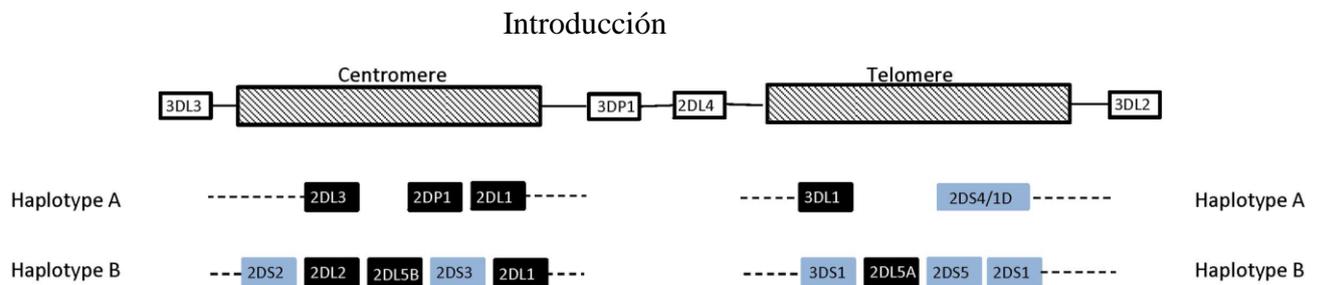


Fig.14. Esquema de los haplotipos A y B. Blanco: genes “framework”, gris: genes activadores, negro-genes inhibidores. *KIR2DP1* y *KIR3DP1* son pseudogenes.

Este mismo grupo, en un estudio más reciente, realizado en población de Manitoba (131 nacidos en Canadá: 47 pacientes con TBP, 12 individuos con ITL y 72 controles sanos, y 78 no nacidos en Canadá: 32 pacientes, 34 individuos con ITL y 12 controles sanos) ha observado diferencias en la frecuencia de los genes *KIR2DL2*, *KIR2DL5*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS2*, y *KIR2DS3* entre los grupos con una situación clínica diferente (sanos, ITL, TBP). De nuevo, el tamaño de las diferentes poblaciones y grupos estudiados pueden reflejar importantes sesgos en el análisis estadístico.

El trabajo de Habegger de Sorrentino y col. en amerindios de Chaco en Argentina incluye también un estudio de los ligandos HLA. Sus resultados reflejan que *HLA-B35:19/47-HLA-C\*3* podrían ser un factor de susceptibilidad a TB y la combinación *KIR2DL3-HLA-C1*, por su efecto inhibitorio sobre las células NK, podría contribuir al curso clínico de la infección por *Mtb*. En este trabajo se estudiaron a 35 pacientes, 84 contactos no infectados y 63 controles sanos de la misma etnia.

De nuevo, el número de sujetos incluidos en cada grupo es muy pequeño para revelar asociaciones con un poder estadístico a tener en consideración.

#### 1.2.4.3. CCL5 (RANTES)

CCL5, ligando 5 de las quimiocinas-CC (quimiocinas Cisteína-Cisteína), es una proteína de 8 KDa, perteneciente al grupo de citosinas quimiotácticas o quimiocinas. También conocida como RANTES ([regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted)]. [103-104]

## Introducción

CCL5 ha sido clasificada como una cinocidina (quimiocina microbicida), debido a la presencia de un motive tridimensional conservado y a una actividad microbicida directa. Es producida por linfocitos T, fundamentalmente, tras estimulación por diversas citosinas (TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha$ ).

CCL5 ejerce un papel quimiotáctico sobre linfocitos T, eosinófilos y basófilos y juega un papel muy importante en el reclutamiento de leucocitos en los lugares donde existe un proceso inflamatorio. CCL5 también induce la proliferación y activación de ciertas células NK para dar lugar a las llamadas células CHAK (CC-Chemokine-activated killer cells), [105] las cuales muestran propiedades similares a las células NK activadas por linfocinas, en concreto por IL-2. Macrófagos alveolares infectados por *Mtb* inducirían la producción de ciertas quimiocinas, entre las que destacaría CCL5. Esta quimiocina mediaría en la migración al sitio de la infección tuberculosa de más macrófagos y linfocitos T, a los cuales además activaría, interviniendo en la formación del granuloma tuberculoso, que como ya hemos mencionado sirve para contener la expansión de *Mtb* y su diseminación a través del pulmón y a otros tejidos y órganos. [106-108] Igualmente, se ha postulado un papel de esta quimiocina en la inhibición del crecimiento intracelular de *Mtb* en el interior del macrófago infectado. [109]

Otra función ejercida por CCL5 es la de aumentar la adherencia de los monocitos circulantes a las células endoteliales, incrementando la migración, no sólo de estos, sino también de linfocitos T CD4+. [106]

Se han identificado dos polimorfismos (SNPs) en el promotor del gen *CCL5*, denominados rs2280788 (-28C/G) y rs2107538 (-403G/A) respectivamente, que en diferentes estudios se ha visto que están implicados en la regulación de la actividad transcripcional de *CCL5*. [107,108]

Además, estos polimorfismos han sido asociados con susceptibilidad al VIH. [108-110]

Más recientemente, se ha encontrado un nuevo SNP, que parece tener un importante papel funcional, en el primer intrón de *CCL5* (rs2280789: In1.1T/C), regulando el nivel transcripcional del gen mediante un proceso de unión diferencial a variantes alternativas de proteínas nucleares, y que parece conferir cierto papel protector frente al desarrollo de diabetes mellitus insulindpendiente. [111]

## Introducción

Hasta la fecha, solamente se ha publicado un artículo en el que se ha encontrado una asociación entre SNPs funcionales de CCL5 y TB. Este estudio fue realizado en etnia china de Hong Kong. [112]

En el mismo, se analizaron los 3 SNPs mencionados anteriormente (-403G/A, -28 C/G and In1.1T/C) y aunque, de forma aislada, no se encontraron diferencias en la distribución de cada uno de los polimorfismos entre controles sanos y pacientes con TB, sí se halló una asociación estadísticamente significativa entre varios haplotipos y diplotipos con TB, lo cual sugeriría que CCL5 podría jugar algún papel en la susceptibilidad frente a TB.

### **1.2.4.4. Interleucina 17 (IL-17).**

Parte del trabajo se ha centrado en esta citocina, por el cada vez mayor conocimiento de su relevancia en la fisiología normal del sistema inmunitario y en su papel en múltiples patologías.

La IL-17 comprende una familia de citocinas producida por un grupo de linfocitos T CD4+, denominados Th17. Se han identificado hasta 6 proteínas diferentes que se denominan IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E y IL-17F. La IL-17A participa en los procesos de autoinmunidad, inflamación e inmunidad, y es el componente principal del grupo. La IL-17F actúa en la inmunidad sobre mucosas y La IL-17E tiene un efecto amplificador de la respuesta de los linfocitos TH2.

La IL-17A está integrada en una vía de señalización celular junto a otra interleucina, la IL-23. Ambas juegan un papel crucial en la respuesta inmune frente a varios patógenos y muy en particular frente a la infección por micobacterias. [113]

Estas citocinas han sido involucradas en el desarrollo de respuestas inmunes reguladoras y protectoras en modelos experimentales murinos y en humanos infectados por *Mtb*. El papel que juega la IL-17A en el desarrollo de respuestas antimicrobianas, la producción de quimiocinas, y el reclutamiento de otras células del sistema inmune para lograr el control de la infección ha sido demostrado en varios estudios. [114-117]

En la infección por *Mycobacterium bovis*, se ha visto que la ausencia de IL-17 no tiene gran influencia sobre la supervivencia general frente a la infección. Sin embargo sí que la formación de granulomas en el pulmón se ve afectada. [114, 118]

## Introducción

Como ya vimos anteriormente, la formación del granuloma es un hecho fundamental en el control de la infección por *Mtb*, puesto que juega un papel esencial en el secuestro y muerte de las micobacterias en el pulmón. Aunque los mecanismos que intervienen en su formación y maduración no han sido esclarecidos totalmente, se sabe que la IL-17A está involucrada en la formación de un granuloma maduro en el pulmón de individuos infectados por *Mtb*.

Es más, en modelos experimentales murinos IL-17A  $-/-$ , se ha demostrado la imposibilidad de formación de granulomas maduros en el pulmón tras infectarles con altas dosis de BCG. [114]. Tras la infección por BCG, se induce de forma inmediata la producción de IL-17A, la cual también es posible detectar en estadios más tardíos (hasta 52 semanas después) en la infección por *Mtb*. [119]

Una observación muy interesante y a la vez no claramente comprendida, es el hecho de que en los pulmones de individuos infectados por *Mtb*, las células que principalmente expresan IL-17A son linfocitos  $T\gamma\delta$  cuando lo esperado sería que fueran linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th17. [120]

En el control de los procesos infecciosos ha de existir una regulación muy fina de las respuestas de los linfocitos, pues de lo contrario, los efectos de la infección serían deletéreos.

En el caso de la IL-17, se ha visto en modelos experimentales, que existe una estrecha regulación por parte del IFN- $\gamma$ . Ratones IFN- $\gamma$   $-/-$  infectados con micobacterias muestran una acumulación de linfocitos T efectores activados y neutrófilos en el interior del granuloma.

Estas células no controlan el crecimiento de las micobacterias, por lo que se pone en compromiso la integridad del tejido infectado facilitando la expansión de la infección. Esto demuestra la complejidad de la respuesta inmune, la cual requiere de sutiles medidas de regulación para evitar tanto una respuesta desmesurada como una respuesta inmune limitada, incapaz de hacer frente a la infección. [121]

Por ejemplo, la IL-17 participa de manera muy importante en el reclutamiento de neutrófilos a los lugares donde se produce una inflamación, a través de procesos estimuladores sobre las células del estroma para que, estas a su vez, produzcan citocinas quimiotácticas, hematopoiéticas y proinflamatorias. [122-124]

## Introducción

Por lo anteriormente expuesto, es necesario conocer en mayor profundidad, el papel exacto de la IL-17 de la TBP, pues todos estos mecanismos de regulación, aún no del todo conocidos, podrían permitir un mayor conocimiento de su influencia en la susceptibilidad o resistencia frente a la infección por *Mtb*.

### **1.2.5. Susceptibilidad genética a la tuberculosis: genes implicados.**

Hasta la fecha, son muchos los estudios realizados, en busca de factores genéticos asociados con una mayor susceptibilidad frente a la TB en diferentes poblaciones. Los resultados de varios de estos estudios han evidenciado inconsistencias y falta de reproducibilidad, quizá debido a como comenté anteriormente el trasfondo genético de las diferentes poblaciones. Lo que algunos autores encuentran en una población, por ejemplo, chinos de la etnia Han, no ha podido reproducirse en individuos caucásicos o afro-americanos.

Variantes genéticas, mutaciones y polimorfismos en gran cantidad de genes han sido comunicados en asociación con TBP. [125-131]

Existen una gran cantidad de estudios genéticos de asociación con TBP que serían muy largos de enumerar. Dentro de los genes más frecuentemente estudiados, destacan los que codifican las siguientes proteínas: proteína 1 de macrófago asociada con resistencia natural (Natural resistance-associated macrophage protein 1, NRAMP1), TLRs, fundamentalmente TLR2, IL-6, TNF- $\alpha$ , antagonista del receptor de la interleucina-1 (Interleukin-1 receptor antagonist, IL-1RA), IL-10, receptor de vitamina D (VDR), proteína de unión a ICAM-3 no integrina específica de células dendríticas (Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin, DC-SIGN), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), dominio de unión para oligomerización de nucleótidos-2 (Nucleotide oligomerization binding domain 2, NOD2), IFN- $\gamma$ , sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS), proteínas surfactantes (SP), y un largo etc.

Recientemente, el uso de estudios de asociación genómica amplia (GWAS), los cuales analizan hasta cientos de miles de variantes genéticas en diferentes poblaciones que comprenden también miles de sujetos con TBP comparándolos con controles sanos ha permitido identificar un gran número de polimorfismos y mutaciones genéticas en nuevos genes, asociados con susceptibilidad frente a TBP. [132-140]

## Introducción

Sin embargo, como en el caso anterior de estudios de gen único, muchos de estos resultados no han podido ser reproducidos en otras poblaciones. [141-143] La explicación a esta falta de replicación y consistencia en los hallazgos en las distintas etnias estudiadas podría tener su origen en que el origen multifactorial causante de una infección es un hecho evidente. Las distintas condiciones medioambientales, factores inherentes al patógeno, características relacionadas con la transmisión de la infección, la propia variabilidad en el genoma del propio patógeno interaccionan de una manera muy estrecha con las propiedades inherentes del hospedador.

Por lo tanto, en este tipo de estudios, se requiere que las características de casos y controles sean determinadas de una manera más segura para tratar de valorar la importancia del trasfondo genético de los distintos fenotipos seleccionados. Sólo el hallazgo de ciertos loci en regiones intergénicas se ha encontrado en diferentes poblaciones de Gambia, Malawi, Indonesia y Rusia, aunque todavía queda por conocer la explicación de la función de estas alteraciones y su influencia en los fenotipos estudiados. [143]

Capítulo aparte merece el estudio de las variantes del gen de la MBL, los genes del MHC, y los genes que dan lugar a los receptores KIR, junto con los del TLR1, la IL-17A, la Dectina-1 y CARD9 por ser el objeto del presente estudio.

En este sentido, nuestro grupo ha aportado algunos resultados contribuyendo a un mayor conocimiento de esas asociaciones. [144-149]

## **2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS**



### **JUSTIFICACIÓN:**

-Existen factores de virulencia propios de *Mtb* que condicionan la evolución de la infección hacia un estado de latencia o de enfermedad pulmonar activa. Igualmente, por parte del hospedador, existen también factores, que implican a células y proteínas del sistema inmunitario, que intervienen en la susceptibilidad o resistencia frente a la ITL / enfermedad activa, producidas por *Mtb*. Muchos de estos factores no se han esclarecido y otros son totalmente desconocidos. Algunos de ellos pertenecen al denominado sistema inmune innato, el cual participa en el reconocimiento inicial de *Mtb*. Otros, forman parte del sistema inmune adquirido o adaptativo, que son moduladores clave en la respuesta inflamatoria frente a la infección tuberculosa.

-Por otra parte, se ha estudiado la influencia que sobre la susceptibilidad o resistencia frente a la infección por *Mtb* ejercen diferentes variantes genéticas en muchos genes del sistema inmune innato y adquirido; así como, la influencia del MHC y de los genes KIR con resultados inconsistentes, probablemente debidos a la estructura genética de las distintas poblaciones estudiadas.

### **HIPÓTESIS**

La existencia de factores inmunogenéticos propios del hospedador que influyen en la susceptibilidad o resistencia frente a la infección tuberculosa varían entre distintos grupos étnicos. En una población pequeña y con un grado de conservación genética elevada como es la Comunidad Autónoma de Cantabria, el estudio de diferentes genes del sistema inmune innato y adquirido implicados en la respuesta inmunológica frente a *Mtb* puede esclarecer el papel de algunos de ellos e identificar nuevas variantes asociadas a la TBP.



### **3. OBJETIVOS**



## Objetivos

### Objetivo general

Estudiar factores genéticos implicados en la susceptibilidad o resistencia de la TBP en individuos sanos, individuos con ITL y pacientes con TBP en una población genéticamente conservada de la Comunidad Autónoma de Cantabria.

### Objetivos específicos

1. Evaluar la asociación entre los diferentes antígenos y haplotipos del MHC de clase I y II y la susceptibilidad o resistencia frente a la ITL y / o la TBP.
2. Estudiar la frecuencia de los genes *KIR* y los haplotipos derivados de estos genes en la población de Cantabria y comprobar si existe asociación con la ITL o la TBP.
3. Determinar si los polimorfismos funcionales del promotor de *CCL5*, rs2280788 (-28C/G) y rs2107538 (-403G/A) se asocian con susceptibilidad o resistencia frente a la TBP.
4. Estudiar si la variante funcional en el promotor del gen de la IL-17, G-152A (rs2275913), se asocia con un mayor riesgo de contraer TBP, y si esta variante modifica los niveles de IL-17 tras estimulación de las células de pacientes y controles con antígenos derivados de *Mtb*.
5. Estudiar si el polimorfismo funcional T1805G, rs5743618 se asocia con susceptibilidad o resistencia frente a la TBP.
6. Determinar si existe alguna asociación entre los polimorfismos del promotor y las variantes estructurales en el gen de la MBL y los haplotipos y genotipos derivados con la susceptibilidad frente a TBP.
7. Determinar el papel de variantes genéticas de *Dectina-1* y *CARD9* en la susceptibilidad frente a la infección por *Mtb*.



## **4. PACIENTES Y MÉTODOS**



#### **4.1.    Ámbito**

El estudio objeto de esta Tesis Doctoral, se llevó a cabo en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, en Santander (Cantabria), el cual es un hospital de nivel terciario perteneciente al Servicio Cántabro de Salud y, con una capacidad de 944 camas. El Hospital Universitario Marqués de Valdecilla es el centro hospitalario de referencia de la comunidad autónoma de Cantabria, dando cobertura a una población aproximada de unos 527.000 habitantes.

#### **4.2.    Diseño del estudio**

Se realizó un estudio de casos y controles retrospectivos, durante los años 2010-2013 de pacientes diagnosticados de TBP, individuos con ILT y sujetos sanos.

#### **4.3.    Población de estudio**

Las muestras del estudio se recogieron en los siguientes grupos de sujetos:

- Sujetos sanos
- Pacientes diagnosticados de TBP
- Individuos con ITL

##### **Controles sanos**

Proceden de individuos sanos de la Comunidad de Cantabria, donantes de sangre del Banco Regional de Sangre y Tejidos de dicha Comunidad. Para descartar la posible presencia de individuos con ITL en este grupo, a todos ellos se les realizó un ensayo de liberación de IFN- $\gamma$  (IGRA, del inglés Interferon-gamma release assay), mediante el uso del QuantiFERON TB-Gold In Tube (Alere Healthcare, S.A.U., España). Este, es un ensayo “ex vivo” de estimulación de células T efectoras en sangre completa con mitógenos (fitohemaglutinina) o antígenos específicos de *Mtb* (ESAT-6, CFP-10 y TB7.7) y suero salino como control negativo de no estimulación y posterior determinación de la producción de IFN- $\gamma$  en el plasma tras un periodo de incubación.

Estas proteínas, no aparecen en ninguna cepa de la BCG ni en la mayoría de las micobacterias no tuberculosas, a excepción de *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. marinum*. Además, ninguno de los controles seleccionados tenía una historia previa de TB ni contacto con individuos enfermos de TB en cualquiera de sus formas. Las personas infectadas por organismos del complejo *Mtb* suelen tener en la sangre linfocitos capaces de reconocer a este y otros antígenos

micobacterianos. Este proceso de reconocimiento implica la generación y secreción IFN- $\gamma$ . La detección y posterior cuantificación de IFN- $\gamma$  mediante una técnica de enzimoimmunoensayo (EIA) constituye la base de este método.

### **Individuos con TBP**

Las muestras de este grupo de pacientes fueron obtenidas, bien de pacientes ingresados en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla en el momento de la enfermedad, o bien a través de las bases de datos de los 10 últimos años facilitadas por la Sección de Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Salud Pública del Servicio Cántabro de Salud.

Las primeras fueron recogidas entre los años 2007 y 2013. Las segundas, pertenecen a individuos que padecieron TBP desde el año 2000 hasta el 2010. Todos los pacientes cumplían los criterios clínicos, radiológicos y bacteriológicos de TBP activa en el momento del diagnóstico, de acuerdo con los estándares desarrollados por la Sociedad Americana del Tórax y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (<http://www.cdc.gov>).

El diagnóstico de TBP fue realizado clínicamente y mediante el uso de rayos-X pulmonar, y confirmado mediante métodos microbiológicos (microscopía y cultivo).

### **Individuos con ITL**

Las muestras de personas infectadas de forma latente con *Mtb*, fueron seleccionadas de donantes de sangre del Banco Regional de Sangre y Tejidos de nuestra Comunidad, quienes en un estudio rutinario, usando el QuantiFERON TB-Gold In tube, dieron positivo para el ensayo.

El resto de muestras se obtuvieron de contactos de pacientes con TBP activa que resultaron infectados (diagnosticados mediante el uso de TST e IGRA). En ambos grupos, condición sine qua non fue que en los cinco años siguientes a la detección de la infección, no sufrieran una reactivación y evolución a enfermedad activa. Estas muestras se recogieron durante los años 2007-2012.

Para asegurar la máxima homogeneidad de la población de estudio, todas las muestras tuvieron un mismo origen étnico (caucásicos), y con tres-cuatro generaciones, incluyendo la suya, naturales y residentes en la Comunidad Autónoma de Cantabria.

#### 4.4. Criterios de exclusión

Se excluyeron:

1. Pacientes que desarrollaron una TB miliar, extrapulmonar localizada o diseminada, con afectación localizada o generalizada de otros órganos.
2. Pacientes que además de la TBP, presentaban enfermedades autoinmunes, neoplasias, insuficiencia renal crónica, pacientes trasplantados, alcohólicos y consumidores habituales de drogas.
3. Individuos con ITL que sufrieron una reactivación de la infección.
4. Pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

#### 4.5. Recogida de información

Se recogieron las siguientes variables:

- 1. Estudio de la distribución de los diferentes antígenos del MHC de clase I y II**
  - a) Estudio de las frecuencias de los antígenos HLA de clase I (loci *A*, *B* y *C*), y clase II (loci *DRB1* y *DQB1*)
  - b) Estudio de las frecuencias de los haplotipos extendidos
- 2. Estudio de los genes *KIR***
  - a) Análisis de la frecuencia de los distintos genes *KIR*
  - b) Análisis de la frecuencia de los distintos haplotipos y genotipos generados
  - c) Análisis de la interacción de los diferentes receptores *KIR* y sus ligandos
- 3. Estudio del polimorfismo funcional -152 G /A en el promotor del gen de la IL-17**
  - a) Frecuencias de los alelos G y A en pacientes con TBP y en controles
  - b) Frecuencias de los genotipos generados
  - c) Estudio de los diferentes modelos dominante, recesivo y aditivo
  - d) Influencia del polimorfismo en los niveles plasmáticos de IL-17
- 4. Estudio de los SNPs funcionales rs2280788 (-28C/G) y rs2107538 (-403G/A) del gen *CCL5***
  - a) Frecuencias de los alelos -403G/A and -28C/G en pacientes con TBP y controles
  - b) Análisis de la frecuencia de los distintos haplotipos, diplotipos y genotipos generados
  - c) Estudio de los diferentes modelos dominante, recesivo y aditivo

**5. Estudio del polimorfismo T1805G del gen *TLR1***

- a) Frecuencias de los alelos T y G en pacientes con TBP y en controles
- b) Frecuencias de los genotipos generados
- c) Estudio de los diferentes modelos dominante, recesivo y aditivo

**6. Estudio del gen de la MBL (*MBL2*)**

- a) Frecuencias alélicas de las variantes estructurales y polimorfismos del promotor del gen
- b) Frecuencia de los distintos haplotipos en los distintos grupos de estudio
- c) Frecuencia de los diplotipos (genotipos) derivados de los haplotipos encontrados.

**7. Estudio de los polimorfismos del gen de la Dectina-1 (rs3901533, rs7309123, rs16910526) y del gen *CARD9* (rs4077515)**

- a) Estudio de las frecuencias alélicas de cada uno de los polimorfismos por separado
- b) Análisis del desequilibrio de ligamiento y de las frecuencias haplotípicas.

**4.6. Obtención de muestras**

Se obtuvieron varios tipos de muestras:

-Sangre en tubos anticoagulados con EDTA (ácido etildiaminotetracético) o citrato sódico para extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN).

-Sangre en tubos no anticoagulados para la obtención de suero.

-Sangre en tubos especiales, incluidos en el kit QuantiFERON TB-Gold In tube (tubos Nil o control conteniendo suero salino, tubos conteniendo fitohemaglutinina, y tubos conteniendo antígenos específicos de *Mtb*: ESAT-6, CFP-10 y TB7.7). Tras incubación durante 16-24 horas, se recoge el plasma y se coge a -80°C hasta su análisis mediante enzoinmunoensayo (EIA).

**4.7. Extracción de ADN**

La extracción de ADN se ha realizado utilizando un sistema semiautomatizado mediante el empleo de un instrumento, el Maxwell® 16 Instrument (AS1000) y el uso de los equipos de extracción Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit (Promega Biotech Ibérica S.L., Madrid, España), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El ADN extraído se ha cuantificado y su pureza ha sido evaluada mediante la utilización de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Posteriormente, las muestras se han almacenado a -20°C hasta su utilización.

### **4.8. Tipificación de los antígenos leucocitarios humanos (HLA)**

La determinación de los antígenos de los diferentes loci (*A*, *B*, *C*, *DRB1*, *DQA1* y *DQB1*) del HLA se ha realizado mediante PCR y posterior hibridación con oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSO, LifeCodes HLA-SSO, Gen-Probe Inc., San Diego, CA, USA) y análisis en una plataforma Luminex 100 (Luminex, Austin, TX, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los kits de tipificación LIFECODES HLA-SSO emplean oligonucleótidos con especificidad de secuencia (SSO) para determinar qué alelos HLA están presentes en una muestra amplificada por PCR. No es el método, sino el conjunto de SSO utilizado, lo que determina la capacidad de distinguir entre los diversos antígenos o alelos presentes en la amplificación por PCR.

Se realizó una amplificación del ADN por PCR y se emplearon cantidades equimolares del iniciador directo y del inverso para generar un ADN bicatenario, pero si un cebador es más abundante que el otro, además de producto bicatenario, la reacción genera algo de ADN monocatenario. Durante los ciclos iniciales de la etapa de amplificación se genera ADN bicatenario. Una vez agotado el cebador limitante, el cebador restante utiliza el producto bicatenario como molde para generar ADN monocatenario. Ambos, los productos bicatenarios una vez desnaturalizados, como los monocatenarios, participarán en la reacción de hibridación.

Cada una de las distintas sondas puede ser homóloga de una secuencia del ADN amplificado exclusiva de un alelo o grupo de alelos. Dicho de otro modo, estas sondas se han creado para que cada una de ellas hibride preferentemente con una región complementaria que puede estar presente o no en el ADN amplificado. Además, el ADN amplificado hibrida también con una o más sondas de consenso homólogas a secuencias presentes en todos los alelos de un locus.

El análisis de los resultados de la tipificación con SSO puede aplicarse para determinar la presencia o ausencia de secuencias concretas de ADN en el producto amplificado y para identificar los posibles alelos en la muestra.

## Pacientes y Métodos

En la tipificación por este procedimiento, se unen las sondas a microesferas Luminex ideadas para utilizarse con el instrumento Luminex. Se pueden mezclar hasta 100 poblaciones diferentes de microesferas Luminex y analizarlas en el fluoroanalizador Luminex mediante el software XPonent 3.1, porque cada una de ellas se distingue por su firma o color de fluorescencia característico. A cada microesfera de color puede unirse una sonda SSO distinta. Por consiguiente, en una mezcla compuesta por varias sondas es posible distinguir unas de otras por su unión a microesferas de un color determinado. El instrumento Luminex también mide las cantidades relativas de producto de PCR marcado que hibrida con cada microesfera Luminex. Por ello, al igual que ocurre con otros métodos SSOP, la señal relativa obtenida con las sondas SSO en el ensayo puede utilizarse para asignar a las sondas una reactividad positiva o negativa con la muestra de ADN amplificado. Esto, a su vez, ofrece la información necesaria para determinar el fenotipo HLA de la muestra.

El análisis de los resultados se ha realizado utilizando el software MatchIT. De forma gráfica se explica en la siguiente secuencia de figuras (Figuras 15 A-D)

## Pacientes y Métodos

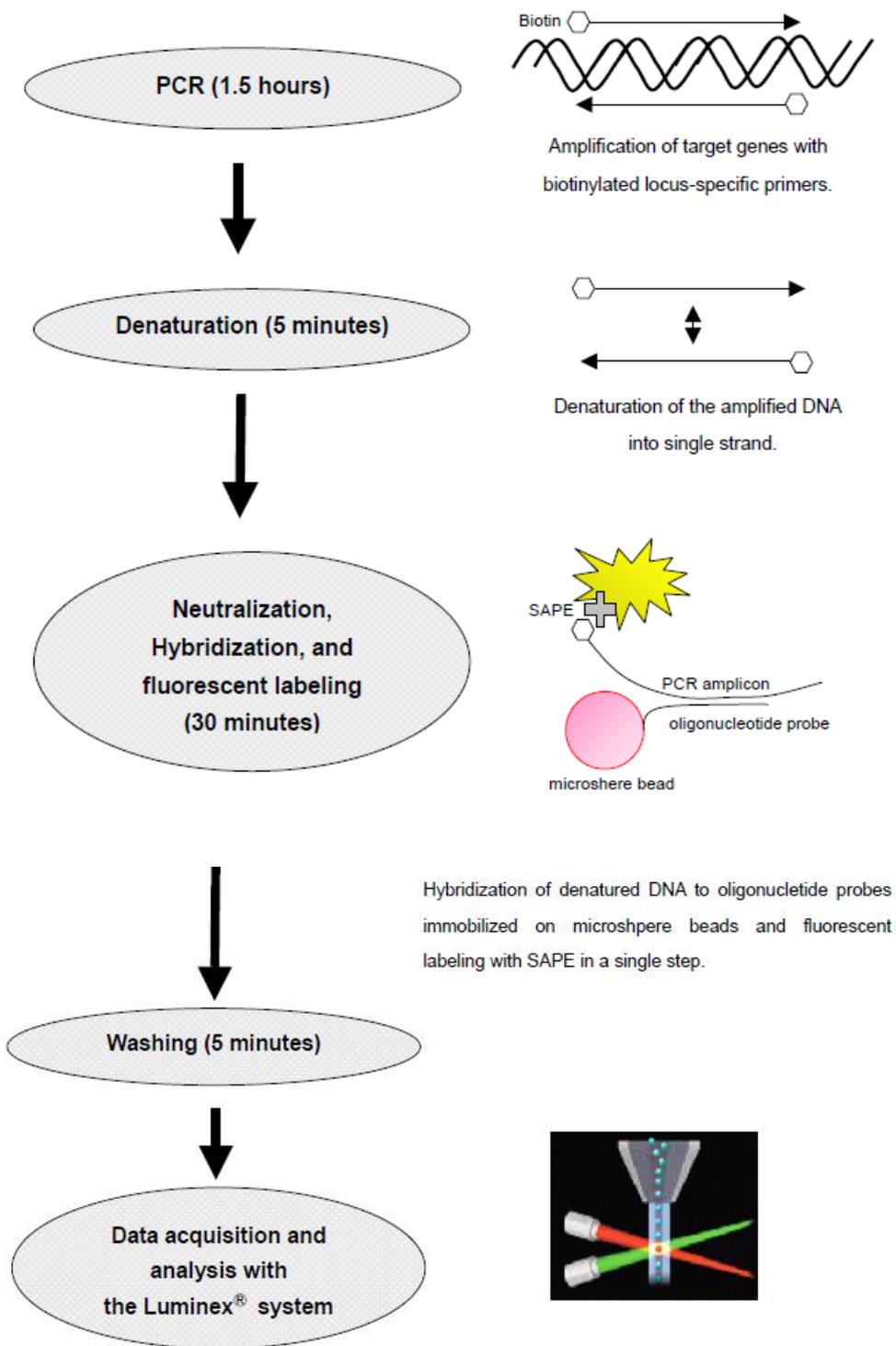


Fig. 15A. Esquema del procedimiento de trabajo en la tipificación HLA.



Figura 15B. Instrumento Luminex.

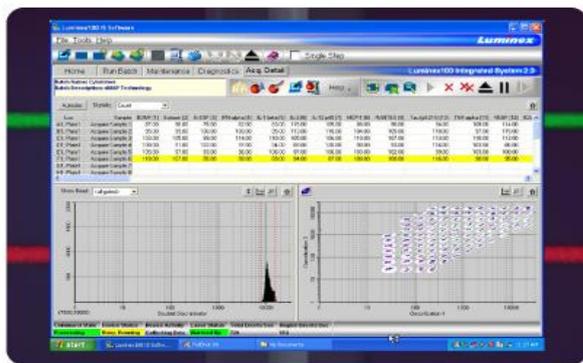


Figura 15C. Asignación mediante el software XPonent 3.1 de las diferentes sondas en cada región.

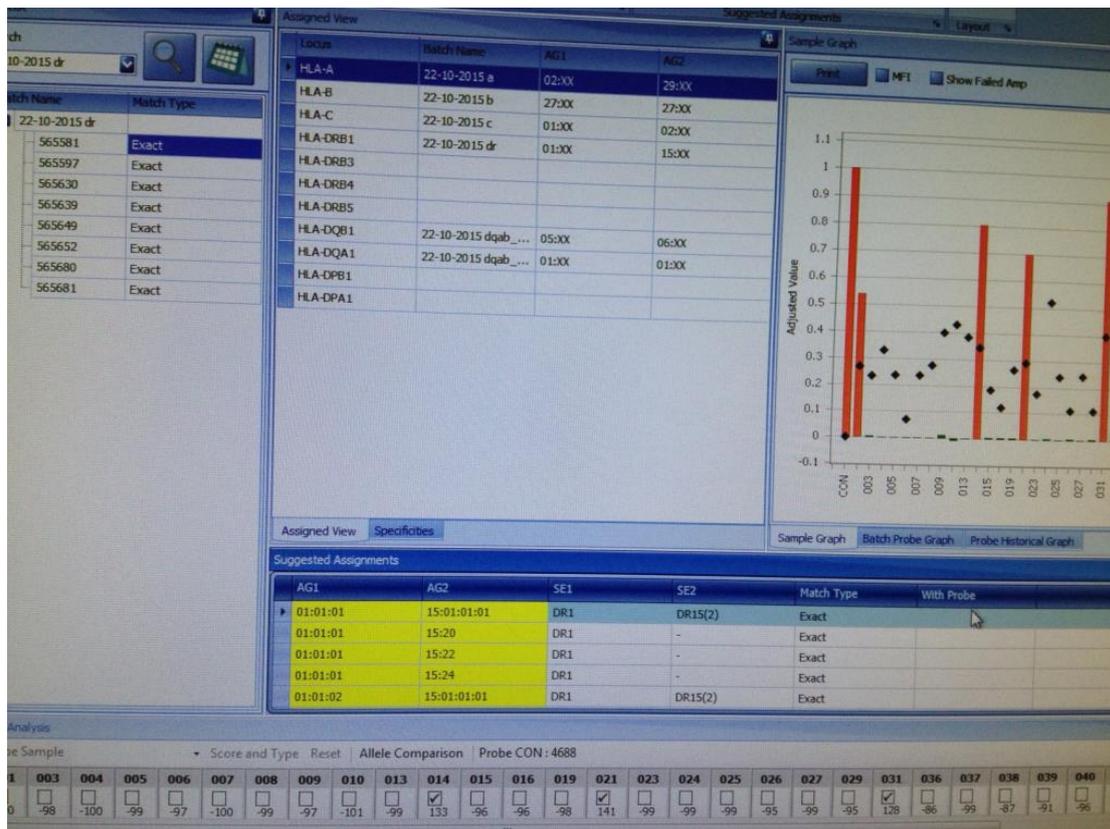


Figura 15D. Mediante el análisis con el software MatchIT, el conjunto de sondas que hibridan con el producto de amplificación generan un tipaje específico.

#### 4.9. Genotipado KIR

El análisis de los genes *KIR* presentes en los controles sanos, individuos con ITL y pacientes con TBP se ha realizado utilizando el mismo procedimiento que la tipificación HLA (PCR-SSO) usando en este caso el kit Lifecodes KIR-SSO Typing Kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 4.10. Genes / Polimorfismos estudiados

Los genes y los polimorfismos y variantes estructurales estudiados, han sido mencionados anteriormente:

##### *CCL5*

Para estudiar los SNPs funcionales del promotor de *CCL5* realizamos una amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA), seguido de una digestión enzimática con las enzimas de restricción (ER) Hinc II para el SNP -28 C/G y Rsa para

## Pacientes y Métodos

el SNP -403 G/A, seguido de un análisis de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP del inglés restriction fragment length polymorphism).

En ambos casos, se introdujeron unas modificaciones en los cebadores, concretamente en el extremo 3' para generar los correspondientes sitios de restricción y así poder ser reconocidos por las ERs (nucleótido subrayado). Se utilizaron los siguientes cebadores para analizar los dos SNPs:

-28 G/C Forward 5'-ACT CCC CTT AGG GGA TGC CCG T-3' (G en lugar de C)

-28 G/C Reverse 5'-GCG CAG AGG GCA GTA GCA AT-3'

El producto de PCR generado tiene un tamaño de 175 bp.

-403 G/A Forward 5'-CAC AAG AGG ACT CAT TCC AAC TCA-3'

-403 G/A Reverse 5'-GTT CCT GCT TAT TCA TTA CAG ATC GTA-3' (G en lugar de una T)

El producto de PCR generado tiene un tamaño de 206 bp.

Los productos de amplificación se digirieron con las ERs Hinc II y Rsa I respectivamente durante 6 horas a 37°C, las cuales generaban productos de 152 y 23 bp en el primer caso y 180 y 26 en el segundo caso. Los productos de la digestión enzimática se analizaron someténdolos a una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% y visualizados mediante tinción con GelRed Nucleic Acid Gel Stain en el Gel Doc XR+.

### ***TLRI***

Para estudiar el polimorfismo 1805T/G (Ile602Ser), realizamos una amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el termociclador Gene-Amp PCR System 9700, seguido de una digestión enzimática con la ER Alu I y un análisis mediante la técnica de RFLP.

Los iniciadores empleados han sido los siguientes:

TLR1-1805 F 5'- GGAAAGTTATAGAGGAACCCT-3'

TLR1-1805 R 5'-CTTCACCCAGAAAGAATCGTGCC-3'

## Pacientes y Métodos

Las condiciones de la PCR fueron:

- 95°C-5 minutos de desnaturalización inicial.
- 35 ciclos de 95°C-30 segundos, 55°C-30 segundos y 72°C-30 segundos.
- 72°C-5 minutos de extensión final.

Los productos de la PCR se visualizan para valorar el éxito de la amplificación en geles de agarosa al 1% sometidos a una electroforesis horizontal y tras el mismo tipo de tinción con GelRed Nucleic Acid Gel Stain se analizan en el Gel Doc XR+.

El tamaño del producto de amplificación es de 280 pares de bases. Los productos de amplificación se digirieron con la ER Alu I durante 6 horas a 37°C y posteriormente se analizaron sometidos a una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% y visualizados mediante el mismo sistema de tinción y fotodocumentación.

Para confirmar los resultados, varias muestras con distintos genotipos tanto de pacientes como de controles, fueron secuenciadas en un Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA).

### ***IL-17***

Al igual que en el caso anterior el polimorfismo funcional rs2275913 (G-152A), localizado en el promotor del gen de la IL-17 se ha genotipado mediante la técnica de PCR-RFLP. La amplificación se realizó utilizando el mismo termociclador que en el caso del polimorfismo de *TLR1* y *CCL5*.

Los iniciadores utilizados fueron los siguientes:

- IL-17 G-152A F      5'- CAGAAGACCTACATGTTACT-3'
- IL-17 G-152A R      5'- GTAGCGCTATCGTCTCTCT-3'

La amplificación se realizó siguiendo estas condiciones:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos.
- 35 ciclos: 94°C-30 segundos, 60°C-45 segundos, 72°C-30 segundos.
- Extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Los productos derivados de la amplificación se sometieron a una digestión enzimática, utilizando la enzima de restricción Xmn I a 37°C durante 6 horas. Los productos de la digestión se

## Pacientes y Métodos

analizaron sometiéndolos a una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% y se visualizaron de igual forma que en el caso anterior.

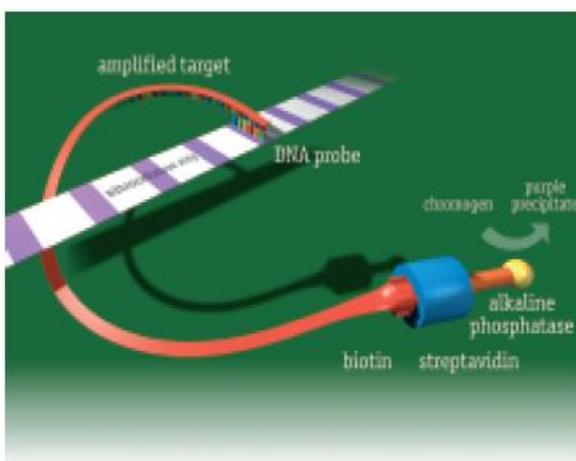
Para confirmar los resultados, varias muestras con distintos genotipos tanto de pacientes como de controles, fueron secuenciadas en un Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer y analizadas con el software BioEdit sequence alignment editor v7.2.5. (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA).

### ***MBL2***

Polimorfismos del promotor *H/L*, *X/Y* y *P/Q*

Variantes estructurales *A*, *B*, *C* y *D*

El estudio de todos ellos, se realizó mediante la tecnología de hibridación reversa LIPA (Line Probe Assay), utilizando el kit comercial INNO-LiPA MBL2 (Innogenetics Diagnóstica y Terapéutica S.A., Barcelona, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó una amplificación mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de parte del gen *MBL2* que cubre la zona de interés, y posteriormente en un instrumento, y de forma automatizada se añade el producto de amplificación a unas tiras de nitrocelulosa que llevan fijadas unas sondas que unen las diferentes variantes. Tras unos procesos de hibridación, lavados y desarrollo colorimétrico, se identifican aquellas sondas positivas, lo que nos permite diferenciar los distintos haplotipos presentes en cada muestra (Figuras 16A y B).



Test principle based on reverse hybridization:

INNO-LiPA major steps and total incubation time

1. Hybridization	30 min
2. Stringent wash	10 min
3. Color development	60 min
Total	< 2 h

Figura 16A. Principio del método de hibridación reversa en tira de nitrocelulosa donde se fijan las sondas para la detección de las variantes normales o mutadas.

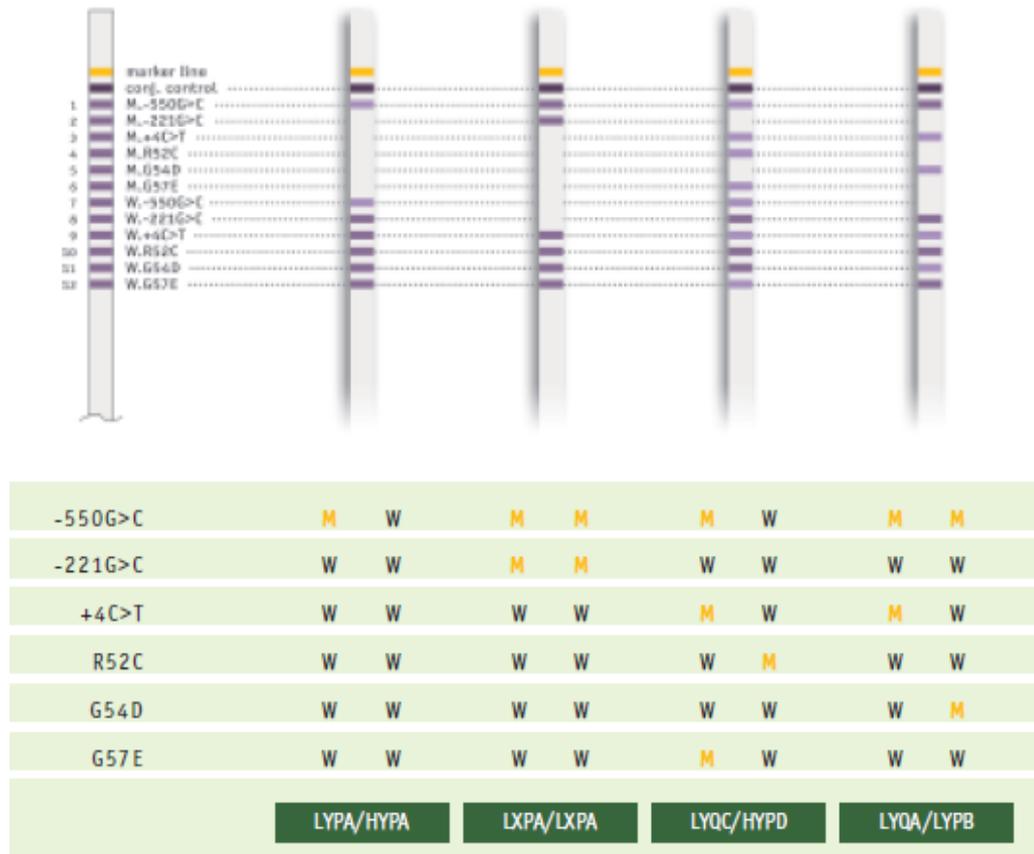


Figura 16B. Ejemplo de diferentes reactividades que dan lugar a los diferentes haplotipos y genotipos. M=mutación, W=alelo normal

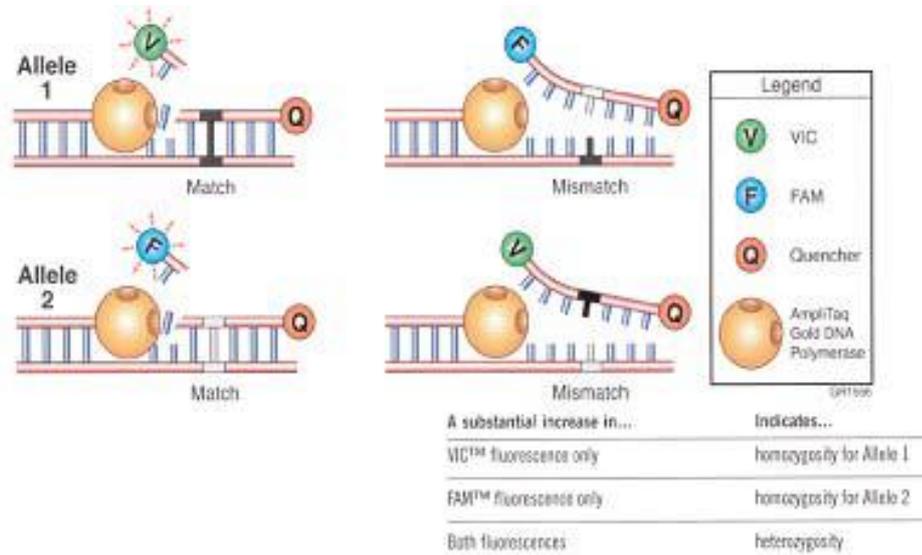
#### 4.11. Genotipado mediante ensayos “TaqMan”

Para el análisis de los polimorfismos en los genes de la Dectina-1 (gen *CLEC7A*) y *CARD9* se ha utilizado los ensayos TaqMan o 5' nucleasa. Se estudiaron las frecuencias alélicas y haplotípicas de tres polimorfismos en el gen *CLEC7A* y una en *CARD9*. Los polimorfismos estudiados fueron los siguientes:

- rs3901533 A>C: Chr.12: 10277083 (C\_\_7433799\_30)
- rs7309123 C>G: Chr.12: 10272593 (C\_\_3130832\_10)
- rs16910526 A>C: Chr.12: 10271087 (C\_\_33748481\_10)
- rs4077515 T>C: Chr.9: 139266496 (C\_\_25956930\_20)

Se utilizó la tecnología de PCR en tiempo real mediante un ensayo de discriminación alélica “ABI TaqMan Allelic Discrimination Assays” (Life Technologies S.A., Madrid, Spain) utilizando una plataforma ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Life

Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este tipo de ensayo consiste en una PCR en tiempo real en que se utilizan dos sondas marcadas con diferentes fluoróforos que detectan los distintos alelos. (Figura 17).



### Ensayo nucleasa 5' (TaqMan)

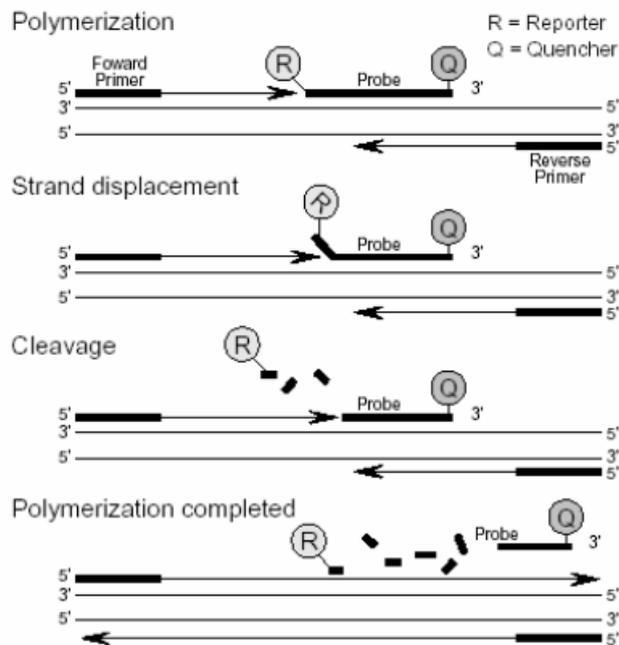


Fig. 17. Representación esquemática del ensayo de genotipado mediante el uso de sondas TaqMan.

#### **4.12. Cultivo “ex vivo” y Enzimoimmunoensayo (EIA) IL-17A**

Para poder medir los niveles de IL-17A, se recogieron muestras de suero de pacientes con TBP activa y de controles sanos. Se obtuvieron muestras de sangre anticoagulada con citrato sódico de los mismos grupos (63 controles sanos: 32 varones y 31 mujeres, y 52 pacientes con TBP activa: 28 varones y 24 mujeres). Estas muestras se cultivaron “ex vivo” durante 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en presencia de fitohemaglutinina (PHA) como un estimulador policlonal, ESAT-6 o CFP-10 como antígenos específicos de Mtb o suero salino como control de no estimulación). Tras la incubación se recogió el plasma y se congeló a -80°C hasta su análisis.

Los niveles de IL-17 han sido determinados utilizando un EIA comercial (Human IL-17A High Sensitivity ELISA, eBioscience, Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria).

#### **4.13. Análisis estadístico**

Se utilizó el software SPSS, versión 12 (Statistical Product and Service Solutions, Chicago, IL, USA).

Las frecuencias alélicas, haplotípicas y genotípicas se han estimado mediante conteo directo. El método de  $\chi^2$  test se utilizó para ver si la población control se encontraba en equilibrio de Hardy Weinberg (HWE), utilizando la herramienta Simple Hardy-Weinberg Calculator-Court Lab (Washington State University College of Veterinary Medicine, Pullman, WA, USA). La comparación de las frecuencias alélicas, haplotípicas y genotípicas entre los diferentes grupos (controles sanos, pacientes con TBP, e individuos con ITL en el caso del HLA) se ha realizado mediante el uso de tablas de contingencia 2x2 simples y el test de  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher cuando ha sido necesario, con corrección de Yates.

Se han calculado los valores de  $p$ , odds ratio (OR) con intervalos de confianza (IC) del 95%. Valores de  $p$  inferiores a 0.05 han sido considerados estadísticamente significativos. Se han analizado los modelos de susceptibilidad dominante, recesiva y aditivo:

Dominante: es suficiente con tener un alelo de la variante genética para modificar el riesgo. El tener dos copias del mismo alelo lo hace en igual proporción. En este modelo se comparan las frecuencias de la combinación de homocigotos y heterocigotos para un alelo con los homocigotos para el otro alelo (v.g TC + CC frente a TT).

## Pacientes y Métodos

Recesivo: es necesaria la presencia de las dos copias de la variante alélica para modificar el riesgo. Los individuos heterocigotos y los homocigotos para el alelo que aparece con mayor frecuencia tienen el mismo riesgo (v.g. CC se compara frente a TC + TT)

Aditivo: supone que cada copia de la variante, v.g. C en el caso anterior, modifica el riesgo de un modo aditivo (en escala logarítmica por lo que en algunos casos se denomina modelo logaditivo). Por tanto, los homocigotos CC tiene el doble de riesgo que los heterocigotos TC. Se realiza una comparación ponderada dando un valor de 1 a los heterocigotos y de 2 a los homocigotos.

El poder estadístico de los diferentes análisis de los resultados obtenidos se ha calculado en todos los casos mediante el uso del software PS Power and Sample Size Calculations, version 3.0 (NCSS Statistical Analysis & Graphics Software, Kaysville, UT, USA).

En el caso de *CCL5*, *MBL2* y *Dectina-1/CARD9*), los estudios comparativos de las frecuencias alélicas, haplotípicas y genotípicas, y el análisis del desequilibrio de ligamiento (LD) se ha realizado utilizando el software online SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats/>). [150]

Para construir los bloques de LD y reforzar el estudio también se ha utilizado el software HaploView 4.2 (<https://www.broadinstitute.org>).

Para analizar las diferencias en la producción de IL-17 entre controles sanos y pacientes con TBP se ha utilizado el método de análisis para valores con distribución no paramétrica de Mann-Whitney. Este análisis se ha realizado utilizando el software GraphPad Prism, version 5.03. Los valores de p menores de 0.05 son considerados significativos. En todos los casos los análisis estadísticos realizados han sido de dos colas. No se aplicó la corrección Bonferroni [151-155].

### **4.14. Aspectos éticos**

Todos los procedimientos utilizados en este estudio son conformes a los principios señalados en la Declaración de Helsinki. Todas las muestras se han recogido tras un consentimiento informado oral y escrito, y firmado por cada uno de los individuos que han participado en el estudio. Las muestras y reactivos utilizados en este trabajo se han manipulado teniendo en cuenta las normas de bioseguridad del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

## Pacientes y Métodos

El protocolo del estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Comunidad Autónoma de Cantabria. Todas las muestras se han manejado y analizado de forma anónima, respetando en todo momento las normas de protección de datos (LO 15/1999).



## **5. RESULTADOS**



### 5.1. Descripción de la Población De Estudio

Las características demográficas de los individuos de este estudio se recogen en la Tabla 8.

<b>Característica</b>	<b>Controles sanos n = 266</b>	<b>Individuos con ITL N = 119</b>	<b>Pacientes con TBP N = 192</b>
<b>Varones</b>	150	116	74
<b>Mujeres</b>	116	80	45
<b>Ratio varón / mujer</b>	1.29	1.40	1.64
<b>Media de edad</b>	49	55	54
<b>Rango de edad</b>	18-66	21-76	24-68

Tabla 8. Principales características demográficas de los controles sanos, individuos con ITL y pacientes con TBP incluidas en el estudio.

### 5.2. Distribución de los antígenos HLA de clase I

El estudio de tipificación de los antígenos y haplotipos HLA se realizó en 160 pacientes con TBP, 109 individuos con ITL y 262 controles sanos.

#### HLA-A

Respecto al locus A, solamente el antígeno HLA-A\*02 se encontró con mayor frecuencia en individuos con ITL comparado con controles sanos (34.86% vs 25.19%,  $p=0.009$ , OR 1.59 IC95% 1.13- 2.24) y con pacientes con TBP (34.86% vs 25.79%,  $p=0.03$ , OR 1.54 IC95% 1.06- 2.24) respectivamente (Tablas 9 y 10). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y pacientes con TBP. El poder estadístico fue de un 98% y 97% respectivamente.

Resultados

Alelo HLA	Controles n = 524	ITL n = 218	Controles vs ITL		
HLA-A*	n (%)	n (%)	<i>P</i>	OR	95%CI
01	56 (10.69)	20 (9.17)			
<b>02</b>	<b>132 (25.19)</b>	<b>76 (34.86)</b>	<b>0,0098</b>	<b>0,63</b>	<b>0.45-0.89</b>
03	69 (13.17)	16 (7.34)			
11	43 (8.21)	8 (3.67)			
23	19 (3.62)	5 (2.29)			
24	40 (7.63)	15 (6.88)			
25	12 (2.29)	6 (2.75)			
26	16 (3.05)	9 (4.13)			
29	48 (9.16)	22 (10.09)			
30	20 (3.82)	9 (4.13)			
31	13 (2.48)	4 (1.83)			
32	12 (2.29)	9 (4.13)			
33	16 (3.05)	8 (3.67)			
34	1 (0.19)	0 (0.0)			
66	4 (0.76)	0 (0.0)			
68	22 (4.20)	9 (4.13)			
74	0 (0.0)	1 (0.46)			
80	1 (0.19)	1 (0.46)			

Tabla 9. Distribución de los antígenos del locus A del HLA de clase I en controles sanos, e individuos con ITL. La n es el doble del nº de individuos de cada grupo pues considera ambos alelos. Sólo se muestran los valores estadísticamente significativos.

El \* indica que la determinación de los antígenos HLA se ha realizado mediante técnicas de biología molecular.

Resultados

Alelo HLA	ITL n = 218 n (%)	TBP n = 318 n (%)	TBP vs ITL		
			P	OR	95%CI
01	20 (9.17)	28 (8.81)			
<b>02</b>	<b>76 (34.86)</b>	<b>82 (25.79)</b>	<b>0,0302</b>	<b>0,65</b>	<b>0.45-0.94</b>
03	16 (7.34)	38 (11.95)			
11	8 (3.67)	26 (8.18)			
23	5 (2.29)	7 (2.20)			
24	15 (6.88)	35 (11.01)			
25	6 (2.75)	11 (3.46)			
26	9 (4.13)	8 (2.52)			
29	22 (10.09)	30 (9.43)			
30	9 (4.13)	10 (3.14)			
31	4 (1.83)	9 (2.83)			
32	9 (4.13)	8 (2.52)			
33	8 (3.67)	14 (4.40)			
34	0 (0.0)	2 (0.63)			
66	0 (0.0)	0 (0.0)			
68	9 (4.13)	10 (3.14)			
74	1 (0.46)	0 (0.0)			
80	1 (0.46)	0 (0.0)			

Tabla 10. Distribución de los antígenos del locus A del HLA de clase I en pacientes con TBP e individuos con ITL. Un paciente con TBP no pudo ser tipificado y por ello la n en los pacientes con TBP es de 318 en lugar de 320. Sólo se muestran los valores estadísticamente significativos.

### HLA-B

Inicialmente, no se hallaron diferencias, pero tras reanalizar los datos, se encontraron importantes diferencias estadísticamente significativas en la distribución de diferentes antígenos HLA-B entre controles sanos, individuos con ITL y pacientes con TBP (Tablas 11-13).

Existe un porcentaje significativamente elevado de HLA-B07 en controles respecto de pacientes con TBP ( $p=0.0013$  OR 0.36 IC95% 0.20-0.67) (Tabla 15). El poder estadístico de esta asociación era mayor del 60%.

Alelo HLA	CONTROLES n = 524 n (%)	TBP n = 318 n (%)	TBP vs Controles		
			P	OR	IC 95%
<b>HLA-B*</b>	n (%)	n (%)			

Resultados

07	<b>57 (10,88)</b>	<b>14 (4,40)</b>	<b>0,0016</b>	<b>0,38</b>	<b>0,21-0,69</b>
08	30 (5,73)	9 (2,83)	0,077	0,48	0,22-1,02
13	12 (2,29)	5 (1,57)			
14	31 (5,92)	14 (4,40)			
15	41 (7,82)	16 (5,03)			
18	20 (3,82)	8 (2,52)			
27	20 (3,82)	9 (2,83)			
35	53 (10,11)	22 (6,92)			
37	4 (0,76)	2 (0,63)			
38	6 (1,45)	5 (1,57)			
39	3 (0,57)	3 (0,94)			
40	18 (3,44)	8 (2,52)			
41	4 (0,76)	4 (1,26)			
44	104 (19,85)	49 (15,41)			
45	6 (1,45)	0 (0,00)			
47	0 (0,00)	0 (0,00)			
48	0 (0,00)	0 (0,00)			
49	17 (3,24)	8 (2,52)			
50	10 (1,91)	4 (1,26)			
51	41 (7,82)	26 (8,18)			
52	7 (1,34)	2 (0,63)			
53	10 (1,91)	0 (0,00)			
55	8 (1,53)	2 (0,63)			
56	2 (0,38)	1 (0,19)			
57	14 (2,67)	7 (2,20)			
58	6 (1,45)	0 (0,00)			
78	0 (0,00)	0 (0,00)			
95	0 (0,00)	0 (0,00)			

Tabla 11. Distribución de los antígenos HLA-B (número y frecuencia) en controles sanos y pacientes con TBP. En negrita se muestran las asociaciones estadísticamente significativas

Cuando comparamos individuos con ITL y controles sanos, existe un porcentaje claramente significativo del antígeno HLA-B14, más frecuente en individuos con ITL ( $p=0,0003$  OR 2.64 IC95% 1.56-4.46), y en menor grado de los antígenos HLA-B08, B40 y B44) (Tabla 12).

El poder estadístico fue de un 92% para B14, 61% para B08, 55% para B40 y menor del 50% para B44.

Alelo HLA	CONTROLES n = 524	ITL n = 218	ITL vs Controles		
			P	OR	IC 95%
HLA-B*	n (%)	n (%)			

Resultados

07	57 (10,88)	32 (14,68)			
<b>08</b>	<b>30 (5,73)</b>	<b>22 (10,09)</b>	0,049	1,85	1,04-3,28
13	12 (2,29)	2 (0,92)			
<b>14</b>	<b>31 (5,92)</b>	<b>31 (14,22)</b>	<b>0,0003</b>	<b>2,64</b>	<b>1,56-4,46</b>
15	41 (7,82)	23 (10,55)			
18	20 (3,82)	14 (6,42)			
27	20 (3,82)	15 (6,88)			
35	53 (10,11)	28 (12,84)			
37	4 (0,76)	4 (1,83)			
38	6 (1,45)	2 (0,92)			
39	3 (0,57)	4 (1,83)			
<b>40</b>	<b>18 (3,44)</b>	<b>16 (7,34)</b>	<b>0,03</b>	<b>2,23</b>	<b>1,12-4,42</b>
41	4 (0,76)	4 (1,83)			
<b>44</b>	<b>104 (19,85)</b>	<b>59 (27,06)</b>	<b>0,037</b>	<b>1,5</b>	<b>1,04-2,17</b>
45	6 (1,45)	2 (0,92)			
47	0 (0,00)	1 (0,46)			
48	0 (0,00)	1 (0,46)			
49	17 (3,24)	9 (4,13)			
50	10 (1,91)	4 (1,83)			
51	41 (7,82)	24 (11,01)			
52	7 (1,34)	2 (0,92)			
53	10 (1,91)	4 (1,83)			
55	8 (1,53)	3 (1,34)			
56	2 (0,38)	2 (0,92)			
57	14 (2,67)	6 (2,75)			
58	6 (1,45)	2 (0,92)			
78	0 (0,00)	1 (0,19)			
95	0 (0,00)	1 (0,19)			

Tabla 12. Distribución de los antígenos HLA-B (número y frecuencia) en controles sanos e individuos con ITL. En negrita se muestran las asociaciones estadísticamente significativas.

Cuando se compararon individuos con ITL respecto a los pacientes con TBP, se observó un porcentaje claramente significativo de varios antígenos, más frecuentes en individuos con ITL: HLA-B07, ( $p < 0,0001$  OR 0.27 IC95% 0.14-0.51), HLA-B08, ( $p = 0,0008$  OR 0.26 IC95% 0.12-0.58), HLA-B14, ( $p < 0,0001$  OR 0.28 IC95% 0.14-0.54), y HLA-B44, ( $p = 0,0014$  OR 0.49 IC95% 0.32-0.75), y en menor medida de los antígenos HLA-B15, B18, B27, B35 y B40 (Tabla 13).

Alelo HLA	ITL n = 218	TBP n = 318	TBP vs ITL		
			P	OR	IC 95%
HLA-B*	n (%)	n (%)			

Resultados

<b>07</b>	<b>32 (14,68)</b>	<b>14 (4,40)</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,27</b>	<b>0,14-0,51</b>
<b>08</b>	<b>22 (10,09)</b>	<b>9 (2,83)</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,26</b>	<b>0,12-0,58</b>
13	2 (0,92)	5 (1,57)			
<b>14</b>	<b>31 (14,22)</b>	<b>14 (4,40)</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,28</b>	<b>0,14-0,54</b>
<b>15</b>	<b>23 (10,55)</b>	<b>16 (5,03)</b>	<b>0,025</b>	<b>0,45</b>	<b>0,23-0,87</b>
<b>18</b>	<b>14 (6,42)</b>	<b>8 (2,52)</b>	<b>0,043</b>	<b>0,38</b>	<b>0,15-0,91</b>
<b>27</b>	<b>15 (6,88)</b>	<b>9 (2,83)</b>	<b>0,044</b>	<b>0,39</b>	<b>0,17-0,92</b>
<b>35</b>	<b>28 (12,84)</b>	<b>22 (6,92)</b>	<b>0,03</b>	<b>0,50</b>	<b>0,28-0,91</b>
37	4 (1,83)	2 (0,63)			
38	2 (0,92)	5 (1,57)			
39	4 (1,83)	3 (0,94)			
<b>40</b>	<b>16 (7,34)</b>	<b>8 (2,52)</b>	<b>0,015</b>	<b>0,33</b>	<b>0,14-0,78</b>
41	4 (1,83)	4 (1,26)			
<b>44</b>	<b>59 (27,06)</b>	<b>49 (15,41)</b>	<b>0,0014</b>	<b>0,49</b>	<b>0,32-0,75</b>
45	2 (0,92)	0 (0,00)			
47	1 (0,46)	0 (0,00)			
48	1 (0,46)	0 (0,00)			
49	9 (4,13)	8 (2,52)			
50	4 (1,83)	4 (1,26)			
51	24 (11,01)	26 (8,18)			
52	2 (0,92)	2 (0,63)			
53	4 (1,83)	0 (0,00)			
55	3 (1,34)	2 (0,63)			
56	2 (0,92)	1 (0,19)			
57	6 (2,75)	7 (2,20)			
58	2 (0,92)	0 (0,00)			
78	1 (0,19)	0 (0,00)			
95	1 (0,19)	0 (0,00)			

Tabla 13. Distribución de los antígenos HLA-B (número y frecuencia) individuos con ITL respecto de pacientes con TBP. En negrita se muestran las asociaciones estadísticamente significativas. El poder estadístico fue de un 100% para B07, 90% para B08, 96% para B14, 89% para B44, y mayor del 50% en el resto de asociaciones significativas.

### HLA-C

Al analizar el locus C, solamente el antígeno HLA-C08 se encontró con mayor frecuencia en individuos con TBP comparado con controles sanos (9.75% vs 5.34%,  $p=0.022$ , OR 1.91 IC95% 1.12- 3.25) y con pacientes con TBP (34.86% vs 25.79%,  $p=0.03$ , OR 1.54 IC95% 1.06- 2.24) (Tabla 14). No se encontraron diferencias significativas al comparar individuos con ITL y pacientes con TBP.

## Resultados

Alelo HLA	CONTROLES n = 524	ITL n = 218	TBP n = 318	TBP vs CONTROLES		
				P	OR	95%CI
HLA-C*	n (%)	n (%)	n (%)			
01	18 (3.44)	8 (3.67)	18 (5.66)			
02	36 (6.87)	11 (5.05)	15 (4.72)			
03	48 (9.16)	18 (8.26)	31 (9.75)			
04	75 (14.31)	29 (13.30)	38 (11.95)			
05	37 (7.06)	16 (7.34)	22 (6.92)			
06	36 (6.87)	15 (6.88)	18 (5.66)			
07	134 (25.57)	49 (22.45)	79 (24.84)			
<b>08</b>	<b>28 (5.34)</b>	13 (5.96)	<b>31 (9.75)</b>	<b>0,022</b>	<b>1,91</b>	<b>1,12-3,25</b>
12	26 (4.96)	14 (6.42)	12 (3.77)			
14	6 (1.14)	7 (3.21)	9 (2.83)			
15	26 (4.96)	16 (7.34)	13 (4.09)			
16	50 (9.54)	21 (9.63)	30 (9.43)			
17	4 (0.76)	1 (0.46)	4 (1.26)			

Tabla 14. Distribución de los antígenos del locus C del HLA de clase I en controles sanos, pacientes con TBP e individuos con ITL. El poder estadístico fue del 66%.

### 5.3. Distribución de los antígenos HLA de clase II

Respecto al locus DRB1, el antígeno HLA-DRB1 04 se encontró con mayor frecuencia en individuos con TBP comparado con controles sanos (17.30% vs 11.83%,  $p=0.037$ , OR 1.55 IC95% 1.04-2.29). No se hallaron diferencias significativas al comparar las frecuencias de este antígeno entre pacientes con TBP e individuos con ITL ni entre estos y controles.

DRB1 07 se encontró con una menor frecuencia, estadísticamente significativa, en pacientes con TBP vs controles sanos e individuos con ITL (13.84% vs 19.66%,  $p=0.036$ , OR 0.65 IC95% 0.44-0.96 y 13.84% vs 21.10,  $p=0.034$  OR 0.60 IC95% 0.38-0.94 respectivamente) (Tablas 15 y 16).

No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y pacientes con TBP en las frecuencias de esta antígeno.

HLA ALELO	CONTROLES n = 524	TBP n = 318	TBP vs CONTROLES		
			P	OR	95%CI
HLA-DRB1*	n (%)	n (%)			
01	68 (12.98)	43 (13.52)			

Resultados

03	52 (9.92)	37 (11.64)			
<b>04</b>	<b>62 (11.83)</b>	<b>55 (17.30)</b>	<b>0.037</b>	<b>1.55</b>	<b>1.04-2.29</b>
<b>07</b>	<b>103 (19.66)</b>	<b>44 (13.84)</b>	<b>0.036</b>	<b>0.65</b>	<b>0.44-0.96</b>
08	19 (3.63)	13 (4.09)			
09	5 (0.95)	2 (0.63)			
10	6 (1.14)	4 (1.26)			
11	49 (9.35)	31 (9.75)			
12	6 (1.14)	4 (1.26)			
13	74 (14.12)	34 (10.69)			
14	10 (1.91)	11 (3.46)			
15	62 (11.83)	35 (11.01)			
16	8 (1.52)	7 (2.20)			

Tabla 15. Distribución de los antígenos del locus DRB1 del HLA de clase II en controles sanos y pacientes con TBP. El poder estadístico fue de un 94% para DRB1 04 y 99% para DRB1 07.

<b>Alelo HLA</b>	<b>ITL n = 218</b>	<b>TBP n = 318</b>	<b>ITL vs TBP</b>		
<b>HLA-DRB1*</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>95%CI</b>
01	23 (10.55)	43 (13.52)			
03	19 (8.72)	37 (11.64)			
04	31 (14.22)	55 (17.30)			
<b>07</b>	<b>46 (21.10)</b>	<b>44 (13.84)</b>	<b>0.034</b>	<b>0.60</b>	<b>0.38-0.94</b>
08	15 (6.88)	13 (4.09)			
09	2 (0.92)	2 (0.63)			
10	3 (1.32)	4 (1.26)			
11	20 (9.17)	31 (9.75)			
12	0 (0.0)	4 (1.26)			
13	22 (10.09)	34 (10.69)			
14	8 (3.67)	11 (3.46)			
15	26 (11.93)	35 (11.01)			
16	3 (1.32)	7 (2.20)			

Tabla 16. Distribución de los antígenos del locus DRB1 del HLA de clase II en controles sanos e individuos con ITL. El poder estadístico de la asociación fue de un 84%.

Respecto a los loci DQA1 y DQB1, al comparar las frecuencias de los antígenos del mismo entre los tres grupos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tablas 17 y 18).

## Resultados

Alelo HLA	CONTROLES n = 524	ITL n = 218	TBP n = 318
HLA-DQA1*	n (%)	n (%)	n (%)
01	222 (42.36)	84 (38.54)	129 (40.57)
02	102 (19.46)	46 (21.10)	43 (13.53)
03	75 (14.31)	33 (15.14)	60 (18.87)
04	15 (2.86)	12 (5.50)	11 (3.46)
05	109 (20.80)	42 (19.27)	78 (24.53)
06	1 (0.02)	1 (0.05)	1 (0.03)

Tabla 17. Frecuencia de los antígenos del locus DQA1 en los diferentes grupos de estudio.

Alelo HLA DQB1*	CONTROLES n = 524 n (%)	ITL n = 218 n (%)	TBP n = 318 n (%)
02	141 (26.91)	60 (27.52)	78 (24.54)
03	145 (27.67)	61 (27.98)	106 (33.33)
04	16 (3.05)	12 (5.50)	12 (3.79)
05	95 (18.13)	37 (16.97)	61 (19.19)
06	127 (24.24)	48 (22.02)	65 (20.45)

Tabla 18. Frecuencia de los antígenos del locus DQB1 en los diferentes grupos de estudio.

### 5.4. Distribución de los genes, haplotipos y genotipos *KIR*

En este estudio, 233 controles sanos, 169 pacientes con TBP y 119 individuos con ITL fueron analizados. Utilizando el software poptree2 se construyó el árbol filogenético o dendrograma y las distancias genéticas entre las poblaciones de la base de datos de frecuencias de genes *KIR* (The Allele Frequency Net Database, <http://www.allelefrequencys.net/#>) (Figura 18).

## Resultados

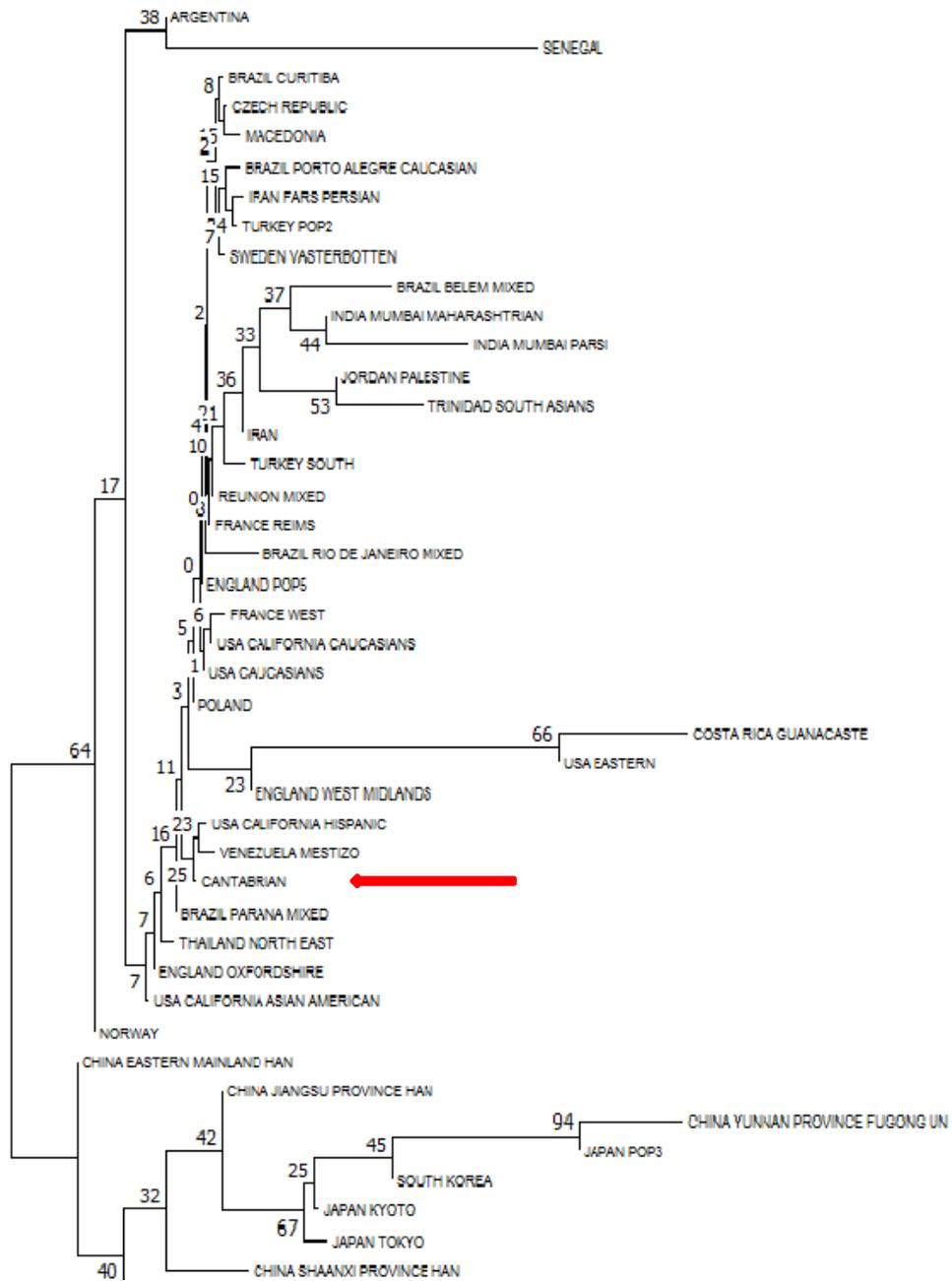


Figura 18. Árbol filogenético con las distancias genéticas según la frecuencia de los genes *KIR*.

## Resultados

Los resultados del estudio de las frecuencias en la distribución de los genes *KIR* en nuestra población se muestran a continuación (Tabla 19).

Genes KIR	TBP n (%)	ITL n (%)	Controles n (%)	<i>p</i> ITL vs Controles	OR	IC 95%	<i>p</i> ITL vs TBP	OR	IC 95%
2DL2	88 (52.1)	70 (52.1)	108 (46.3)	<b>0.036</b>	1.65	1.06-2.58	-	-	-
2DS2	91 (53.8)	71 (59.7)	107 (45.9)	<b>0.02</b>	1.74	1.11-2.73	-	-	-
2DS4	155 (91.7)	117 (98.3)	214 (91.8)	<b>0.028</b>	5.19	1.19-22.69	<b>0.018</b>	5.28	1.18-23.70
2DS5	61 (36.1)	29 (24.4)	92 (39.5)	<b>0.007</b>	0.49	0.30-0.81	<b>0.047</b>	0.57	0.34-0.96

Tabla 19. Distribución de los genes *KIR* en pacientes con TBP, individuos con ITL y controles. Sólo se muestran aquellos genes donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El poder estadístico del estudio fue de 83%, 83%, 60% y 80% para ITL vs controles, y 81 y 71% para ITL vs TBP respectivamente.

## Resultados

No se encontraron diferencias en la frecuencia de genes *KIR* entre pacientes con TBP y controles. Respecto a los individuos con ITL, *KIR2DL2*, *2DS2*, *2DS4* y *2DS5* estaban presentes con mayor frecuencia en estos comparados con el grupo control, mientras que sólo *KIR2DS4* y *2DS5* eran significativamente más frecuentes en individuos con ITL vs pacientes con TBP.

Respecto al análisis de los diferentes genotipos *KIR*, se identificaron 43 genotipos diferentes: 16 compartidos entre los 3 grupos del estudio, 9, 6 y 4 exclusivos de controles, pacientes con TBP e individuos con ITL respectivamente. Se halló un nuevo genotipo (*2DL1*, *2DL3*, *2DL5*, *2DS1*, *2DS4*, *2DS5*, *2DP1*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, *3DS1*, *3DP1*) tomando como referencia la base de datos de genotipos *KIR*. (<http://www.allelefreqencies.net/kir6001a.asp>)

Sólo se encontraron diferencias en la frecuencia de los genotipos Bx2 y Bx4 en individuos con ITL vs controles sanos (Tabla 20).

Genotipo <i>KIR</i>	TBP (%)	ITL (%)	Controles (%)	<i>p</i> (ITL vs Controles)	OR	IC 95%
<b>Bx2</b>	28 (16.1)	10 (8.4)	41 (17.6)	<b>0.024</b>	0.43	0.21-0.89
<b>Bx4</b>	23 (13.6)	23 (19.3)	19 (7.9)	<b>0.003</b>	2.76	1.44-5.31

Tabla 20. Distribución de los genotipos *KIR* en pacientes con TBP, individuos con ITL y controles. Sólo se muestran aquellos genotipos donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El poder estadístico fue del 71% para Bx2 y 79% para Bx4.

En el estudio de los diplotipos *KIR* no se encontraron diferencias en la distribución de AA (A,-) y Bx (AB) y BB (B, -) entre los distintos grupos estudiados (Tabla 21).

## Resultados

Diplotipo <i>KIR</i>	TBP n (%)	ITL n (%)	Controles n (%)
A, -	45 (26.63)	34 (28.57)	73 (31.33)
<i>Bx</i>	92 (54.44)	72 (60.50)	122 (52.36)
B, -	32 (18.93)	13 (10.92)	38 (16.31)
Total	169	119	233

Tabla 21. Distribución de los diplotipos *KIR* en los tres grupos estudiados. No existen diferencias estadísticamente significativas.

Posteriormente, se analizó la distribución de la frecuencia de genes *KIR* centroméricos y teloméricos (Figura 14) y se comparó esta frecuencia entre controles, pacientes con TBP e individuos con infección latente, no hallándose ninguna diferencia.

### 5.5. Interacción de los receptores *KIR* con sus ligandos HLA

Se estudió la interacción de los receptores *KIR* inhibidores con sus ligandos HLA (Tabla 22 A-C).

<b>Grupo C1</b>	<b>Grupo C2</b>
C*01= 01:02	C*02= 02:02, 02:10
C*03= 03:02, 03:03, 03:04	C*04= 04:01
C*07= 07:01, 07:02, 07:04, 07:12, 07:18	C*05= 05:01
C*08= 08:01, 08:02, 08:08	C*06= 06:02
C*12= 12:02, 12:03	C*15= 15:02, 15:04, 15:05
C*14= 14:02	C*16= 16:02
C*16= 16:01	C*17= 17:01
	C*18= 18:02

Tabla 22A. Ligandos HLA de los receptores *KIR*, pertenecientes a los grupos C1 y C2

Resultados

<b>Bw4</b>	<b>Bw6</b>
<p>A*23, 24, 32 (son ligandos de KIR3DL1)                      A*25 (¿se considera ligando de KIR3DL1?:                      A* 2501 protege débilmente frente a la lisis mediada por                      células NK KIR3DL1+, eso podría significar que sí es                      ligando de KIR3DL1. Foley BA, Blood 2008;112:435-                      443)</p> <p>B*13 (pero no se considera ligando de                      KIR3DL1)                      B*15:13 (B77)                      B*15:16, 15:17 (B63)                      B*15:24 (B62)                      B*15:25 (B62)                      B*27 (excluyendo 27:08)                      B*37                      B*38                      B*44                      B*47                      B*49                      B*51                      B*52                      B*53                      B*57                      B*58                      B*59</p>	<p>B*07                      B*08                      B*14                      B*15:01 (B62)                      B*15:02, 15:08, 15:11 (B75)                      B*15:03 (B72)                      B*15:09 (B70)                      B*15:10 (B71)                      B*15:12 (B76)                      B*18                      B*27:08                      B*35                      B*39                      B*40                      B*41                      B*42                      B*45 (*45:01) y (*45:02)                      B*46                      B*48                      B*50                      B*54                      B*55                      B*56                      B*67                      B*73                      B*78                      B*81                      B*82</p>

Tabla 22B. Ligandos HLA-B pertenecientes a los grupos HLA-B Bw4 y Bw6.

<b>Bw4 Ile80</b>	<b>Bw4 Thr80</b>
<p>A*23, 24, 32 (son ligandos de KIR3DL1)                      A*25 (¿se considera ligando de KIR3DL1?)                      B*15:13 (B77), 15:16, 15:17 (B63), 15:24 (B62)                      B*27:02                      B*38:01                      B*49                      B*51                      B*52                      B*53                      B*57                      B*58</p>	<p>B*13:01, *13:02                      B*27 (excluyendo 27:02 y 27:08)                      B*37                      B*38:02                      B*44                      B*47</p>

Tabla 22C. Ligandos HLA-B con Isoleucina o Treonina en la posición 80.

## Resultados

La frecuencia de *KIR2DL1* con HLA-C de grupo 2 (C02, 04, 05, 06, 15, 16, 17 y 18), se encontró con mayor frecuencia en controles vs pacientes con TBP (67.4 versus 56.9%,  $p=0.035$ , OR 0.64 IC95% 0.42-0.96). Respecto a individuos con ITL, *KIR3DL1* interaccionando con antígenos HLA-Bw4 se encontró con mayor frecuencia que en pacientes con TBP (74.1 frente a 61.1%,  $p=0.03$ , OR 0.55 IC95% 0.32-0.92) y *KIR2DS2* junto a *2DL2* se presentaba con mayor frecuencia comparado con controles (57.8 versus 45.7%,  $p=0.04$ , OR 1.68 IC95% 1.04-2.55), (Tabla 23).

RECEPTORES INHIBIDORES	CONTROLES	ITL	TBP	TBP vs CONTROLES <i>p</i> OR IC 95%	TBP vs ITL <i>p</i> OR IC 95%	ITL vs CONTROLES <i>p</i> OR IC 95%
<b>2DL1 y C2</b>	<b>67.4</b>	69.0	<b>56.9</b>	<b>0.0356 0.64 (0.42-0.96)</b>		
2DL1 sin C2	30.9	29.3	38.9			
2DL2 y C1	37.4	44.8	43.1			
2DL2 sin C1	9.1	12.9	9.0			
2DL3 y C1	72.6	72.4	70.1			
2DL3 sin C1	16.1	19.0	18.0			
2DL2/3 y C1	81.3	79.3	79.6			
3DL1 con Bw4 Ile, Thr o A	76.5	81.9	76.0			
<b>3DL1 con Bw4</b>	<b>68.3</b>	<b>74.1</b>	<b>61.1</b>		<b>0.0308 0.55 (0.32-0.92)</b>	
Ile80	25.2	23.3	30.5			
Thr80	35.2	40.5	38.3			
Ambas	7.8	10.3	7.8			
3DL1 sin Bw4	23.9	23.3	31.1			
3DL1 y A con Bw4	28.3	25.9	31.7			
3DL1 y A sin Bw4	63.9	71.6	60.5		0.0728 0.61 (0.36-1.01)	
3DL2 y A3 y/o A11	34.3	29.3	36.5			
2DL3 sin 2DL2	53.5	42.2	47.9			
<b>2DS2 con 2DL2</b>	<b>45.7</b>	<b>57.8</b>	52.1			<b>0.0442 1.63 (1.04-2.55)</b>
2DS2 sin 2DL2	0.4	0.9	1.8			

Tabla 23. Interacción de los genes *KIR* inhibidores con sus ligandos HLA de clase I. Las frecuencias se expresan en %.

El poder estadístico fue de un 82% para 2DL1 y C2, 60% para 3DL1 con Bw4 y 83% para la asociación 2DS2 con 2DL2.

## Resultados

Respecto a los genes *KIR* activadores y su interacción con los ligandos HLA, la presencia de más de un gen *KIR* activador (haplotipo B) junto con ligandos HLA-C del grupo 1 en homocigosis (C01, 03, 07, 08, 12, 14 y 16), se encontró con mayor frecuencia en pacientes con TBP respecto de controles e individuos con ITL (28.1, 10.9 y 16.4%,  $p < 0.00001$  OR 3.21 IC95% 1.88-5.48 y  $p = 0.03$  OR 2 IC95% 1.10-3.63, respectivamente). Igualmente, la presencia de KIR3DS1 sin ligando HLA-B del grupo Bw4, se halló con mayor frecuencia en pacientes con TBP que en individuos con ITL (16.8 vs 7.8%,  $p = 0.03$  OR 2.39 IC95% 1.08-5.29), (Tabla 24).

RECEPTORES ACTIVADORES / LIGANDOS	Controles	ITL	TBP	TBP vs CONTROLES		TBP vs ITL	
				<i>p</i>	OR IC 95%	<i>p</i>	OR IC 95%
2DS1 y C2	31.7	25.9	24.0				
2DS1 sin C2	14.8	8.6	16.8				
2DS2 y C1	37.0	45.7	44.3				
2DS2 sin C1	9.1	12.9	9.6				
3DS1 con Bw4	33.0	26.7	25.1				
Ile80	14.3	8.6	9.6				
Thr80	15.2	16.4	14.4				
Ambas	3.5	1.7	1.2				
<b>3DS1 sin Bw4</b>	13.0	<b>7.8</b>	<b>16.8</b>			<b>0.0313</b>	<b>2.39 (1.08-5.29)</b>
3DS1 y A con Bw4	16.1	6.9	13.2				
3DS1 y A sin Bw4	30.0	27.6	28.7				
C1, C1 con 1 activador	8.3	12.9	11.4				
<b>C1, C1 con &gt;1 activador</b>	<b>10.9</b>	<b>16.4</b>	<b>28.1</b>	<b>&lt;0.00001</b>	<b>3.21 (1.88-5.48)</b>	<b>0.0309</b>	<b>2 (1.10-3.63)</b>
C1, C1 con 0 activador	0	0.0	0				

Tabla 24. Interacción de los genes *KIR* activadores con sus ligandos HLA. Las frecuencias se expresan en %. Sólo se reflejan los resultados estadísticamente significativos. La potencia del estudio fue de un 63% para 3DS1 sin Bw4 y del 99% para C1, C1 con >1 acti

### 5.6. Frecuencias de genes *KIR* activadores e inhibidores

Cuando se compararon las frecuencias de los genes *KIR* que codifican para receptores activadores entre los diferentes grupos del estudio se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa en la presencia de dos genes activadores entre pacientes con TBP e individuos con ITL vs controles (28 y 25% vs 20%,  $p=0.02$  OR 2.11 IC95% 1.15-3.90 y  $p=0.0017$  OR 2.82 IC95% 1.50-5.35 respectivamente) (Tabla 25).

Dentro de estos, la frecuencia de los genes *KIR2DS2* y *KIR2DS4* conjuntamente era más frecuente en individuos con ITL frente a controles sanos 19.33 vs 8.15%,  $p=0.0039$  OR 2.70 IC95% 1.40-5.19).

GENES <i>KIR</i>	TBP	ITL	CONTROLES	TBP vs CONTROLES			LTI vs CONTROLES		
	n (%)	n (%)	n (%)	$p$	OR	IC 95%	$p$	OR	IC 95%
1 ACTIVADOR	45 (26.63)	35 (29.41)	74 (31.76)						
<b>2 ACTIVADORES</b>	<b>28 (16.57)</b>	<b>25 (21.01)</b>	<b>20 (8.58)</b>	<b>0.02</b>	<b>2.11</b>	<b>1.15-3.90</b>	<b>0.0017</b>		<b>1.50-5.35</b>
<b>2DS2+2DS4</b>	23 (13.61)	<b>23 (19.33)</b>	<b>19 (8.15)</b>				<b>0.0039</b>	<b>2.70</b>	<b>1.40-5.19</b>
3 ACTIVADORES	29 (17.16)	18 (15.13)	36 (15.45)						
4 ACTIVADORES	38 (22.49)	16 (13.45)	53 (22.75)						
5 ACTIVADORES	20 (11.83)	21 (17.65)	35 (15.02)						
6 ACTIVADORES	9 (5.33)	4 (3.36)	15 (6.44)						
TOTAL	169 (100)	119 (100)	233 (100)						

Tabla 25. Frecuencia de genes que dan lugar a receptores *KIR* activadores en los diferentes grupos del estudio. La potencia del estudio fue de un 64 % para 2 activadores entre TBP y controles, 87% entre ITL y controles, y para 2DS2+2DS4 del 70% entre ITL y controles.

Al estudiar la frecuencia de los genes *KIR* que codifican receptores inhibidores no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos estudiados.

### 5.7. Frecuencias de los polimorfismos en el promotor de *CCL5*

Según la base de datos de SNPs del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), en lo referente al SNP rs2107538 (-403 G/A), el alelo G es el más frecuente en todas las poblaciones estudiadas, siendo el alelo A el alelo ancestral. Respecto al SNP rs2280788 (-28 C/G), el alelo C sería el alelo ancestral y el de mayor frecuencia en las poblaciones estudiadas.

En este estudio, se analizaron las frecuencias de los dos SNPs del promotor de *CCL5*, rs2107538 (-403 G/A) y rs2280788 (-28 C/G) en 76 pacientes con TBP y 157 controles sanos (Tabla 26).

ALELO	CONTROLES n (%)	TBP n (%)	<i>P</i>	OR	IC 95%
<b>-403G</b>	271 (86.31) <sup>a,b</sup>	110 (72.37)	0.0004 <sup>c</sup>	0.42	0.26-0.67
<b>-403A</b>	43 (13.69)	42 (27.63)			

ALELO	CONTROLES n (%)	TBP n (%)	<i>P</i>	OR	IC 95%
<b>-28C</b>	298 (94.90)	126 (82.89)	0.00001 <sup>c</sup>	0.26	0.13-0.50
<b>-28G</b>	16 (5.10)	26 (17.11)			

Tabla 26. Frecuencias alélicas de los SNPs, rs2107538 (-403 G/A) y rs2280788 (-28 C/G).

<sup>a</sup> Los datos se expresan como números absolutos y porcentajes (en paréntesis)

<sup>b</sup> La n refleja la suma de los dos alelos de cada SNP, por lo que el número total es el doble del número de casos y controles.

<sup>c</sup> El valor de *p* es el mismo para el otro alelo de cada SNP.

La potencia estadística era de un 100% para -403G/A y del 96% para -28C/G.

La distribución de los diferentes alelos y genotipos (calculada mediante el método de  $\chi^2$ ) de ambos SNPs se encontraba en HWE ( $p=0.52$  para -403 G/A y  $0.50$  para -28 C/G). Cuando se analizaron las frecuencias de los distintos genotipos en pacientes con TBP y controles, se observó que el genotipo G/G del polimorfismo -403G/A era significativamente más frecuente en controles y el genotipo A/A en pacientes con TBP (73.89 vs 56.58%,  $p=0.01$  OR 0.46 IC95% 0.26-0.82 y 11.84 vs 1.27%,  $p=0.0009$  OR 10.41 IC95% 2.19-49.48 respectivamente) (Tabla 27). Al analizar el polimorfismo -28C/G se vio que el genotipo C/C era significativamente más frecuente en controles y el genotipo G/G en pacientes con TBP (89.81 vs 73.68%,  $p=0.003$  OR 0.32 IC95% 0.15-0.66 y 7.89 vs 0.0%,  $p=0.001$  OR e IC95% no calculable, respectivamente)

## Resultados

<b>GENOTIPO -403 G/A</b>	<b>CONTROLES n (%)</b>	<b>TBP n (%)</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<b>G/G</b>	116 (73.89)	43 (56.58)	0.01	0.46	0.26-0.82
<b>G/A</b>	39 (24.84)	24 (31.58)	0.35	1.40	0.76-2.50
<b>A/A</b>	2 (1.27)	9 (11.84)	0.0009	10.41	2.19-49.48

<b>GENOTIPO -28 C/G</b>	<b>CONTROLES n (%)</b>	<b>TBP n (%)</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<b>C/C</b>	141 (89.81)	56 (73.68)	0.003	0.32	0.15-0.66
<b>C/G</b>	16 (10.19)	14 (18.42)	0.12	1.99	0.91-4.33
<b>G/G</b>	0 (0.0)	6 (7.89)	0.001	NA	NA

Tabla 27. Distribución de los genotipos -403G/A y -28C/G en controles sanos y pacientes con TBP. Potencia estadística del SNP -403 G/A del 71% para el genotipo G/G y 82% para A/A. En el caso del SNP -228C/G, 82% para C/C y 76% para G/G.

Cuando se estudió el modelo de herencia, se observó que este correspondía a un modelo de herencia recesivo para el alelo G (más frecuente en controles) y dominante para el alelo A (más frecuente en pacientes con TBP), (Tabla 28).

<b>MODELO</b>	<b>GENOTIPO -403 G/A</b>	<b>CONTROLES n (%)</b>	<b>TBP n (%)</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
Recesivo	G/G vs					
	G/A + A/A	116 (73.89) 41 (26.11)	43 (56.58) 33 (43.42)	0,012	0,46	0,26-0,82
Dominante	G/G +G/A					
	vs A/A	155 (98.73) 2 (1.27)	67 (88.16) 9 (11.84)	0,0009	0,09	0,02-0,46
Aditivo	G/G (1/1) G/A (1/0) A/A (0/0)	---	---	0,0006	0,44	0,27-0,71

Tabla 28. Análisis de los modelos de herencia del polimorfismo -403G/A. La potencia estadística fue del 71% para el modelo recesivo y del 73% para el recesivo.

Al estudiar las frecuencias haplotípicas y de los diferentes diplotipos de los polimorfismos de CCL5, también se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 29). Así, el haplotipo GC se encontró significativamente con mayor frecuencia en controles respecto

## Resultados

pacientes con TBP (82.80 vs 59.21%,  $p < 0.00001$  OR 0.30 IC95% 0.19-0.47), mientras que los haplotipos GG y AC eran significativamente más frecuentes en pacientes con TBP (13.16 vs 3.50%,  $p = 0.0002$  OR 4.17 IC95% 1.94-8.96 y 23.68 vs 12.10%,  $p = 0.002$  OR 2.25 IC95% 1.36-3.73). La potencia estadística de estas diferencias era del 97% para G/G, 75% para G/C y 61% para A/C.

Respecto a los diferentes diplotipos analizados, G/G C/C se encontró significativamente con mayor frecuencia en controles (66.88 vs 38.16%,  $p = 0.0001$  OR 40.31 IC95% 0.17-0.54), mientras que los diplotipos G/G G/G y A/A C/C eran más frecuentes en pacientes con TBP (7.89 vs 0.00%,  $p = 0.001$  OR e IC95% no aplicables y 10.53 vs 1.27%,  $p = 0.002$  OR 9.12 IC95% 1.89-44.07). La potencia estadística del análisis de los diplotipos fue del 99% para el diplotipo G/G C/C, y del 75% y 76% para G/G G/G y A/A C/C, respectivamente.

HAPLOTIPO <sup>a</sup>	CONTROLES n (%)	TBP n (%)	P	OR	IC 95%
GC	260 (82.80)	90 (59.21)	<0.00001	0.30	0.19-0.47
GG	11 (3.50)	20 (13.16)	0.0002	4.17	1.94-8.96
AC	38 (12.10)	36 (23.68)	0.002	2.25	1.36-3.73
AG	5 (1.59)	6 (3.95)	0.18	2.54	0.76-8.46

DIPLOTIPO	CONTROLES n (%)	TBP n (%)	P	OR	IC 95%
G/G C/C	105 (66.88)	29 (38.16)	0.0001	0.31	0.17-0.54
G/G C/G	11 (7.01)	8 (10.53)	0.51	1.56	0.60-4.06
G/G G/G	0 (0.00)	6 (7.89)	0.001	NA	NA
A/A C/C	2 (1.27)	8 (10.53)	0.002	9.12	1.89-44.07
A/A C/G	0 (0.00)	1 (1.32)	0.71	NA	NA
A/A G/G	0 (0.00)	0 (0.00)	NA	NA	NA
G/A C/C	34 (21.66)	19 (25.0)	0.68	1.21	0.63-2.29
G/A C/G	5 (3.18)	5 (6.58)	0.30	2.14	0.60-7.63
G/A G/G	0 (0.00)	0 (0.00)	NA	NA	NA

Tabla 29. Frecuencias haplotípicas y de los diferentes diplotipos de los SNPs del promotor de *CCL5* (rs2107538: -403 G/A y rs2280788: -28 C/G).

<sup>a</sup> La n en haplotipos es el doble del número de controles y pacientes (dos alelos por cada SNP)

### 5.8. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo T1805G de *TLR1*

En este estudio se analizaron muestras de 190 pacientes con TBP y 192 controles sanos. Todas las frecuencias alélicas y genotípicas se encontraban en HWE ( $\chi^2$  0.31,  $p = 0.58$ ).

## Resultados

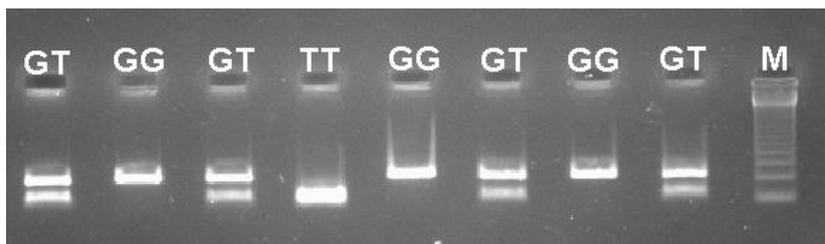


Figura 19. PCR-RFLP y electroforesis en gel de agarosa. Se observan los diferentes genotipos homocigoto GG, heterocigoto GT y heterocigoto TT. M, marcador de peso molecular.

Se encontró una significación estadística en la distribución de los alelos del SNP T1805G entre pacientes y controles (Tabla 30). El alelo G era más frecuente dentro del grupo de pacientes mientras que el alelo T lo era dentro del grupo control ( $p= 0.02$ , OR 1.43 IC95% 1.07-1.90).

ALELO <sup>a</sup>	CONTROLES n (%)	TBP n (%)	<i>P</i>	OR	IC 95%
<b>T</b>	218 (56.77)	182 (47.89)	<b>0.017</b>	<b>1.43</b>	1.07-1.90
<b>G</b>	166 (43.23)	198 ( <b>52.11</b> )			

Tabla 30. Frecuencias alélicas del SNP T1805G de *TLRI* en controles y pacientes.

<sup>a</sup> El número absoluto de alelos T y G en cada grupo es el doble que el número de sujetos en cada grupo pues se tienen en cuenta los dos alelos del SNP. La potencia estadística del estudio para detectar una OR de 2 es del 99,70%

Posteriormente, se realizó un estudio de las frecuencias de los diferentes genotipos TT, TG y GG según los modelos dominante, recesivo y aditivo (Tablas 31 y 32). Al analizar los genotipos, se observó que en pacientes con TBP, el genotipo 1805GG era significativamente más frecuente ( $p= 0.005$ , OR 2.04 IC95% 1.26-3.31) bajo un modelo de herencia recesivo. La potencia estadística del estudio es de un 98%

GENOTIPO 1805 T/G	CONTROLES n (%)	TBP n (%)	<i>P</i>	OR	IC 95%
<b>T/T</b>	60 (31.25)	50 (26.32)	<b>0.005</b>	<b>2.04</b>	1.26-3.31
<b>T/G</b>	98 (51.04)	82 (43.16)			
<b>G/G</b>	34 (17.71)	58 ( <b>30.53</b> )			

Resultados

Tabla 31. Distribución de los diferentes genotipos del SNP 1805T/G

MODELO	GENOTIPO 1805 T/G	CONTROLES n (%)	TBP n (%)	P	OR	IC 95%
Recesivo	G/G vs T/G + TT	34 (17.71) <b>158 (82.29)</b>	<b>58 (30.53)</b> 132 (69.47)	<b>0.005</b>	<b>2.04</b>	1.26-3.31
Dominante	G/G + T/G vs T/T	132 (68.75) 60 (31.25)	140 (73.68) 50 (26.32)			
Aditivo	G/G (1/1) T/G (1/0) T/T (0/0)	---	---	0.017	0.71	0.54-0.94

Tabla 32. Análisis de los modelos de herencia de los diferentes genotipos del SNP 1805T/G.

### 5.9. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *IL-17 -152G/A*

En este estudio se analizaron muestras de 192 pacientes con TBP y 266 controles sanos. Todas las frecuencias alélicas y genotípicas se encontraban en HWE ( $p=0.82$ ).

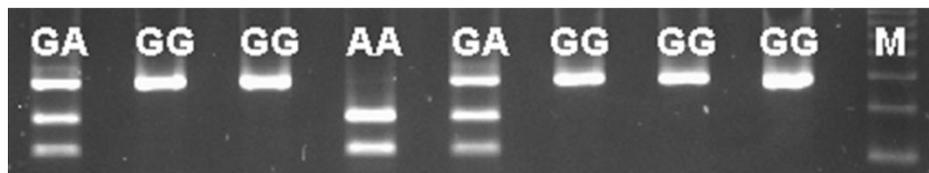


Figura 20. PCR-RFLP y electroforesis en gel de agarosa. Se observan los diferentes genotipos homocigoto -152G/G, heterocigoto -152G/A y heterocigoto -152A/A. M, marcador de peso molecular.

A

B

## Resultados

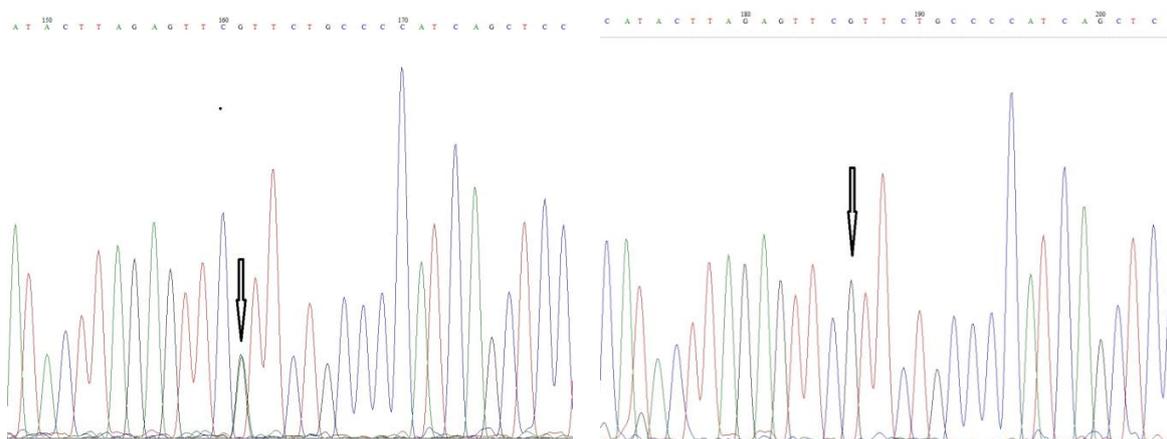


Figura 21. Mediante secuenciación automática, se confirmaron varias muestras para la presencia de los diferentes alelos / genotipos. En la imagen de la izquierda (A), la flecha señala un individuo heterocigoto G/A para el SNP -152G/A. En la imagen de la derecha (B), se observa un individuo homocigoto para el alelo G.

Al analizar las frecuencias alélicas se encontró una significación estadística en la distribución de los alelos del SNP -152G/A entre pacientes y controles (Tabla 33). El alelo -152G era significativamente más frecuente dentro del grupo de pacientes mientras que el alelo A lo era dentro del grupo control (70.31 vs 62.78%,  $p=0.02$ , OR 1.40 IC95% 1.06-1.86).

ALELO <sup>a</sup>	CONTROLES n (%)	TBP n (%)	P	OR	IC 95%
<b>G</b>	334 (62.78)	270 ( <b>70.31</b> )	0.02	1.40	1.06-1.86
<b>A</b>	198 (37.22)	114 (29.69)			

Tabla 33. Frecuencias alélicas del SNP -152G/A de *IL-17A* en controles y pacientes.

<sup>a</sup> El número absoluto de alelos G y A en cada grupo es el doble que el número de sujetos en cada grupo pues se tienen en cuenta los dos alelos del SNP. La potencia estadística del estudio para detectar una OR de 2 es del 99,60%

Cuando se realizó la comparación de las frecuencias de los distintos genotipos (G/G, G/A y A/A) entre controles y pacientes con TBP, bajo los distintos modelos de herencia, se observó que el genotipo -152G/G comparado con la suma de los genotipos -152G/A y -152A/A era significativamente más frecuente en pacientes con TBP (50.52% vs 39.10%,  $p=0.015$  OR 1.59 IC95% 1.09-2.31), es decir, respondía a un modelo recesivo donde son necesarias las dos copias de la variante para conferir riesgo, (Tabla 34).

Resultados

MODELO	GENOTIPO -152G/A	CONTROLES n (%)	TBP n (%)	P	OR	IC 95%
	G/G	104 (39.10)	97 (50.52)			
	G/A	126 (47.37)	76 (39.58)			
	A/A	36 (13.53)	19 (9.90)			
<b>Recesivo</b>	G/G vs G/A + A/A	104 (39.10) 162 (61.90)	97 ( <b>50.52</b> ) 95 (49.48)	<b>0.019</b>	<b>1.59</b>	<b>1.09-2.31</b>
Dominante	G/G + G/A vs A/A	230 (86.47) 36 (13.53)	173 (91.10) 19 (9.90)			
Aditivo	G/G (1/1) G/A (1/0) A/A (0/0)	---	---	0.02	1.38	1.02-1.81

Tabla 34. Distribución de los diferentes genotipos del SNP -152G/A y análisis de los diferentes modelos de herencia. La potencia estadística de este estudio fue del 100%.

### 5.10. Niveles séricos y tras estimulación “ex vivo” de IL-17 en los grupos del estudio

Respecto a los niveles de IL-17, los pacientes con TBP tenían niveles significativamente más elevados en suero que los controles sanos ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 22A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la producción de IL-17A tras estimulación con ESAT-6, CFP-10 o PHA ni en el grupo control ni en el de pacientes con TBP (Fig. 22B). Tampoco se hallaron diferencias significativas en los niveles de IL-17 en suero o plasma esstimulado cuando se analizaron pacientes con diferentes genotipos del SNP -152G/A (Fig. 22C).

## Resultados

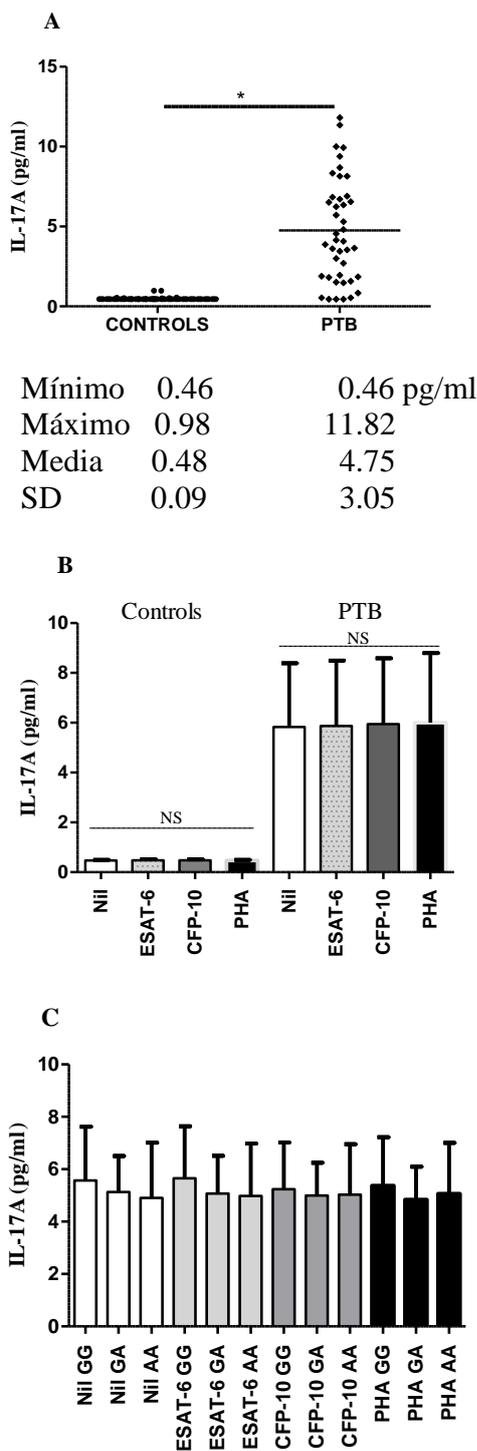


Figura 22. A. Niveles séricos de IL-17A en controles (n = 63) y en pacientes con TBP (n = 52).

\* indica  $p < 0.0001$

B. Niveles de IL-17A tras estimulación de sangre completa “ex vivo” con PHA, ESAT-6, CFP-10 o sin estimular (Nil) en controles y pacientes. NS (no diferencias significativas).

C. Influencia del genotipo IL-17 -152G/A en la producción de IL-17A en pacientes (20 pacientes con genotipo GG, 16 con genotipo GA and 16 con genotipo AA). No se encontraron diferencias significativas.

### 5.11. Frecuencia alélicas de las variantes estructurales y polimorfismos del promotor de *MBL2*

En este estudio incluimos 107 pacientes con TBP y 441 controles sanos. El mayor número de controles incluidos se debió a que también se incluyeron controles procedentes de otro estudio sobre el papel de la MBL en la susceptibilidad frente a infecciones en pacientes que recibieron un trasplante autólogo de médula ósea. [156]

Todas las frecuencias alélicas, haplotípicas y de los diferentes genotipos se encontraba en HWE ( $p=0.01$ , 0.54 y 0.57 respectivamente).

Al analizar las diferentes variantes estructurales del exón 1 del gen *MBL2* y los polimorfismos en el promotor del mismo, sólo se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia del alelo D entre controles y pacientes con TBP (6.69 % en controles vs 2.34% en pacientes,  $p=0.014$  OR 0.33 IC95% 0.13-0.84), (Tabla 35). La frecuencia del alelo A se halló con mayor frecuencia en pacientes con TBP (83.64 vs 78.23 %), pero esta diferencia no alcanzó significación estadística.

ALELOS	CONTROLES (441) n (%)	TBP (107) n (%)	<i>p</i>	OR	IC95%
A	690 (78.23)	179 (83.64)	0.09	1.42	0.96-2.11
B	126 (14.29)	28 (13.08)			
C	7 (0.079)	2 (0,093)			
<b>D</b>	<b>59 (6.69)</b>	<b>5 (2,34)</b>	<b>0.014</b>	<b>0.33</b>	<b>0.13-0.84</b>

Tabla 35. Frecuencias de los alelos o variantes estructurales en el exón 1 del gen *MBL2*. El poder estadístico del estudio fue de un 75%.

### 5.12. Haplotipos de *MBL2*

Al igual que ocurre con la variante estructural D, el haplotipo HYPD muestra la misma diferencia entre controles sanos y pacientes con TBP de nuestra Comunidad (Tabla 36).

## Resultados

HAPLOTIPOS	CONTROLES	TBPA	<i>p</i>	OR	95% CI
HYP A	245 (27.78)	64 (29.91)	<b>0.014</b>	<b>0.33</b>	<b>0.13-0.84</b>
LYQA	205 (23.24)	50 (23.36)			
LXPA	182 (20.63)	48 (22.43)			
LYPB	126 (14.29)	28 (13.08)			
<b>HYPD</b>	<b>59 (6.70)</b>	<b>5 (2.34)</b>			
LYPA	58 (6.58)	17 (7.94)			
LYQC	7 (0.79)	2 (0.93)			

Tabla 36. Frecuencia de los 7 haplotipos del gen *MBL2* en controles sanos y pacientes con TBP. El poder estadístico del estudio, al igual que en el caso de las variantes estructurales, fue de un 75%.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de los distintos genotipos entre ambos grupos, cualquiera que fuera la combinación ( genotipos de las variantes estructurales y polimorfismos del promotor aislados, variantes tomadas de dos en dos y reconocidas como normo-productoras o XA / YA vs productoras de bajos niveles de MBL: X/O, Y/O, ni comparaciones de genotipos utilizando ellos haplotipos extendidos).

### 5.13. Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los polimorfismos de Dectina-1 y CARD9

En este estudio, se incluyeron 201 pacientes con TBP, 114 individuos con ITL y 254 controles sanos.

Las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de todos los polimorfismos estudiados (rs3901533, rs7309123, rs16910526 del gen de la Dectina-1 y rs4077515 de CARD9) se encontraban en HWE.

Los tres polimorfismos de Dectina-1 estudiados se encontraban en estrecho desequilibrio de ligamiento (fig. 21).

## Resultados

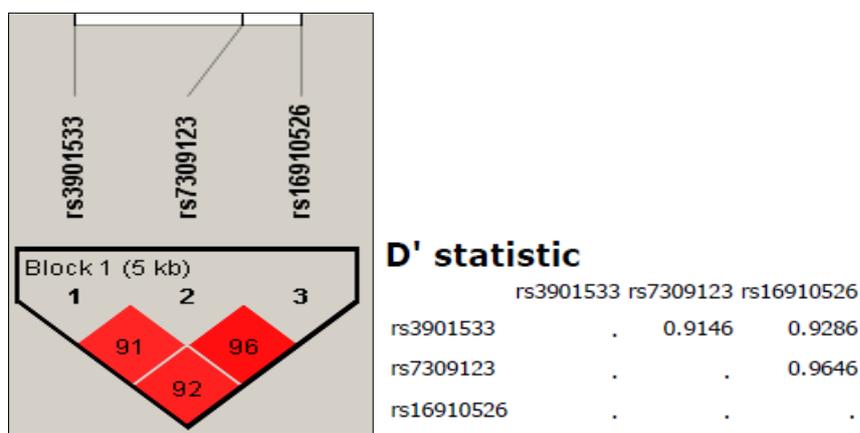


Figura 21. Bloque LD de los 3 polimorfismos del gen de la Dectina-1 y valor D' mostrando el desequilibrio de ligamiento de los mismos.

Cuando se analizaron las frecuencias de estos polimorfismos, de forma aislada y de los distintos haplotipos de Dectina-1 entre controles y pacientes con TBP, controles *vs* individuos con ITL y pacientes con TBP *vs* individuos con ITL (CCA, AGA, CGA, AGC, ACA, CGC, CCC, ACC, CCA, AGA, CGA, y AGC), no se encontraron diferencias significativas. Sólo el haplotipo AGA mostró cierta tendencia pero sin alcanzar significación estadística (19,7% en pacientes, 14,4% en controles,  $p=0.09$ ).

Cuando al estudio de los polimorfismos de el gen de la Dectina-1, se añadió, para ver si existía un efecto combinatorio, el polimorfismo rs4077515 del gen *CARD9*, se observó que el haplotipo AGA del gen de la Dectina-1 combinado con el alelo T, presentaba una frecuencia del 9.5 % en los pacientes con TBP y del 4.6% en controles ( $p=0.024$  OR 2.40 IC 95% 1.14-5.22), (Tabla 37).

HAPLOTIPO AGA + T	CONTROLES n (%)	TBP n (%)	P	OR	IC 95%
	11 (4.62)	20 ( <b>9.46</b> )	0.02	2.40	1.14-5.22
	243 (95.38)	181 (90.54)			

Tabla 37. Frecuencia del haplotipo combinado AGA + T en controles y pacientes con TBP. El poder estadístico del estudio es del 53%.

## **6. DISCUSIÓN**



## Discusión

La TB es una enfermedad que ha convivido con el ser humano durante miles de años, y que actualmente, según datos de la OMS, [1] constituye la segunda causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. *Mtb*, el microorganismo responsable de la TB infecta al individuo, y puede permanecer en él durante muchos años en forma de ITL, y sólo un 5-10% de los individuos infectados desarrollarán o progresarán hacia una enfermedad activa con síntomas clínicos que pueden suponer un compromiso vital para el sujeto, sobre todo si vive en áreas o países subdesarrollados, fundamentalmente el sudeste asiático y África subsahariana, donde los recursos para poder acceder a los tratamientos antituberculosos son difícilmente accesibles.

La comunidad científica ha evidenciado que esta progresión hacia una enfermedad activa es debida a una combinación de una serie de factores: unos dependientes del propio microorganismo (cepas más virulentas, expresión de ciertos genes, resistencia a fármacos de ciertas cepas, etc.), otros, dependientes del hospedador, principalmente relacionados con el normal funcionamiento de los sistemas inmunes innato y adquirido del mismo. Los factores demográficos y socioeconómicos contribuyen notablemente al control de esta progresión.

Hasta hace escasos años, España, y más concretamente Cantabria, eran una de las zonas de mayor prevalencia e incidencia de TB. En un estudio realizado en los años 2007-2010 (datos no publicados), en 312 individuos sanos donantes de sangre del Banco Regional de Sangre y Tejidos de Cantabria, observamos que un 16% estaban infectados por *Mtb* de forma latente. Este estudio se realizó utilizando un ensayo de liberación de IFN- $\gamma$ , y en todos los sujetos que dieron positivo para este ensayo, se realizó una confirmación repitiendo el ensayo a los tres meses, y realizando una prueba cutánea de tuberculina. Por tanto, pudimos comprobar la alta prevalencia de ITL en nuestro medio. Sin embargo, ninguno de estos sujetos evolucionó hacia una TBP.

Numerosos estudios epidemiológicos, realizados en diferentes grupos étnicos, incluso algunos realizados en gemelos apoyan la idea de que principalmente, son los factores genéticos del hospedador los que contribuyen a esa susceptibilidad o resistencia a la progresión.

Sobre la base de lo anteriormente expuesto, se han realizado un gran número de estudios retrospectivos, basados en casos y controles, para tratar de averiguar el papel que diferentes genes, fundamentalmente relacionados con el funcionamiento de la respuesta del sistema inmune frente a la infección por *Mtb*, juegan en este balance susceptibilidad / resistencia. Estos estudios se han centrado en unos pocos genes, o bien han sido del tipo GWAS.

## Discusión

La inconsistencia de muchos de los resultados obtenidos ha sido uno de los principales problemas que se encuentra cuando analiza los resultados. El principal problema de estos estudios es que muchos de ellos, realizados en grupos étnicos concretos, han obtenido resultados que no han podido ser reproducidos en otras etnias. Otras veces, el número de sujetos analizados era muy pequeño y por tanto, el poder estadístico de los resultados obtenidos, carecía de gran valor. Una explicación a esta inconsistencia en los resultados ha sido explicada por el posible efecto combinatorio entre genes y sus variantes (polimorfismos, mutaciones, etc.), y de todos es conocida la diferencia en el llamado “background” genético entre las distintas poblaciones.

En el preente trabajo, se ha pretendido esclarecer el papel que algunos de estos genes podría jugar en conferir resistencia o susceptibilidad frente a la infección por *Mtb* en nuestra Comunidad, y en algún caso en concreto (estudio de los genes del MHC y de los receptores KIR), ver si podrían existir factores que influyeran en la progresión hacia la enfermedad activa.

### **HLA**

Factores genéticos propios del hospedador podrían explicar de manera parcial la razón por la cual algunos individuos presentarían una mayor Resistencia frente a la TBP que otros. Sin embargo, el porcentaje de la carga genética que determinaría esta diferencia en la susceptibilidad a este agente infeccioso está aún muy lejos de ser totalmente esclarecido.

Probablemente, deberían considerarse otros factores tales como la existencia o no de infecciones concomitantes, el estado inmunológico del paciente, factores ambientales y socioeconómicos, y la variabilidad genética de *Mtb*, entre otros.

Se han publicado diferencias en la susceptibilidad a TB entre diferentes etnias. [3,144,157-161] Aunque parece claro que la susceptibilidad a la TB es multifactorial, se ha definido una estrecha relación entre el HLA, fundamentalmente con antígenos y alelos HLA de clase II, y en menor medida de clase I. [157, 162, 163]

No hay que olvidar, que el papel principal del HLA es la presentación de los antígenos, fundamentalmente extraños (v.g. patógenos) a las células del sistema inmune para dar lugar a una respuesta de estas frente a la posible agresión.

## Discusión

Cuando existen variantes o polimorfismos genéticos que se imponen sobre la heterogeneidad del hospedador, pueden ocurrir variaciones considerables en las diferentes asociaciones alélicas. [164-166]. Más aún, diferencias en las frecuencias alélicas y haplotípicas en el HLA difieren entre las distintas áreas geográficas. Teóricamente, esto podría explicarse como una consecuencia de la presión selectiva ejercida por la evolución, la cual ha permitido la aparición de polimorfismos en genes implicados en la resistencia frente a diferentes patógenos contribuyendo así a diferencias en las frecuencias alélicas en los mismos loci.

Respecto al HLA de clase I, existen pocas publicaciones demostrando una clara asociación entre estos antígenos o alelos con susceptibilidad o resistencia frente a TBP, y en muchas ocasiones, con resultados discordantes o de dudosa significación estadística. A ello se suma la imposibilidad de realizar meta-análisis rigurosos al estar gran parte de las publicaciones en lengua no inglesa.

Nuestros resultados muestran una asociación estadísticamente significativa entre los antígenos HLA de clase I y TBP en los tres loci, *A*, *B* y *C*. Es el primer estudio que realiza un análisis exhaustivo de todos los loci incluyendo individuos con ITL en el estudio. *HLA-A\*02* está presente significativamente con mayor frecuencia en individuos con ITL comparado con pacientes con TBP y con controles. Esto podría indicar, que podría ser un factor de susceptibilidad frente a la infección latente, pero que influiría en la no progresión a enfermedad activa.

Respecto al locus *B*, *B\*07* se encuentra significativamente más frecuentemente en controles e individuos con ITL que en pacientes con TBP, por lo que actuaría también como un antígeno protector frente a TBP. Cuando se comparan individuos con ITL vs pacientes con TBP, nos encontramos con que además de *B\*07*, los antígenos *B\*08*, *B\*14*, *B\*44*, y en menor medida *B\*15*, *B\*18*, *B\*27*, *B\*35* y *B\*40* también actuarían como antígenos que conferirían protección frente a la progresión hacia enfermedad activa.

La discusión sobre el antígeno *B\*07* merecerá una consideración especial más adelante.

Al comparar controles sano e individuos con ITL, *B\*14* y en menor medida, *B\*08*, *B\*40*, y *B\*44* podrían actuar permitiendo la entrada de *Mtb*, pero manteniéndolo en un estado de latencia.

Respecto al locus *C*, el antígeno *C\*08* se halló con más frecuencia en pacientes con TBP que en controles sanos, pudiendo suponer un antígeno que conferiría susceptibilidad frente a la enfermedad.

## Discusión

Mirando los diferentes estudios poblacionales realizados entre HLA de clase I y TBP, se observan resultados discordantes. [162,167]

### **HLA-A**

HLA-A2 ha sido asociado con susceptibilidad frente a TBP sólo en población egipcia, [168] mientras que en población del sur de Italia y de Brasil se ha asociado con resistencia frente a la misma. [169,170]. En población hindú del norte de la India se ha observado un aumento en la frecuencia de supertipos A3 (antígenos que unen péptidos similares al HLA A03 y disminuida de supertipos A1, péptidos similares a A01, en pacientes con TBP. [171]

También en un estudio realizado en población rusa, se halló una mayor frecuencia de A2 y menor de A9 en TBP con mala evolución. [172] En otro estudio, en el que se llegó a realizar cirugía de las lesiones cavernosas en pacientes con TBP, también realizado en Rusia, se halló una mayor frecuencia de A11. [173]

### **HLA-B**

Diferentes antígenos de locus HLA-B han sido asociados con susceptibilidad o resistencias en distintas poblaciones [162,167]. Así, en habitantes de Terranova, se observó una frecuencia aumentada de B8 entre pacientes con TBP, [174], B35 se ha asociado con TBP en China, [175], B15 en negros norteamericanos, [176] y junto con B18 en población del norte de la India, [177, 178], B5 en egipcios, [168] y B14 en el sur de Italia. [169]

En varios estudios realizados por el mismo grupo de investigadores, en diferentes etnias de Rusia, se han encontrado diferentes asociaciones. [172, 173,179-188]

Los antígenos publicados se han relacionado con susceptibilidad frente a TBP fueron B12, B13, B14, B15, B16, B22, B27. Estos estudios utilizaron técnicas serológicas para la tipificación del HLA, por lo que no se puede saber con exactitud qué antígenos concretos son los asociados con TBP en alguno de los estudios (B12 era la antigua denominación del grupo formado por los antígenos B44 y B45; B16 por los antígenos B38 y B39; B22 comprende los antígenos B54, B55 y B56)

## Discusión

En población brasileña de origen europeo y africano se ha comunicado una menor frecuencia de *B\*18*, lo cual conferiría resistencia frente a la infección tuberculosa. [170]. Ciertos alelos del antígeno B35 se han asociado con susceptibilidad a TB en amerindios de la etnia wichi en el noreste de Argentina. [101]. En Indonesia, en población de Java, se ha encontrado una asociación de TBP con el antígeno B18 y B40. [189]

Por el contrario, existen otros estudios en los que no se ha encontrado ninguna asociación, alguna de las cuales ha sido realizado por el mismo grupo y en la misma población. [190-192]

### **B\*07**

Este antígeno, en el que encontramos significativamente con mayor frecuencia en controles sanos y en individuos con ITL que en pacientes con TBP merece un comentario diferenciado del resto de asociaciones.

En un estudio en población americana de México, con un escaso número de pacientes con TBP e individuos con TST positivo se encontró débilmente asociado con TB. [193]. Igualmente, en población rusa con TBP, TB osteoarticular o TB diseminada se encontró también con mayor frecuencia que en población sana [182,194-196]. En otro estudio, realizado también en población rusa, se encontró con mayor frecuencia, en pacientes anérgicos. [197] En otro estudio, realizado en población rusa por los mismos autores, no observaron diferencias entre controles y pacientes. [181]. Otro estudio realizado en pacientes con TBP y en sus esposas, en India, encontró una mayor frecuencia de este antígeno, pero sólo entre pacientes DR2 positivos (DR15 o DR16). [198]

Solamente en un estudio de 50 pacientes con TB y 90 controles sanos realizado en el noreste de Rumanía, B7 se encontró significativamente más frecuentemente en controles. [199]

El antígeno B7 se ha asociado con una alta capacidad proliferativa *in vitro* de los linfocitos T en respuesta a estímulos policlonales en pacientes con TBP. [200]

De enorme interés resultan las evidencias de modelos experimentales, o los denominados “in silico” (simulaciones realizadas mediante complejos modelos computerizados) que evidencian que distintos péptidos o antígenos inmunogénicos de *Mtb* (ESAT-6, CFP10 y otros, son reconocidos por HLA-B07, el cual es expresado en la superficie de linfocitos T CD8+. [201-203]

## Discusión

En el presente trabajo, se obtiene por vez primera, una mayor frecuencia de este antígeno en controles sanos, y sobre todo, en individuos con ITL, lo cual va en contra de la mayor parte de los estudios publicados, donde este antígeno se encuentra más frecuentemente en pacientes con TBP o en casos de TB extrapulmonar, fundamentalmente osteoarticular.

Los modelos in vitro de estimulación con péptidos y antígenos de Mtb “in silico” apoyarían nuestros hallazgos, lo cual podría indicar que B7 expresado en linfocitos T CD8+, sería capaz de reconocer péptidos inmunogénicos de Mtb, dando lugar a respuestas inmunes capaces de controlar la infección, manteniéndola en un estado de latencia y evitando la progresión hacia la enfermedad activa.

### **HLA-C**

Respecto al HLA-C, son menos los estudios que reportan una asociación de antígenos de este locus con susceptibilidad frente a TBP. En un estudio realizado en población del norte de la India, se vio una mayor frecuencia del antígeno C01 en sujetos con TBP, [203] mientras que en la etnia wichi de Argentina se observó un aumento en la frecuencia del antígeno C03. [101]

En los estudios realizados en población rusa, los hallazgos apuntan a C04 en formas con una evolución benigna y C02 en individuos sometidos a cirugía de las lesiones pulmonares cavitadas. [172,186]. Otros estudio en el que se analizó la influencia en la susceptibilidad y severidad de TBP en función de la presencia de determinados supertipos HLA y su asociación con receptores KIR, evidenció una mayor frecuencia de antígenos C que interaccionan con receptores inhibidores, en concreto KIR2DL1 y KIR2DL2, en pacientes con TBP (C02, 04 y 05, y C01, 03 y 07 respectivamente). [171]

En un artículo publicado en etnia Han de China, refieren una diferencia en la frecuencia de antígenos HLA-C entre pacientes con microscopía de esputo positiva y negativa, encontrando mayor frecuencia de C04 en pacientes con TBP y microscopía positiva y de C08 en pacientes con microscopía negativa. [204].

Nosotros no hemos podido replicar ninguno de los hallazgos publicados anteriormente. Nuestro estudio refleja por vez primera una asociación de TBP con HLA-C\*08 en pacientes con TBP, todos ellos con cultivo positivo, sin diferenciar si la microscopía de esputo fue o no positiva. [148]

### **HLA-DRB1**

La mayor parte de los estudios de asociación a antígenos o alelos HLA de clase II con TBP se han llevado a cabo en comunidades o países donde la TB es un problema sanitario de primer orden. Muchos de estos estudios, en función principalmente del background genético de la población, han encontrado diferentes asociaciones, aunque muchas de ellas son coincidentes entre diferentes etnias.

En un meta-análisis analizando los artículos publicados en lengua inglesa y los datos de los resúmenes de los artículos publicados en ruso, se llegó a la conclusión de que sólo DR8 se asociaba con mayor riesgo de TBP y DR3 y DR7 con protección. [162]. Sin embargo, existen otros estudios donde se han encontrados claras asociaciones con otros antígenos (principalmente *DRB1\*15*, *DQB1\*05* and *DQB1\*06*) [205,206]. En este estudio se objetivo una asociación significativa entre susceptibilidad frente a TBP y presencia de *DRB1\*04*, la cual también aparece con el haplotipo extendido *DRB1\*04*; *DQA1\*03*; *DQB1\*03*. [148]

Un aspecto muy importante del antígeno DR4, es que en un trabajo realizado construyendo una micromatriz con 7.466 péptidos derivados de 61 proteínas de *Mtb*, se observó que 1.282, 674 y 1.854 péptidos formaban complejos estables con HLA-DR1, DR2 y DR4 respectivamente. [207] Lo que no se realizó fue un estudio funcional de la respuesta que la unión de estos péptidos podría generar en linfocitos expresando estos antígenos HLA, lo cual podría aportar gran conocimiento al papel que los antígenos HLA jugarían sobre la susceptibilidad frente a TB. No obstante, este tipo de estrategias metodológicas es el que se emplea en el diseño de vacunas, en busca de aquellos péptidos o antígenos que pueden dar lugar a una mayor respuesta inmunológica frente a los mismos.

Existen otros estudios en los que alelos pertenecientes a *DRB1\*04* alleles han sido asociados con TB en otras poblaciones tales como chinos de etnia Kazakh y en población con TBP de Siria. [208,209]. De igual manera, el haplotipo *DRB1\*04-DQB1\*03* se ha relacionado con una mayor susceptibilidad frente a TB. [210]. Es interesante mencionar que *DRB1\*04* se ha asociado con un mayor riesgo de evolución hacia enfermedad entre contactos familiares de pacientes con TBP en Brasil. [211]. Otro estudio, realizado en el sur de Italia, asocia la presencia de DR4 sólo o en combinación con B14 en pacientes con TB Antigua, pero no en pacientes recién diagnosticados. [169]

## Discusión

Otros estudios, han comunicado asociaciones con DR14 en población portuguesa, [212] DR4, DR10 y DR13 como antígenos de susceptibilidad y DR7 y DR15 como de resistencia frente a TBP en la provincia de Babilonia en Iraq, [213] y DR1 asociado con susceptibilidad, mientras que DR8 y DQB3 aparecen asociados con protección en población iraquí de Bagdad. [214]. Por otra parte, en este estudio se ha encontrado una frecuencia mayor del antígeno *DRB1\*07* tanto controles sanos, como en individuos con ITL comparado con pacientes con TBP. [148]

Respecto al papel de *DRB1\*07* en TB, existen resultados contradictorios. Mientras en un meta-análisis realizado con diferentes estudios que incluyen un total de 1988 pacientes y 2897 controles se encontró un riesgo reducido de padecer TB torácica en aquellos sujetos que eran portadores de este antígeno, [162] se han publicado otros estudios en los que se ha encontrado un a susceptibilidad mayor en aquellos individuos *DRB1\*07* positivos. [213,215,216]

En el presente trabajo no se halló una asociación estadísticamente significativa del haplotipo extendido *DRB1\*07; DQA1\*02; DQB1\*02* debido a la alta prevalencia en nuestra comunidad antígeno *DQB1\*03* (DQ9) en asociación con *DRB1\*07*.

Debido a las grandes diferencias en la distribución de antígenos y alelos en asociación con TBP, el papel exacto del HLA no es aún conocido. Se sabe que células mononucleares obtenidas de individuos *DRB1\*04* positivos, tanto sanos como pacientes con TBP, estimuladas con antígenos de *Mtb* producen niveles de IL6 más elevados que las de individuos con otros antígenos HLA-DR. [217] IL-6, junto con otras citocinas, quimiocinas y otras moléculas pertenecientes al sistema inmune innato han sido asociadas con susceptibilidad frente a TBP en diferentes poblaciones. [218]

No se hallaron diferencias en la distribución de antígenos de los loci *DQA1* y *DQB1*. Se han publicado diferentes asociaciones de los mismos con susceptibilidad o resistencia frente a TBP. [162] Estos resultados inconsistentes pueden tener su base en el background genético de las poblaciones estudiadas, en el escaso número de sujetos estudiados, en la mala selección de los controles (muchos de ellos no han sido analizados para descartar la presencia de individuos con ITL dentro de este grupo, sobre todo en poblaciones de India y del resto del continente asiático donde la infección por *Mtb* es casi endémica), lo cual podría dar lugar a resultados falsos positivos o negativos. Así, se ha encontrado asociación de TBP con una mayor frecuencia de *DQB1\*02, \*03, \*05, \*06* mientras que en otras ocasiones la presencia de estos antígenos ha sido asociada con resistencia frente a la enfermedad.

## Discusión

El presente trabajo es el primero realizado en población española, y más en concreto, de etnia caucásica en busca de estudiar la posible influencia de antígenos HLA de clase I y II en la susceptibilidad o resistencia frente a TBP. Además, es uno de los muy escasos trabajos, en los que se realiza una exhaustiva selección de los pacientes para asegurar un trasfondo genético conservado y en el que se utiliza una población de individuos infectados de forma latente por *Mtb* para intentar discernir con mayor claridad el papel de estos antígenos en el mantenimiento de los individuos infectados por *Mtb* en una fase de latencia y averiguar por qué algunos o muy pocos individuos progresan desde esta fase hacia una enfermedad pulmonar activa.

### **KIR**

Gran parte de la función de las células NK depende de la interacción de los receptores KIR con moléculas del sistema HLA, fundamentalmente HLA-C, y en menor medida, HLA-A y -B, expresadas en la superficie de la célula diana. [88]

Estos receptores KIR pueden ejercer una función activadora (2DS, 3DS) o inhibidora (2DS, 3DS) de la célula NK, y la combinación de los genes que dan lugar a estos receptores dando lugar a diferentes haplotipos (A y B) y genotipos con una mayor frecuencia de genes activadores o inhibidores, es lo que determina en gran medida la actividad de la célula NK. [89-91]

La frecuencia en la distribución de los genes *KIR* varía entre las distintas poblaciones y por tanto, también la frecuencia de los distintos genotipos y haplotipos (<http://www.allelefrequencias.net/kir6001a.asp>).

Al comparar la frecuencia de la distribución de los genes KIR en nuestra población con las publicadas previamente, se puede observar una mayor proximidad genética con ciertas poblaciones y no con otras, lo cual no significa que haya un origen común de las mismas, pues los fenómenos de variación y recombinación genética han podido ser muy parecidos en estas poblaciones. Sin embargo, este tipo de estudios se utiliza para explicar el origen de ciertas poblaciones, y los flujos migratorios de las mismas.

Al igual que sucede con el HLA, los genes KIR se asocian con un gran número de patologías, fundamentalmente enfermedades autoinmunes, trasplante de progenitores hematopoyéticos, abortos de repetición, tumores e infecciones:

([http://www.allelefrequencias.net/diseases/kddb\\_query.asp](http://www.allelefrequencias.net/diseases/kddb_query.asp)).

## Discusión

En el caso de la TBP existen varios estudios, realizados en diferentes poblaciones y con resultados inconsistentes. [92-102]. TBP asociado con *KIR2DL3* se ha encontrado en población mestiza de México, Líbano, China, India y Argentina), Sin embargo esta misma asociación no ha sido encontrada en otras poblaciones como Irán, China (misma etnia que en el caso anterior), y Canadá. El problema de alguno de estos estudios es el bajo número de pacientes y / o controles, o una mala selección de los mismos, al igual que ocurría en el caso del HLA, donde los controles no son sometidos a análisis para descartar la posible presencia de una infección latente.

Igualmente, existen estudios donde no se encuentra ninguna asociación entre genes KIR y TBP. [94] Curiosamente, en China, el mismo grupo reporta resultados discordantes analizando la distribución de genes KIR en pacientes con TBP de la misma etnia. [94,95,100] En estos estudios, se ha encontrado una mayor frecuencia de *KIR2DS1*, *2DS3* y *3DS1* en pacientes con TBP que no pudieron replicar en otros trabajos. En la India, otro grupo identificó *KIR3DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DS1* y *KIR2DS5* más frecuentemente en TBP, etc.

Recientemente en la población negra de Suráfrica se ha visto una mayor frecuencia de *KIR3DS1* y genotipos con 5 o más genes activadores y presencia de *KIR3DS1* como factores de protección frente a TBP. [219]

Por tanto, nos encontramos ante una situación similar a la que ocurre con el HLA. KIR comprende un grupo de genes también muy polimórfico que ha evolucionado de diferente manera en las distintas poblaciones, lo cual podría explicar la variabilidad de los resultados encontrados.

Este estudio, el primero realizado en etnia caucásica europea, en la población de Cantabria muestra unos resultados diferentes de los publicados previamente. En individuos con ITL se halló una mayor frecuencia de *KIR2DL2*, *2DS2* y *2DS4* que en controles sanos, y de *2DS5* en pacientes con TBP y controles que en el grupo con ITL. Igualmente se encontró una mayor frecuencia de los genotipos Bx2 y Bx4 en el grupo de ITL respecto del grupo control, y se halló un paciente con un nuevo genotipo desconocido que comprendía los siguientes genes: *2DL1*, *2DL3*, *2DL5*, *2DS1*, *2DS4*, *2DS5*, *2DP1*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, *3DS1* y *3DP1*.

No se encontró ninguna diferencia en la frecuencia de los distintos haplotipos entre los tres grupos de estudio, y sí en la interacción de los receptores KIR con sus ligandos HLA. Respecto

## Discusión

a los receptores inhibidores se halló más frecuentemente 2DL1 con C2 en TBP frente a controles, 3DL1 con Bw4 más frecuente en ITL comparado con el grupo de TBP y la presencia de 2DL2 junto con 2DS2 más frecuente en el grupo de ITL comparado con la población control. Respecto a los receptores inhibidores, 3DS1 sin ligando Bw era más frecuente en el grupo de TBP que en el de ITL y la presencia de antígenos HLA-C del grupo 1 con presencia de más de un receptor activador fue mucho más frecuente en pacientes con TBP que en el resto de grupos. La presencia de dos genes activadores se halló con mayor frecuencia en el grupo de pacientes con TBP y en el grupo de ITL que en controles, y si estos dos receptores eran 2DS2 y 2DS4, esto se veía más frecuentemente en el grupo de ITL *versus* controles sanos.

Estos resultados, son distintos de los publicados previamente. Como se ha descrito, existen grandes diferencias en la distribución de los genes KIR entre las distintas poblaciones estudiadas y la susceptibilidad a TBP. Los genes KIR son altamente polimórficos, y ese polimorfismo explicaría esta gran diversidad de frecuencias.

Es muy probable, que no sólo la presencia o ausencia de determinados genes KIR, sino su interacción con otros genes, como los del sistema HLA sean los que determinen el riesgo o no de padecer ciertas enfermedades, en este caso TBP. En este estudio, se han encontrado diferencias significativas, tanto en la frecuencia de genes KIR, como de genotipos, número de receptores activadores / inhibidores y su interacción con ligandos HLA. Estas diferencias en los diferentes genes KIR y su interacción podría, por tanto, explicar, al menos en nuestra población, parte de la susceptibilidad frente a TBP o a progresión o no desde un estado de latencia hacia la enfermedad activa.

El mecanismo último es aún desconocido, pero podría responder a señales activadoras o inhibidoras que afectaran a la actividad de las células NK en el reconocimiento de células infectadas por Mtb, las cuales mediante la expresión o no de ligandos de estos receptores y su interacción con los mismos. Este juego de reconocimiento a través de receptores KIR estimuladores o inhibidores, junto con mecanismos complejos de interacción de la célula NK con linfocitos T, sería el que permitiría a la célula infectada escapar de los mecanismos de control de la célula NK dando lugar a una mayor susceptibilidad a la enfermedad tuberculosa.

## CCL5

En la región reguladora o promotor de *CCL5* se ha descrito la existencia de tres SNPs funcionales (403G/A, -28C/G e *In1.1T/C*) que han sido implicados en la regulación de la actividad

## Discusión

tyranscripcional y expresión de *CCL5* en diferentes líneas celulares humanas. [220-222]. Además, se ha demostrado que la presencia aislada del SNP -403A se asocia con menores niveles séricos de *CCL5*. [111]

Estudios previos no encontraron ninguna asociación entre *CCL5* y TBP en poblaciones de México y Corea del Sur. Sin embargo, se ha descrito una asociación significativa entre polimorfismos en el promotor de otras quimiocinas como *CCL2* y *MCP1*. [159]

Más aún, otro estudio publicado evidenció que otras quimiocinas, como *CCL4* y *CCL18*, también se asociaban significativamente con susceptibilidad frente a TBP. [223]

Solo un estudio encontró una asociación significativa entre polimorfismos en el promotor de *CCL5* y TBP. Este estudio se realizó en chinos de Hong Kong. [112]

En este trabajo, se analizó la frecuencia de los tres SNPs (-403G/A, -28 C/G e *In1.1T/C*). Se identificaron dos haplotipos de riesgo: A-C-T y G-C-C, en las posiciones -403, -28 and *In1.1*, respectivamente. Además, combinando los genotipos *CCL5* -403 e *In1.1*, se vio que dos diplotipos GA/TT y GG/TC mostraban una fuerte asociación con TBP. Las frecuencias alélicas y genotípicas de ambos SNPs se encontraban en HWE, no así las del polimorfismo -28C/G. Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia en la distribución de los diferentes alelos de los tres SNPs ni en las frecuencias genotípicas de cada SNP entre controles y pacientes con TBP. Tampoco se encontró ninguna diferencia entre los haplotipos de (-403G/A y -28 C/G), ni en los distintos diplotipos al combinar los genotipos. Hay que mencionar que en este trabajo realizado en etnia china de Hong Kong, a los controles no se les realizó ningún ensayo para descartar la presencia de una infección latente (TST o IGRA). Igualmente, en los pacientes no se realizó una confirmación de la infección tuberculosa mediante cultivo.

El presente trabajo realizado en población caucásica de Cantabria, es el primero que muestra una asociación de polimorfismos del promotor de *CCL5*. Sólo se analizaron dos SNPs (-403G/A y -28 C/G) y por vez primera, se hallaron diferencias en la distribución de los alelos -403G y -28C, los cuales eran significativamente más frecuentes en el grupo control, por lo que podrían estar asociados con protección frente a TBP. Ambos polimorfismos se encontraban en estrecho desequilibrio de ligamiento. Igualmente, encontramos diferencias significativas en la distribución de haplotipos, genotipos y combinación de los mismos (diplotipos) entre ambos grupos.

## Discusión

Las diferencias encontradas entre este estudio y el realizado en chinos de Hong Kong podría estar relacionado con la diferente distribución en las frecuencias de los alelos de los dos SNPs analizados y por los aspectos anteriormente mencionados. Cabe destacar que el alelo *-28G*, ha sido encontrado con muy baja frecuencia en caucásicos (2% o menos), mientras que en poblaciones de Asia es más frecuente (15-20%). [224] La frecuencia de este alelo en nuestro grupo control fue de tan solo un 5.1% y de un 17,1% en pacientes con TBP. Por tanto, el papel de este alelo podría ser clínicamente relevante en conferir susceptibilidad frente a TBP.

Los hallazgos de este estudio apoyan un papel de estos dos SNPs en la susceptibilidad frente a TBP. De este modo, los alelos *-403G* y *-28C* estarían en relación con una mayor protección frente a TBP. Esta protección se hace aún más evidente cuando ambos alelos están presentes en el mismo haplotipo (*G-C*). Además la combinación de los genotipos de *CCL5 -403G/G* y *-28C/C*, dando lugar al diplotipo *G/G-C/C* mostraría una mayor protección frente a TBP. Es decir se objetiva una clara asociación entre los SNPs mencionados y protección frente a TBP en una población caucásica de España. Los pacientes estudiados representan un grupo muy homogéneo: todos presentaban la forma pulmonar de TB, eran VIH negativos, y procedían de una región, Cantabria, la cual ha sido definida como de un trasfondo genético altamente conservado. [225-227]. Además, el alto grado de significación estadística y el poder estadístico del estudio apoyarían el papel de la asociación encontrada en el mismo.

La asociación genética encontrada podría dar lugar a consecuencias funcionales, no estudiadas por no ser el objetivo del trabajo, regulando la actividad transcripcional de *CCL5*, sin excluir la posibilidad la posibilidad de que estos SNPs podrían actuar como simples marcadores genéticos de otras variantes con mayor efecto funcional sobre los niveles de expresión de esta proteína.

Los estudios mencionados, [221,222] del efecto de estas variantes sobre los niveles de *CCL5* podrían estar relacionados con esta protección frente a TBP. Igualmente, los diferentes alelos de estos SNPs podrían sinergizar con variantes presentes en otras contribuyendo en mayor o menor medida a la susceptibilidad frente a la enfermedad.

### **TLR1**

En lo referente a TLR1 y a la asociación del SNP funcional, *T1805G*, en incrementar el riesgo o la protección frente a TBP, resultados publicados habían mostrado ser contradictorios,

## Discusión

probablemente debido a las frecuencias alélicas y al trasfondo genético de las diferentes poblaciones analizadas. [228-231]

Uno de estos estudios, se realizó con sujetos de diferente origen étnico en Houston (Texas) y mostró una asociación del genotipo *TT* con un riesgo aumentado de TBP en afroamericanos pero no en caucásicos ni en hispanos. [228]. Otros dos estudios, realizados en China e India, no encontraron ninguna asociación significativa de este SNP con TBP. [229,230]. Un estudio realizado en Alemania, con población caucásica local y con población de Ghana, encontró una asociación del alelo *G* y del genotipo *GG* con TBP en población europea, pero no en la de Ghana, probablemente como resultado de la baja prevalencia de este alelo en la población africana. [231] Este trabajo sólo incluía 45 pacientes con TBP y 49 controles de Alemania, por lo que la potencia estadística del estudio resultó ser muy baja. Además, entre los pacientes con TB se incluían algunos con TB extrapulmonar.

En nuestro grupo control, la frecuencia del genotipo *GG* fue del 17.71%, mucho menor que la observada en controles caucásicos de otros estudios, y similar a otras etnias estudiadas (afroamericanos e hispanos). [228] esto puede ser debido al trasfondo genético conservado de nuestra población, la cual ha sido descrita como una población genéticamente conservada.

Nuestros resultados demuestran que el alelo *1805G* y el genotipo *GG* influyen, o al menos se asocian significativamente en un modelo de herencia dominante, sobre la susceptibilidad frente a TBP, en una población conservada, donde en el grupo control la frecuencia del alelo *T* es superior. [146] La diferencia con los resultados publicados en otras poblaciones, podría ser parcialmente debidos a esta frecuencia alélica.

Los TLRs reconocen los denominados PAMPS. En humanos, TLR1, 2, 4 y 6 reconocen moléculas presentes en la superficie de las micobacterias. La unión de estas al receptor formado por TLR2/TLR1 activaría la señalización celular llevando a su vez a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, de las células CD4+ y originaría una proliferación de las mismas y producción de varias citocinas proinflamatorias. [57]. Hay que mencionar que este SNP, ha sido asociado con protección frente a lepra. [231] Sin embargo, parece conferir riesgo frente a la malaria. [232] Por otro lado, el genotipo *TT* ha sido asociado con protección frente a pielonefritis en comparación con los genotipos *TG* y *GG*. [233]

## Discusión

El alelo G da lugar a un defecto en el tráfico de proteínas citoplásmicas hacia la membrana celular, donde los ligandos inducen la interacción de los TLRs con dichas proteínas fundamentales para activar las distintas vías de señalización. [231] Esto podría explicar un mal funcionamiento del receptor TLR2/TLR1 tras interaccionar con los ligandos de la superficie de *Mtb*, lo cual daría lugar a una alteración de una de las vías de la respuesta inmune innata.

### **IL-17**

En el estudio del polimorfismo funcional *-152G/A* y su influencia sobre la susceptibilidad o resistencia frente a TBP realizado en la misma población que en casos anteriores, se encontró que el alelo *-152G* y el genotipo *GG* del SNP rs2275913 era significativamente más frecuente en pacientes con TBP que en controles, bajo un modelo de herencia recesiva.

Este polimorfismo ha sido previamente relacionado con otras patologías, tales como asma infantil, [234], carcinoma hepatocelular en pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis B, [235], otros tipos de cáncer, [236], enfermedades autoinmunes, [237, 238] y enfermedad de injerto contra hospedador. [239]. Sin embargo, es la primera vez que se ha publicado un estudio de asociación de SNPs de IL-17A con TBP. [147]

En nuestra investigación, además de buscar si existía relación entre las frecuencias alélicas del SNP y la susceptibilidad o resistencia frente a TBP, también se estudió si el SNP estaba relacionado con los niveles de IL-17A en suero de pacientes y controles o tras estimulación de sangre “ex vivo” con antígenos específicos de *Mtb* (ESAT-6, CFP-10). El resultado demostró que los niveles de IL-17A en suero de pacientes con TBP eran significativamente mayores que los del grupo de controles sanos. Sin embargo, no se encontró una diferencia en los niveles de IL-17A en el sobrenadante de los ensayos de estimulación “ex vivo” entre controles y pacientes, independientemente del genotipo de los mismos. [148]. Estos resultados no concuerdan con otros, [234, 239,240] en los que células mononucleares de sangre obtenidas de donantes sanos estimuladas con PHA o con anticuerpos monoclonales anti-CD3 o anti-CD28 en individuos con diferentes genotipos mostraban diferencias en los niveles de IL-17 A (mayor producción en genotipos GA o AA). Esto podría ser debido a la influencia de algún otro SNP cercano al estudiado y con efecto funcional sobre la producción de IL-17 que pudiera estar interfiriendo con el SNP estudiado o también al tiempo de incubación de las células con los antígenos específicos de *Mtb*.

## Discusión

Sutherland JS et al [240], en un trabajo en el que no se clasificaron los grupos de estudio en función del genotipo, pero en el que la estimulación se realizó con una proteína de fusión ESAT-6/CFP-10 durante 7 días, observaron un aumento significativo en los niveles de IL-17. Aunque sería de esperar un aumento en los niveles de IL-17 tras una estimulación policlonal con PHA, la falta de este incremento podría estar en relación con lo mencionado (tiempo de estimulación, otros SNPs) o la falta de correlación con el genotipo, podría ser debida a otros factores ejerciendo un papel inhibitorio (SNPs funcionales cercanos), o a que realmente el SNP *-152G/A* actuaría como un marcador sustitutivo de otros SNPs funcionales que serían realmente los que conferirían el riesgo frente a TBP.

### **MBL**

La inmunidad innata es una de las barreras del sistema inmune más importantes en la defensa frente a la infección. Dentro de esta, el sistema del complemento y más concretamente, el sistema de activación de la cascada del complemento a través de la vía de las lectinas desempeña un importante papel. En esta vía, la MBL es una proteína de primera línea contra los patógenos invasores. Son muchos los trabajos publicados que establecen una relación entre los niveles circulantes de MBL y la predisposición frente a diversas enfermedades infecciosas. [241-243]

En la región codificante del gen *MBL2*, concretamente en el exón 1, se encuentran una serie de variantes estructurales que dan lugar a unos niveles reducidos o ausentes de MBL tanto si están presentes en heterocigosidad como en homocigosidad. Bajos niveles de MBL se asocian con defectos en la opsonización, lo cual facilita la aparición de infecciones recurrentes durante la infancia. [242]

Debido a un elevado desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos presentes en el promotor y las variantes estructurales del exón 1, solamente se han descrito 7 haplotipos (*HYP A*, *LYP A*, *LXP A*, *LYQ A*, *HYP D*, *LYP B*, y *LYQ C*), los cuales dan lugar a 28 posibles combinaciones. Las frecuencias de estas combinaciones o diplotipos varían considerablemente entre poblaciones. [244,245]

Entre los portadores del alelo normal o alelo A, el haplotipo *HYP A* es el que da lugar a una producción mayor de MBL, mientras que *LXP A* se asocia con niveles reducidos. Varios grupos han estudiado la relación entre las diferentes variantes genéticas y susceptibilidad frente a TBP, [246-248]. Estos estudios sugieren un papel protector de estas variantes en estado de

## Discusión

heterocigosidad, mientras otros apuntan hacia una susceptibilidad en pacientes que presentan estas variantes en homocigosis. [249]

Estudios previos mostraron resultados inconsistentes, al menos a nivel genético. Algunos autores reportaron una menor frecuencia del alelo B en pacientes con TBP de origen afroamericano, pero no en caucásicos o en hispanos. [250] Sin embargo, otros autores no han encontrado diferencias significativas en la frecuencia de variantes estructurales entre pacientes con TBP y controles, ambos de origen caucásico. Sin embargo, cuando incluían en el análisis polimorfismos del promotor en función de los niveles séricos de MBL: altos niveles (*YA/YA*, *YA/XA*, *XA/XA*, y *YA/O*), bajos niveles (*XA/O*), y déficit de MBL (*O/O*), sí aparecían diferencias significativas. [251-253]

Investigamos si las diferentes variantes estructurales o los polimorfismos en el promotor del gen de la MBL, considerándolos de forma aislada o reagrupados en haplotipos y diplotipos podrían asociarse con TBP en nuestra población. Los resultados obtenidos mostraron solamente una mayor prevalencia del alelo *D* y del haplotipo *HYPD* en controles sanos. Debido a la baja prevalencia de este alelo en nuestra población, el porcentaje de individuos sanos y pacientes con este alelo era también bajo (6.7 y 2.3% respectivamente), por lo que el efecto global tampoco era muy considerable. No obstante, esto podría indicar un papel protector del alelo *D*, y del haplotipo *HYPD* frente a TBP. No se hallaron diferencias significativas, ni en los polimorfismos del promotor, ni cuando se reagruparon las variantes y polimorfismos en haplotipos, diplotipos, etc. Estos hallazgos muestran una falta de concordancia con otras publicaciones como la realizada en España. [254]. Este hecho, podría en parte ser explicado por el diferente trasfondo genético entre ambas poblaciones, y quizá por diferencias entre las cepas de *Mtb*, las cuales podrían conferir mayor o menor patogenicidad al patógeno. Se ha descrito que diferentes cepas de *Mtb* expresan una gran variabilidad de las moléculas de la envoltura micobacteriana en su superficie, dando lugar a diferencias en su patogenicidad. [255,256]

### **DECTINA-1**

Dectina-1 es un receptor de lectinas tipo C, expresado principalmente en macrófagos, pero también en linfocitos y neutrófilos. [71] Este receptor tiene la capacidad de reconocer  $\beta$ -glucanos, los cuales son carbohidratos del tipo PAMP que se expresan fundamentalmente sobre la superficie de diversos hongos, incluyendo *Candida*, *Pneumocystis*, and *Aspergillus*, pero también en algunas bacterias. Los  $\beta$ -glucanos no pueden ser los únicos ligandos para este

## Discusión

receptor, ya que se sabe que Dectina-1 interacciona con micobacterias, las cuales no poseen este tipo de carbohidratos en su envoltura. [129]

Tras la unión Dectina-1 con su ligando, este receptor es capaz de promover señalización intracelular a través de diferentes cascadas de proteínas denominadas “scaffold” (Src, Syk), las cuales a su vez permiten la activación entre otras, de CARD9, la cual a su vez, activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, dando lugar a una activación de linfocitos CD4+, proliferación de los mismos y secreción de citocinas. [77]

Hasta la fecha se han descritos varios SNPs en *Dectina-1*, los cuales se han relacionados con susceptibilidad frente a infecciones fúngicas (candidemia, aspergilosis pulmonar, etc.). [78, 79,256-261]. Sin embargo ninguno de estos estudios se ha centrado en analizar la posible influencia de SNPs de *Dectina1/CARD9* sobre la susceptibilidad a TBP. El SNP de *CARD9* se ha relacionado con respuesta a peptidoglucanos, regulación positiva de la producción de TNF- $\alpha$ , respuesta a dsRNA exógeno, regulación positiva de la producción de IL-6 y regulación positiva de la respuesta inmune innata. [258,262] Debido a estas importantes funciones, se creyó interesante analizar su posible papel en la TBP.

En este estudio se ha analizado por primera vez, la asociación de varios polimorfismos del gen de la Dectina-1 y CARD9 con susceptibilidad o resistencia frente a la infección tuberculosa.

La relación entre tres SNPs de *Dectina-1* (rs3901533: NM\_197950.2:c.255+813T>G, rs7309123: NM\_197950.2:c.375-1404C>G y rs16910526: NM\_197950.2:c.477T>C) y uno de *CARD9* (rs4077515: NM\_052814.3:c.35G>A) y susceptibilidad o resistencia frente a TBP.

Todas las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs analizados se encontraban en HWE. Ninguno de los SNPs, analizados por separado evidenció diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélicas o genotípicas. Aunque los 3 SNPs de *Dectina-1* presentaban un fuerte desequilibrio de ligamiento, no se encontraron diferencias entre haplotipos o al combinar los diferentes genotipos. Cuando en el análisis, se incluyó el SNP de *CARD9*, se observó una asociación del haplotipo AGAT (9.46 vs 4.62 % en TBP y controles respectivamente) sugiriendo un efecto combinatorio de estos polimorfismos en la susceptibilidad frente a TBP.

## **Limitaciones del estudio**

### Fortalezas:

El presente trabajo ha sido diseñado con un tamaño muestral adecuado tanto para las muestras de individuos con ITL y pacientes con TBP, como de controles sanos.

El empleo de individuos pertenecientes a la misma región evita en parte la estratificación muestral, dado que los miembros de los diferentes grupos habitan en un ambiente similar, lo que evita posibles sesgos adicionales por interacción con factores ambientales.

En todos los casos, el diagnóstico de ITL y TBP se ha establecido por expertos clínicos y todas las determinaciones genéticas se han comprobado usando controles de calidad de los distintos experimentos de genotipado. Además la composición de los diferentes grupos es muy similar en cuanto a las características demográficas de edad y sexo.

Los análisis estadísticos han sido corregidos para el error Beta y se han empleado diferentes aproximaciones con resultados similares.

### Limitaciones:

Las muestras han sido seleccionadas en centros especializados, lo que supone un sesgo de selección inevitable.

Para estudios de este tipo realizados poblaciones con un trasfondo genético conservado, los resultados obtenidos pueden no ser reproducibles en otras poblaciones. Además, este estudio se ha realizado con una muestra de una región la cual no tiene una población demasiado amplia.

*Los resultados del presente trabajo demuestran un papel de las diferentes variantes genéticas analizadas sobre la susceptibilidad o resistencia a la ITL y / o TBP. Se describen por primera vez nuevas asociaciones, tanto de antígenos HLA como de genes KIR y de la interacción de los receptores expresados por estos genes con sus ligandos HLA, en pacientes con TBP, y sobre todo en individuos con ITL, los cuales apenas habían sido objeto de estudio previamente. Además, se ha establecido un riguroso criterio de selección de los controles que no se ha utilizado en otros trabajos publicados analizando el papel del sistema HLA y de los genes KIR en la TBP.*

*Respecto a CCL5, TLR1, IL-17, MBL y Dectina-1 / CARD9, en algún caso es el primer estudio realizado tratando de analizar su papel en la infección tuberculosa (Dectina-1/CARD9), y en*

## Discusión

*otros casos, se describen asociaciones no encontradas o publicadas anteriormente (CCL5, TLR1, IL-17).*

*Todos los genes estudiados juegan un papel muy importante en la formación y mantenimiento del granuloma tuberculoso, evitando una progresión de la infección latente hacia la enfermedad pulmonar activa. Los resultados obtenidos apoyarían la existencia de una “huella” o perfil genético en nuestra población en relación con el control de este granuloma y por tanto del estado de latencia o de progresión hacia TBP en individuos infectados por Mtb.*





## **7. CONCLUSIONES**



## Conclusiones

1. En nuestra población, se encontró una asociación de antígenos de HLA de clase I y II con susceptibilidad frente a ITL (*HLA-A\*02*, *HLA-B\*08*, *\*14*, *\*40* y *\*44*) o TBP (*HLA-C\*08*, y *HLA-DRB1\*04*), lo cual permite explicar la progresión o no progresión desde un estado de latencia hacia TBP activa. Igualmente, se halló una asociación de otros antígenos HLA con resistencia frente a TBP y / o mantenimiento de progresión desde un estado de latencia hacia enfermedad pulmonar activa. (*HLA-B\*07*, *\*08*, *\*14*, *\*15*, *\*18*, *\*27*, *\*35*, *\*40* y *\*44*, *HLA-DRB1\*07*).
2. Existen diferencias tanto en la frecuencia de genes KIR como en la interacción de sus productos con los ligandos HLA, lo cual pueden apoyar un papel del componente KIR / HLA en la susceptibilidad frente a TBP.
3. Se objetivó una asociación de polimorfismos en el promotor de CCL5 y TBP, siguiendo un modelo de herencia dominante.
4. El alelo *-152G* y el genotipo *GG* del polimorfismo funcional rs2275913 del gen de la IL-17 están presentes con mayor frecuencia en pacientes con TBP, por lo que puede asociarse con susceptibilidad frente a la misma.
5. El polimorfismo *-152G/A* de la IL-17A no influye sobre la producción de IL-17 por lo que podría ser un marcador sustitutivo de otro u otros SNPs cercanos para indicar riesgo de enfermedad.
6. La frecuencia del genotipo *GG* del TLR1 en el grupo control fue mucho menor de la observada en otras poblaciones caucásicas (17,71%).
7. El polimorfismo funcional *T1805G* y el genotipo *GG* del gen de TLR1 influyen en la susceptibilidad frente a TBP, en un modelo de herencia recesivo.
8. No se encontraron diferencias en las frecuencias de los diferentes polimorfismos del promotor del gen de la MBL. El alelo *D* de las variantes estructurales fue más frecuente en controles sanos, lo cual implicaría que bajos niveles de MBL conferirían cierto grado de protección frente a TBP.
9. Existen diferencias en la distribución haplotípica al combinar los polimorfismos del complejo Dectina-1 / CARD9, las cuales pueden contribuir a una mayor susceptibilidad frente a TBP.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**



## Bibliografía

1. Global tuberculosis report 2014. World Health Organization. Geneva, Switzerland: [www.who.int/tb](http://www.who.int/tb). WHO, 2014.
2. Tiemersma EW, van der Werf MJ, Borgdorff MW, Williams BG, Nagelkerke NJ. Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary in HIVnegative patients: A systematic review. *PLoS ONE*, 2011, 6(4): e17601.
3. Bellamy R. Genome-wide approaches to identifying genetic factors in host susceptibility to tuberculosis. *Microbes Infect* 2006;8:1119-1123.
4. Corbett EL, Watt CJ, Walker N et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 2003;163:1009-1021.
5. Wilcox PA. Drug-resistant tuberculosis: worldwide trends, problems specific to Eastern Europe and other hotspots, and the threat to developing countries *Curr Opin Pulm Med*. 2001;7:148-153.
6. Grange JM, Gandy M, Farmer P, Zumla A. Historical declines in tuberculosis: nature, nurture and the biosocial model. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:208-212.
7. Dye C, Williams BG. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science* 2010;328:856-861.
8. García-Pachón E, Rodríguez JC. Epidemiología molecular de la tuberculosis: principales hallazgos y su aplicación en España. *Arch Bronconeumol*. 2005;41:618-624
9. Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ et al. The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiological study in 1993. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998;2:281-287.
10. Van Soolingen D, Borgdorff MW, De Haas PE et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in The Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis*. 1999;18:726-736.
11. Van Wolleswinkel BJ, Nagelkerke NJ, Broekmans JF, Borgdorff MW. The impact of immigration on the elimination of tuberculosis in The Netherlands: a model based approach. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002;6:130-136.
12. Borgdorff MW, van der Werf MJ, de Haas PEW, Kremer K, van Soolingen D. Tuberculosis Elimination in The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2005;11:597-602.
13. Koch R.1884. Die Aetiologie der Tuberkulose. *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*; 2: 1-88.

## Bibliografía

14. Lehmann KB, Neumann R. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik. Munich: J. F. Lehmann, 1896.
15. Möller M, de Wit E, Hoal EG. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;58:3-26.
16. Bates JH, Stead WW. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin North Am* 1993;77:1205-1217.
17. Möller M, Hoal EG. Current findings, challenges and novel approaches in human genetic susceptibility to tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2010;90:81-93.
18. Orcau À, Caylà JA, Martínez JA. Present epidemiology of tuberculosis. Prevention and control programs. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29 Suppl 1:2-7.
19. Santín Cerezales M, Navas Elorza E. Tuberculosis in special populations. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29 Suppl 1 :20-25.
20. El Baghdadi J, Grant AV, Sabri A, et al. Human genetics of tuberculosis. *Pathol Biol. (Paris)* 2013;61:11-16.
21. Fox GL, Menzies D. Epidemiology of tuberculosis immunology. *Adv Exp Med Biol* 2013;783:1-32.
22. Stein CM, Zalwango S, Malone LL et al. Genome scan of *M. tuberculosis* infection and disease in Ugandans. *PLoS One* 2008;3:e4094.
23. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annr Rev Biochem* 1995;64:29-63.
24. Gorocica P, Jiménez-Martínez MC, Garfias Y, Sada I, Lascurain R. Componentes glicosilados en la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2005;18:142-153.
25. Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2012;7:353–384.
26. Søbørg C, Madsen HO, Andersen AB, Lillebaek T, Kok-Jensen A, Garred P. Mannose-Binding Lectin Polymorphisms in Clinical Tuberculosis. *J. Infect Dis* 2007;188:777-782.
27. Gideon H.P. Flynn JL. Latent tuberculosis: what the host “sees”? *Immunol Res* 2011; 50:202–212.
28. Co D.O., L.H. Hogan, S.I. Kim, M. Sandor. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol* 2004;113:130–136.

## Bibliografía

29. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995;2:561–572.
30. Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog* 2008;4: e1000204.
31. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med* 1993;178:2249–2254.
32. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption – a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101:697–714.
33. Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol* 2007;4:347–362.
34. Lin PL, Flynn JL. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *J Immunol* 2010;185:15–22.
35. Harding JS, Schreiber HA, Sandor M. Granuloma transplantation: an approach to study *Mycobacterium*-host interactions. *Front. Microbiol* 2011;2: 245.
36. Guidry TV, Hunter RL Jr, Actor JK. Mycobacterial glycolipid trehalose 6,6'-dimycolate-induced hypersensitive granulomas: contribution of CD4+ lymphocytes. *Microbiology* 2007;153:3360–3369.
37. Divangahi M, Chen M, Gan H et al. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat Immunol* 2009;10:899–906.
38. Niki M, Matsumoto S. Host and bacterial factors that regulate *Mycobacterium tuberculosis* infection and persistence. In: Takii T., Maeyama J. and Yamamoto S (eds). *BCG Vaccine and adjuvant*. Jata Press, Tokyo, Japan 2011:pp. 215–238.
39. Dorhoi A, Kaufmann SH. Perspectives on host adaptation in response to *Mycobacterium tuberculosis*: modulation of inflammation. *Semin Immunol* 2014;26:533-542.
40. Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Saunders BM et al. Immunological basis for reactivation of tuberculosis in mice. *Infect Immun* 2001;69:3264–3270.
41. Baena A, Porcelli SA. Evasion and subversion of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tissue Antigens* 2009;74:189–204.

## Bibliografia

42. Chang ST, LindermanJJ, Kirschner DE. Multiple mechanisms allow *Mycobacterium tuberculosis* to continuously inhibit MHC class II-mediated antigen presentation by macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:4530–4535.
43. Ahmad S. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Respir Res* 2010;11:169–185.
44. Saunders BM, Cooper AM. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* 2000;78:334–341.
45. Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol* 2007;4:347–362.
46. Vynnycky E, Fine PE. Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. *Am J Epidemiol* 2000;152:247–263.
47. Lillebaek T, Dirksen A, Baess I, Strunge B, Thomsen VØ, Andersen AB. Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. *J Infect Dis* 2002;185:401–404.
48. Corbett EL, Bandason T, Cheung YB et al. Epidemiology of tuberculosis in a high HIV prevalence population provided with enhanced diagnosis of symptomatic disease. *PLoS Med* 2007 4: e22.
49. Dubos RJ, “The white plague: tuberculosis, man and society,” in *The White Plague: Tuberculosis, Man and Society*, Little, Brown, Boston, Mass, USA, 1952.
50. Akira S, Takeda K, Kaisho T. “Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity”. *Nature Immunology* 2001;2: 675–680.
51. Schurz H, Daya M, Möller M, Hoal EG, Salie M. TLR1, 2, 4, 6 and 9 Variants Associated with Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2015;10(10): e0139711. doi:10.1371/journal.pone.0139711.
52. Uciechowski P, Imhoff H, Lange C et al. Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. *J Leukoc Biol* 2011;90:377–388.doi: 10.1189/jlb.0409233.
53. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:358–364.doi: 10.1165/rcmb.2003-0388OC.
54. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16: 3–9.
55. Jones BW, Means TK, Heldwein KA et al. DifferentToll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leuk Biol* 2001;69:1036–1044.

## Bibliografia

56. Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 2001;291:1544–1547.
57. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14459–14463.
58. Pompei L, Jang S, Zamlynny B et al. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. *J Immunol* 2007;178:5192–5199.
59. Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJF et al. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Pathol* 2004;164:49–57.
60. Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJF et al. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 2002;169:3155–3162.
61. Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev* 2009;230:9-21.
62. Madsen HO, Garred P, Thiel S et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995;155:3013–3020.
63. Boldt AB, Petzl-Erler ML. A new strategy for mannose-binding lectin gene haplotyping. *Hum Mutat* 2002;19:296-306.
64. Ip WK, Takahashi K, Moore KJ, Stuart LM, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. *J Exp Med* 2008;205:169–181.
65. Garred P, Brygge K, Sorensen CH, Madsen HO, Thiel S, Svejgaard A. Mannan-binding protein—levels in plasma and upper-airways secretions and frequency of genotypes in children with recurrence of otitis media. *Clin Exp Immunol* 1993;94:99–104.
66. Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2003;37:1496–1505.
67. Shi L, Takahashi K, Dundee J et al. Mannose-binding lectin-deficient mice are susceptible to infection with *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* 2004;199: 1379–1390.
68. Walsh MC, Bourcier T, Takahashi K et al. Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Immunol* 2005;175:541–546.

## Bibliografía

69. Denholm JT, McBryde ES, Eisen DP. Mannose-binding lectin and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis. *Clin Exp Immunol* 2010 Oct;162:84-90.
70. Taylor PR, Brown GD, Reid DM et al. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 2002;169:3876–3882.
71. Willment JA, Lin HH, Reid DM et al. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. *J Immunol* 2003;171:4569–4573.
72. Dinadayala P, Lemassu A, Granovski P, Cérantola S, Winter N, Daffé M, Revisiting the structure of the anti-neoplastic glucans of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin: structural analysis of the extracellular and boiling water extract-derived glucans of the vaccine substrains, *J Biol Chem* 2004; 279:12369–12378.
73. Lee HM, Shin DM, Choi DK et al. Innate immune responses to *Mycobacterium ulcerans* via toll-like receptors and dectin-1 in human keratinocytes. *Cell Microbiol* 2009;11:678–692.
74. Shin DM, Yang CS, Yuk JM et al. *Mycobacterium abscessus* activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. *Cell Microbiol* 2008;10:1608–1621.
75. Yadav M, Schorey JS. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* 2006;108:3168–3175.
76. Van De Veerdonk FL, Teirlinck AC, J. Kleinnijenhuis J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* induces IL-17A responses through TLR4 and dectin-1 and is critically dependent on endogenous IL-1. *J Leuk Biol* 2010;88: 227–232.
77. Marakalala MJ, Kerrigan AM, Brown GD. Dectin-1: a role in antifungal defense and consequences of genetic polymorphisms in humans. *Mamm Genome* (2011) 22:55–65.
78. Sainz J, Lupiáñez CB, Segura-Catena J, et al. Dectin-1 and DC-SIGN Polymorphisms Associated with Invasive Pulmonary Aspergillosis Infection. *PLoS ONE* 2012;7(2): e32273. doi:10.1371/journal.pone.0032273.
79. Rosentul DC, Delsing CE, Jaeger M, et al. Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. *Front. Microbiol* 2014 Sep 23;5:483. doi: 10.3389/fmicb.2014.00483.

## Bibliografía

80. Gross O, Gewies A, Finger K, et al. Card9 controls a non-TLR signaling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 2006;442:651–656.
81. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:33–43.
82. Bodmer WF. HLA Polymorphism: Origin and Maintenance. In: *Histocompatibility Testing* (Ed. Bidwell JL, Navarrete C), pp 1-10. Imperial College Press 2000.
83. Travers P. Immune recognition and the MHC. In: *Histocompatibility Testing* (Ed. Bidwell JL, Navarrete C), pp 11-48. Imperial College Press 2000.
84. Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. *N Eng J Med* 2000;343:702-709.
85. Marsh SGE, Parham P, Barber LD. In: *The HLA FactsBook*, pp 73-79. Academic Press.
86. Li CP, Zhou Y, Xiang X, Zhou Y, He M. Relationship of HLA-DRB1 gene polymorphism with susceptibility to pulmonary tuberculosis: updated meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015;19:841-849.
87. Tong X, Chen L, Liu S, et al. Polymorphisms in HLA-DRB1 gene and the risk of tuberculosis: a meta-analysis of 31 studies. *Lung*. 2015;193:309-318.
88. Carrington M, Norman P. The KIR Gene Cluster. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2003 May 28.
89. Hsu KC, Chida S, Dupont B, Geraghty DE. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002;190:40-52.
90. Olcese L, Cambiaggi A, Semenzato G, Bottino C, Moretta A, Vivier E. Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. *J Immunol* 1997;158:5083-5086.
91. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998;391:703-707.
92. Méndez A, Granda H, Meenagh A, et al. Study of KIR genes in tuberculosis patients. *Tissue Antigens* 2006;68:386-389.
93. Mahfouz R, Halas H, Hoteit R, et al. Study of KIR genes in Lebanese patients with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;1:1688-1691.
94. Tajik N, Shah-hosseini A, Mohammadi A, et al. Susceptibility to pulmonary tuberculosis in Iranian individuals is not affected by compound KIR/HLA genotype. *Tissue Antigens* 2012;79:90-96.

## Bibliografía

95. Shahsavari F, Mousavi T, Azargan A, Entezami K. Association of KIR3DS1+HLA-B Bw4Ile80 combination with susceptibility to tuberculosis in Lur population of Iran. *Iran J Immunol* 2012;9:39-47.
96. Lu C, Shen YJ, Deng YF, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with pulmonary tuberculosis in Chinese Han. *Genet Mol Res.* 2012;15:1370-1378.
97. Lu C, Bai XL, Shen YJ, et al. Potential implication of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and HLA in onset of pulmonary tuberculosis. *Scand J Immunol* 2012 ;76:491-496.
98. Pydi SS, Sunder SR, Venkatasubramanian S, Kovvali S, Jonnalagada S, Valluri VL. Killer cell immunoglobulin like receptor gene association with tuberculosis. *Hum Immunol* 2013;7:85-92.
99. Braun K, Larcombe L, Orr P, Nickerson P, Wolfe J, Sharma M. Killer immunoglobulin-like receptor (KIR) centromeric-AA haplotype is associated with ethnicity and tuberculosis disease in a Canadian First Nations cohort. *PLoS One* 2013;8:e67842. doi: 10.1371/journal.pone.0067842.
100. Lu C, Bai XL, Deng YF, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes and haplotypes with susceptibility to pulmonary tuberculosis infection. *Clin Lab* 2014;60:821-825.
101. Habegger de Sorrentino A, Pardo R, Marinic K, Duarte SC, Lotero C. [KIR-HLA class I and pulmonary tuberculosis in the Amerindian population in Chaco, Argentina]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014;32:565-569.
102. Braun K, Wolfe J, Kiazzyk S, Kaushal Sharma M. Evaluation of host genetics on outcome of tuberculosis infection due to differences in killer immunoglobulin-like receptor gene frequencies and haplotypes. *BMC Genet* 2015;16:63. doi: 10.1186/s12863-015-0224-x.
103. Donlon TA, Krensky AM, Wallace MR, Collins FS, Lovett M, Clayberger C (March 1990). Localization of a human T-cell-specific gene, RANTES (D17S136E), to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics* 1990; 6:548–553.
104. Luster A D. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436–445.
105. Maghazachi AA, Al-Aoukaty A, Schall TJ. "CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells". *Eur J Immunol* 1996;26:315–319.

## Bibliografía

106. Wong M M, Fish E N. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* 2003;15: 5–14.
107. Chensue SW, Warmington KS, Allenspach EJ et al. Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *J Immunol* 1999;163: 165–173.
108. Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V et al. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol* 2004;204: 217–228.
109. Co DO, Hogan LH, Kim SI, Sandor M. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol* 2004;113: 130–136.
110. Saukkonen JJ, Bazydlo B, Thomas M, Strieter RM, Keane J, Kornfeld H. Beta-chemokines are induced by *Mycobacterium tuberculosis* and inhibit its growth. *Infect Immun* 2002;70:1684–1693.
111. Zhernakova A, Alizadeh B Z, Eerligh P H, et al. Genetic variants of CCL5 are associated with serum CCL5 level and protection for type 1 diabetes. *Genes Immun* 2006;7: 544–549.
112. Chu S F, Tam C M, Wong H S, Kam K M, Lau Y L, Chiang A K S. Association between CCL5 functional polymorphisms and tuberculosis in Hong Kong Chinese. *Genes Immun* 2007;8: 475–479.
113. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 2007;8:369–377.
114. Yoshida YO, Umemura M, Yahagi A, et al. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection induced granuloma in the lung. *J Immunol* 2010;184:4414–4422.
115. Sergejeva S, Ivanov S, Lotvall J, Lindén A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *Am J Resp Cell & Mol Biol* 2005;33:248-253.
116. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004;21:467-476.
117. Miyamoto M, Prause O, Sjostrand M, Laan M, Lotvall J, Lindén A. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol* 2003;170:4665-4672.

## Bibliografía

118. Khader Sa, Gopal R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. *Virulence* 2010;1:423-427.
119. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol* 2007;178:3786–3796.
120. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gamma-delta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2006;177:4662–4669.
121. Cruz A, Shabaana A, Khade SA, et al. Cutting Edge: IFN- $\gamma$  Regulates the Induction and Expansion of IL-17-Producing CD4 T Cells during Mycobacterial Infection. *J Immunol* 2006;177:1416–1420.
122. Jones C E, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene- $\alpha$ , and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2002;26:748–753.
123. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, et al. Requirement of interleukin-17 receptor signalling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001;194:519–527.
124. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996;183:2593–2603.
125. Yim JJ, Selvaraj P. Genetic susceptibility in tuberculosis. *Respirology* 2010;15:241-256.
126. Abel L, Casanova JL. Human genetics of tuberculosis. *Bull Acad Natl Med* 2010;194:943-950.
127. Maertzdorf J, Repsilber D, Parida SK, et al. Human gene expression profiles of susceptibility and resistance in tuberculosis. *Genes Immun* 2011;12:15-22.
128. Qidwai T, Jamal F, Khan MY. DNA sequence variation and regulation of genes involved in pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Scand J Immunol* 2012 ;75 :568-587.
129. Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun* 2012;80:3343-3359.
130. Di Pietrantonio T, Schurr E. Host-pathogen specificity in tuberculosis. *Adv Exp Med Biol* 2013;783:33-44.

## Bibliografía

131. Khalilullah SA, Harapan H, Hasan NA, Winardi W, Ichsan I, Mulyadi M. Host genome polymorphisms and tuberculosis infection: What we have to say? *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*.2014;63:173-185.
132. Thye T, Vannberg FO, Wong SH, et al. Genome-wide association analyses identifies a susceptibility locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nat Genet* 2010;42:739-741.
133. Png E, Alisjahbana B, Sahiratmadja E, et al. A genome wide association study of pulmonary tuberculosis susceptibility in Indonesians. *BMC Med Genet* 2012 Jan 13;13:5. doi: 10.1186/1471-2350-13-5.
134. Thye T, Owusu-Dabo E, Vannberg FO, et al. Common variants at 11p13 are associated with susceptibility to tuberculosis. *Nat Genet* 2012;44:257-259.
135. Mahasirimongkol S, Yanai H, Mushiroda T, et al. Genome-wide association studies of tuberculosis in Asians identify distinct at-risk locus for young tuberculosis. *J Hum Genet* 2012 ;57:363-367.
136. Wang X, Tang NL, Leung CC, et al. Association of polymorphisms in the Chr18q11.2 locus with tuberculosis in Chinese population. *Hum Genet* 2013;132:691-695.
137. Chimusa ER, Zaitlen N, Daya M, et al. Genome-wide association study of ancestry-specific TB risk in the South African Coloured population. *Hum Mol Genet*. 2014;23:796-809.
138. Lee SW, Lin CY, Chuang TY, Huang HH, Kao YH, Wu LS. SNP rs4331426 in 18q11.2 is associated with susceptibility to tuberculosis among female Han Taiwanese. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014 Nov 22. pii: S1684-1182(14)00237-0. doi: 10.1016/j.jmii.2014.11.007.
139. Curtis J, Luo Y, Zenner HL et. Susceptibility to tuberculosis is associated with variants in the ASAP1 gene encoding a regulator of dendritic cell migration. *Nat Genet*. 2015;47:523-527.
140. Kumar D, Nath L, Azhar Kamal Md, et al. Genome-Wide Analysis of the host intracellular network that regulates survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 2010;140:731-743.
141. Qu HQ, Li Q, McCormick JB, Fisher-Hoch SP. What did we learn from the genome-wide association study for tuberculosis susceptibility? *J Med Genet* 2011;48:217-218.

## Bibliografía

142. Ji LD, Chai PF, Zhou BB, et al. Lack of association between polymorphisms from genome-wide association studies and tuberculosis in the Chinese population. *Scand J Infect Dis* 2013;45:310-314.
143. Meyer CG, Thye T. Host genetic studies in adult pulmonary tuberculosis. *Semin Immunol.* 2014;26:445-53.
144. Sánchez-Castañón M, Baquero IC, Sánchez-Velasco P, Fariñas MC, Ausín F, Leyva-Cobián F, Ocejo-Vinyals JG. Polymorphisms in CCL5 promoter are associated with pulmonary tuberculosis in northern Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:480-485.
145. Ocejo-Vinyals JG, Lavín-Alconero L, Sánchez-Velasco P, Guerrero-Alonso MÁ, Ausín F, Fariñas MC, Leyva-Cobián F. Mannose-binding lectin promoter polymorphisms and gene variants in pulmonary tuberculosis patients from cantabria (northern Spain). *Pulm Med* 2012;469128. doi: 10.1155/2012/469128.
146. Ocejo-Vinyals JG, Puente de Mateo E, Ausín F, Agüero R, Arroyo JL, Gutiérrez-Cuadra M, Fariñas MC. Human toll-like receptor 1 T1805G polymorphism and susceptibility to pulmonary tuberculosis in northern Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013;17:652-654.
147. Ocejo-Vinyals JG, de Mateo EP, Hoz MÁ, Arroyo JL, Agüero R, Ausín F, Fariñas MC. The IL-17 G-152A single nucleotide polymorphism is associated with pulmonary tuberculosis in northern Spain. *Cytokine* 2013;64:58-61.
148. Gonzalo Ocejo-Vinyals J, Ausín F, de Mateo EP et al. Association of Human Leukocyte Antigens Class I and II Variants with Susceptibility to Pulmonary Tuberculosis in a Caucasian Population from Northern Spain. *J Mycobac Dis* 2013 3: 132. doi:10.4172/2161-1068.1000132.
149. Ocejo-Vinyals JG, Escobio A, Irure-Ventura J et al. No Evidence for Association Between the Functional rs1862513 Polymorphism in the Promoter Region of the Resistin Gene (RETN) and Pulmonary Tuberculosis in Northern Spain. *Mycobact Dis* 2015;5: 178. doi:10.4172/2161-1068.1000178.
150. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. Sole X, Guino E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. *Bioinformatics* 2006;22:1928-1929.
151. Salie M, Daya M, Möller M, Hoal EG. Activating KIRs alter susceptibility to pulmonary tuberculosis in a South African population. *Tuberculosis (Edinb).* 2015 ;95:817-821.

## Bibliografía

152. Salie M, van der Merwe L, Möller M, et al. Associations Between Human Leukocyte Antigen Class I Variants and the Mycobacterium tuberculosis Subtypes Causing Disease. *J Infect Dis* 2014;209:216-223.
153. Nyholt DR. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* 2004;74:765–769.
154. Perneger TV. What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ* 1998;316:1236–1238.
155. Campbell H, Rudan I. Interpretation of genetic association studies in complex disease. *Pharmacogenomics J* 2002;2:349–360.
156. Moreto A, Fariñas-Álvarez C, Puente M et al. Mannose-binding lectin gene variants and infections in patients receiving autologous stem cell transplantation. *BMC Immunol* 2014 May 3;15:17. doi: 10.1186/1471-2172-15-17.
157. Selvaraj P. Host genetics and tuberculosis susceptibility. *Curr Science* 2004;86:115-121.
158. Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T et al. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 2004;23:219-223.
159. Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH et al. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med* 2005; 202:1649-1658.
160. Oh JH, Yang CS, Noh YK et al. Polymorphisms of interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. *Respirology* 2007;12:594- 598.
161. Hwang JH, Kim EJ, Kim SY et al. Polymorphisms of interferon-gamma and interferon-gamma receptor 1 genes and pulmonary tuberculosis in Koreans. *Respirology* 2007;12:906-910.
162. Kettaneh A, Seng L, Tiev KP et al. Human leukocyte antigens and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis of case-control studies. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:717-725.
163. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001;249:1-26.
164. Hill AVS, Motulsky, AG. Natural selection for disease susceptibility and resistance genes: examples and prospects. In: Stearns SC, editor. *Evolution in Health and Disease*. Oxford: University Press, 1998.

## Bibliografía

165. Hill AV. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001;2:373-400.
166. Lipsitch M, Sousa AO. Historical intensity of natural selection for resistance to tuberculosis. *Genetics* 2002;161:1599-1607.
167. Mehra NK, Bovornkitti S. HLA and Tuberculosis-A Reappraisal. *Am Pacif J of Allergy ad Immunol* 1986;4:149-156.
168. Hafez M, El-Salb S, El-Shennawy F, Bassiony MR. HLA antigens and tuberculosis in Egyptian population. *Tubercle* 1985;66:35-40
169. Ruggiero G, Cosentini E, Zanzi D, et al. Allelic distribution of human leucocyte antigen in historical and recently diagnosed tuberculosis patients in Southern Italy. *Immunology* 2004;111:318-322.
170. Souza CF, Noguti EN, Visentainer JE, Cardoso RF, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT. HLA and MICA genes in patients with tuberculosis in Brazil. *Tissue Antigens*. 2012;79:58-63.
171. Balamurugan A, Sharma SK, Mehra NK. Human leukocyte antigen class I supertypes influence susceptibility and severity of tuberculosis. *J Infect Dis* 2004;189:805-811.
172. Nikolaian LT, Karapetian ET, Pospelov LE. Class I and II antigens and levels of IgG antibodies in patients with infiltrative tuberculosis of the lungs. *Probl Tuberk* 1989;3:49-51.
173. Naumov VN, Shaikhaev AIa, Pospelov LE, Testov VV. Immunogenetic factors in pulmonary tuberculosis surgery. *Probl Tuberk* 1993;4:17-19.
174. Selby R, Barnard JM, Beuhler SK, Crumley J, Larsen B, Marshall WH. Tuberculosis associated with HLA-B, Bfs in a Newfoundland community study. *Tissue Antigens* 1978;11:403-408.
175. Al-Arif LL, Goldstein RA, Affronti LF, Janicki BW. HLA-Bw15 and tuberculosis in a North American black population. *Am Rev Resp Dis* 1979;120:1275-1278.
176. Jian ZF, An JB, Sun JP, Mittal KK, Lee TD. Association of HLA-Bw35 with tuberculosis in the Chinese. *Tissue Antigens* 1983;22:86-90.
177. Mehra NK, Shingal KK, Malaviya AN, Guleria JS, Vaidya MC. Susceptibility to tuberculosis may be HLA-linked. In: *Proceedings of a symposium on cellular and humoral mechanisms in immune response*. Bombay, India: Bhabha Atomic Research Centre 1982:60-72.

## Bibliografía

178. Papiha SS, Wentzel J, Behjati F, Agarwal SS: Human leucocyte antigens and circulating immunoglobulin levels in Indian patients with pulmonary tuberculosis. *Tubercle* 1985;66:25-33.
179. Khomenko AG, Pospelov LE, Malenko AF, Chukanova VP, Romanov VV. HLA antigens in lung diseases. *Ter Arkh.* 1985;573:77-80.
180. Khomenko AG, Litvinov VI, Chukanova VP, Pospelov LE. Tuberculosis in patients with various HLA phenotypes. *Tubercle* 1990;71:187-92.
181. Pospelov LE, Matrakshin AG, Tsoi KN, Erdynieva LS, Kuderek BK. A genetic pool study of the population of the Republic of Tyva using genetic markers for the search for associations with tuberculosis. *Probl Tuberk* 1996;4:38-41.
182. Matrashkin AG, Mes'ko EM, Pospelov LE, Ereemeev VV, Khaĩby SB, Chistiakova NI. Examining the distribution of HLA antigens in patients with tuberculosis and in healthy individuals in the Erza District, Republic of Tyva. *Probl Tuberk.* 2002;12:15-16.
183. Pospelov LE, Matrakshin AG, Ereemeev VV, Mes'ko EM, Khaĩby SB. Examining the distribution of HLA antigens in patients with tuberculosis and healthy individuals in some regions of the Republic of Tyva. *Probl Tuberk.* 2003;1:54-55.
184. Matrashkin AG, Mes'ko EM, Pospelov LE, Ereemeev VV, Khaĩby SB, Chistiakova NI. Examining the distribution of HLA antigens in patients with tuberculosis and in healthy individuals in the Erza District, Republic of Tyva. *Probl Tuberk.* 2002;12:15-16.
185. Gergert VIa, Valiev RSh, Chukanova VP, Pospelov LE, Malenko AF, Valiev NR. Distribution of HLA antigens in patients with tuberculosis and healthy individuals in the Tatar population. *Probl Tuberk Bolezn Legk* 2004;8:45-46.
186. Kyzyl-Oll MM, Pospelov AL, Kordicheva SIu, Soroko-Novitskaia AN, Pospelov LE, Mishin VIu. The specific features of the course of pulmonary tuberculosis in young Tuvinians in relation to some antigens of the HLA complex. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* 2009;12:53-57.
187. Chukanova VP, Valiev RSh, Gergert VIa et al. Population-based epidemiological study of pulmonary tuberculosis in a number of rural regions of Tatarstan. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* 2008;10:35-99.
188. Yuliwulandari R, Sachrowardi Q, Nakajima H et al. Association of HLA-A, -B, and -DRB1 with pulmonary tuberculosis in western Javanese Indonesia. *Hum Immunol* 2010;71:697–701.

## Bibliografia

189. Cox RA, Arnold DR, Cook D, Lundberg DI. HLA phenotypes in Mexican Americans with tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* 1982;126:653-655.
190. Khomenko AG, Averbach MM, Kalankhodghaev AA, Malenko AF, Chukanova VP, Moroz AM. Distribution of HLA antigens in tuberculosis: *Tek Arkh* 1980;53:135.
191. Singh SPN, Mehra NK, Dingley HB, Pande JN, Vaidyia MC. HLA-A, -B, -C and DR antigen profile in pulmonary tuberculosis in North India. *Tissue Antigens* 1983;21:380-384.
192. Cox RA, Arnold DR, Cook D, Lundberg DI. HLA phenotypes in Mexican Americans with tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:653-655.
193. Dovgaliuk IF, Semilutskaia IB, Tselikova VA, Danilevskaia IM. Clinical significance of HLA phenotype in childhood tuberculosis. *Probl Tuberk* 1990;9:9-10.
194. Nazirov PKh, Pospelov LE, Vakhidova GA. HLA antigens in patients with osteoarticular tuberculosis with different disease course. *Probl Tuberk* 1991;10:36-37.
195. Nazirov PKh, Pospelov LE. HLA antigens in patients with osteoarticular tuberculosis and chronic hematogenic osteomyelitis. *Ortop Travmatol Protez* 1991 Oct;10:26-29.
196. Khomenko AG1, Litvinov VI, Chukanova VP, Pospelov LE. Tuberculosis in patients with various HLA phenotypes. *Tubercle* 1990;713:187-192.
197. Selvaraj P, Uma H, Reetha AM et al. HLA antigen profile in pulmonary tuberculosis patients & their spouses. *Indian J Med Re.* 1998;107:155-158.
198. Vasilca V, Oana R, Munteanu D, Zugun F, Constantinescu D, Carasevici E. HLA-A and -B phenotypes associated with tuberculosis in population from north-eastern Romania. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2004;63:209-221.
199. Knoring BE, Berkos AS, Sakharova Iia. Distribution of histocompatibility antigens in patients with pulmonary tuberculosis depending on disease course and immune response pattern. *Probl Tuberk* 1995;2:16-19.
200. Hammond AS, Klein MR, Corrah T et al. Mycobacterium tuberculosis genome-wide screen exposes multiple CD8 T cell epitopes. *Clin Exp Immunol* 2005;140:109-116.
201. Axelsson-Robertson R, Weichold F, Sizemore D et al. Extensive major histocompatibility complex class I binding promiscuity for Mycobacterium tuberculosis TB10.4 peptides and immune dominance of human leucocyte antigen (HLA)-B\*0702 and HLA-B\*0801 alleles in TB10.4 CD8 T-cell responses. *Immunology* 2010;129:496-505.

## Bibliografia

202. Tang ST, van Meijgaarden KE, Caccamo N et al. Genome-based in silico identification of new Mycobacterium tuberculosis antigens activating polyfunctional CD8<sup>+</sup> T cells in human tuberculosis. *J Immunol* 2011;186:1068-1080.
203. Akgunes A, Coban AY, Durupinar B. Human leucocyte antigens and cytokine gene polymorphisms and tuberculosis. *Ind J Med Microb* 2011;29:28-32.
204. Zhang NR, Fan G, Deng YF et al. A preliminary study on the relationship between HLA-Cw polymorphism and susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2012;352:120-124.
205. Takiff HE. Host Genetics and susceptibility. In: *Tuberculosis. From Basic Science to Patient Care*, Edited by J.C. Palomino, S. Cardoso Leao & V. Ritacco. p 207-262, 2007.
206. Shi GL, Hu XL, Yang L et al. Association of HLA-DRB alleles and pulmonary tuberculosis in North Chinese patients. *Genet Mol Res* 2011;10:1331-1336.
207. Gaseitsiwe S, Valentini D, Mahdaviifar S, Reilly M, Ehrnst A, Maeurer M. Peptide microarray-based identification of Mycobacterium tuberculosis epitope binding to HLA-DRB1\*0101, DRB1\*1501, and DRB1\*0401. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:168-175.
208. Wu F, Zhang W, Zhang L, Wu J, Li C, et al. NRAMP1, VDR, HLA-DRB1, and HLA-DQB1 gene polymorphisms in susceptibility to tuberculosis among the Chinese Kazakh population: a case-control study. *Biomed Res Int* 2013: 484535. doi: 10.1155/2013/484535. Epub 2013 Sep 1.
209. Harfouch-Hammoud EI, Daher NA. Susceptibility to and severity of tuberculosis is genetically controlled by human leukocyte antigens. *Saudi Med J* 2008;29:1625-1629.
210. Dubaniewicz A, Moszkowska G, Szczerkowska Z. Frequency of DRB1- DQB1 two-locus haplotypes in tuberculosis: preliminary report. *Tuberculosis (Edinb)* 2005;85:259-267.
211. Lucena-Silva N, Baliza MD, Martins AE et al. Relatedness and HLA-DRB1 typing may discriminate the magnitude of the genetic susceptibility to tuberculosis using a household contact model. *J Epidemiol Community Health* 2010;64:513-517.
212. Duarte R, Carvalho C, Pereira C et al. HLA class II alleles as markers of tuberculosis susceptibility and resistance. *Rev Port Pneumol.* 2011;17:15-19.
213. Naher HS, Mohammed A.K. Al-Saadi MAK, Shalan AA. The association between HLA-DRB alleles with pulmonary tuberculosis in Babylon province, Iraq. *Peak J Med Med Sci* 2013;1:14-18.

## Bibliografía

214. Nidhal AM, Haitham Q, Farouk H. Association between HLA-Class I and HLA-ClassII Alleles and *Mycobacterium Tuberculosis* Infection in Iraqi Patients from Baghdad City. *Iran J Med Sci Suppl.* 2014;39:191-195.
215. Amirzargar AA, Yalda A, Hajabolbaghi M et al. The association of HLA-DRB, DQA1, DQB1 alleles and haplotype frequency in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:1017- 1021.
216. Alisherov AS, Kitaev MI, Tarasenko OM, Tiurebaeva BN HLA genes in patients with pulmonary tuberculosis in the Kirghiz population. *Probl Tuberk* 1997;5:41-42.
217. Selvaraj P, Nisha Rajeswari D, Jawahar MS, Narayanan PR. Influence of HLA-DRB1 alleles on Th1 and Th2 cytokine response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2007;87:544- 550.
218. Isaacs D. Infectious risks associated with biologics. *Adv Exp Med Biol* 2013;764:151-158.
219. Salie M, Daya M, Möller M, Hoal EG. Activating KIRs alter susceptibility to pulmonary tuberculosis in a South African population. *Tuberculosis (Edinb).* 2015;9:817-821.
220. Nickel R G, Casolaro V, Wahn U, et al. Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C–C chemokine CCL5. *J Immunol* 2000;164:1612–1616.
221. Liu H, Chao D, Nakayama E E, et al. Polymorphism in CCL5 chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4581–4585.
222. An P, Nelson G W, Wang L, et al. Modulating influence on HIV/ AIDS by interacting CCL5 gene variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10002–10007.
223. Jamieson SE, Miller EN, Black GF et al. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes Immun.* 2004;5:46-57.
224. Hizawa N, Makita H, Nasuhara Y et al. Functional single nucleotide polymorphisms of the CCL5 gene and nonemphysematous phenotype in COPD patients. *Eur Respir J* 2008;32:372–378.
225. Esteban E, Dugoujon J M, Guitard E, et al. Genetic diversity in northern Spain (Basque country and Cantabria): GM and KM variation related to demographic histories. *Eur J Hum Genet* 1998;6:315–324.

## Bibliografía

226. Sánchez-Velasco P, Gómez-Casado E, Martínez-Laso J, et al. HLA alleles in isolated populations from North Spain: origin of the Basques and the ancient Iberians. *Tissue Antigens* 2003;61:384–392.
227. Maca-Meyer N, Sánchez-Velasco P, Flores C, et al. Y chromosome and mitochondrial DNA characterization of Pasiegos, a human isolate from Cantabria (Spain). *Ann Hum Genet* 2003;67:329–339.
228. Ma X, Liu Y, Gowen BB, Graviss EA, Clark AG, Musser JM. Full-Exon Resequencing Reveals Toll-Like Receptor Variants Contribute to Human Susceptibility to Tuberculosis Disease. *PLoS ONE* 2007: e1318. doi:10.1371.
229. Ma M-J , Xie L-P, Wu S-C et al. Toll-like receptors, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-10 gene polymorphisms in risk of pulmonary tuberculosis and disease severity. *Hum Immunol* 2010;71:1005-1010.
230. Selvaraj P, Harishankar M, Singh B, Jawahar MS, Banurekka VV. Toll-like receptor and TIRAP gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of South India. *Tuberculosis* 2010;90:306-310.
231. Uciechowski P, Imhoff H, Lange C. Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. *J of Leukoc Biol* 2011;90:1-12.
232. Leoratti FMS, Farias L, Alves FP et al. Variants in the Toll-Like Receptor Signalling Pathway and Clinical Outcomes of Malaria. *J Infect Dis* 2008;198:772-80.
233. Hawn TR, Scholes D, Shuying SL et al. Toll-like Receptor Polymorphisms and Susceptibility to Urinary Tract Infections in Adult Women. *PLoS ONE* 2009;4:e5990. doi:10.1371.
234. Chen J, Deng Y, Zhao J, Luo Z, Peng W, Yang J et al. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis. *J Clin Immunol*. 2010;30:539-545.
235. Li N, Zhu Q, Li Z, Han Q, Zhang G, Chen J et al. IL17A gene polymorphisms, serum IL-17A and IgE levels, and hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Mol Carcinog*. 2012 Dec 31. doi: 10.1002/mc.21992.
236. Zhou B, Zhang P, Wang Y, Shi S, Zhang K, Liao H et al. Interleukin-17 gene polymorphisms are associated with bladder cancer in a Chinese Han Population. *Mol Carcinog* 2012 Jun 12. doi: 10.1002/mc.21928.

## Bibliografía

237. Hayashi R, Tahara T; Shiroeda H, Saito T, Nakamura M, Tsutsumi M et al. Influence of IL17A polymorphisms (rs2275913 and rs3748067) on the susceptibility to ulcerative colitis. *Clin Exp Med* 2012 Sep 7. [Epub ahead of print].
238. Popovic-Kuzmanovic, D., Novakovic I, Stojanovich L, Aksentijevich I, Zogovic N, Tovilovic G et al. Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 cytokine axis in primary antiphospholipid syndrome. *Immunobiology* 2013;218:186-91.
239. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Kawase T, Sao H, Akiyama H et al. A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-matched unrelated BMT. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:1455-63.
240. Sutherland JS, de Jong BC, Jeffries DJ, Adetifa IM, Ota MO. Production of TNF- $\alpha$ , IL-12(p40) and IL-17 Can Discriminate between Active TB Disease and Latent Infection in a West African Cohort. *PLoS One*. 2010, 5(8): e12365.
241. Worthley DL, Bardy PG, Mullighan CG, Mannose binding lectin: biology and clinical implications. *Int Med J* 2005;35: 548–555.
242. Özbas-Gerçeker F, Tezcan I, Berkel AI et al. The effect of mannose-binding protein gene polymorphisms in recurrent respiratory system infections in children and lung tuberculosis. *Turk J Ped* 2003;45:95–98.
243. Mombo LE, Lu CY, Ossari S et al., Mannose-binding lectin alleles in sub-Saharan Africans and relation with susceptibility to infections. *Genes Immun* 2003;4:362–367.
244. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujit Ra, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun* 2006;7:85–94.
245. J. L. Casanova JL, Abel L. Human mannose-binding lectin in immunity: friend, foe, or both? *J Exp Med* 2004;199:1295-1299.
246. Hill AVS. The immunogenetics of human infectious diseases. *AnnRev Immunol* 1998;16:593-617.
247. Garred P, Richter C, Andersen AB et al. Mannan-binding lectin in the sub-saharan HIV and tuberculosis epidemics. *Scand J Immunol* 1997;2:204-208.
248. Hoal-van Helden EG, Epstein J, Victor TC et al. Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. *Ped Res* 1999;45:459-464.
249. Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM. Association of functional mutant homozygotes of the mannose binding protein gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis in India, *Tubercle Lung Dis* 1999;79:221-227.

## Bibliografía

250. El Sahly HM, Reich RA, Dou SJ, Musser JM, Graviss AE. The effect of mannose binding lectin gene polymorphisms on susceptibility to tuberculosis in different ethnic groups. *Scand J Infect Dis* 2004;36:106-108.
251. Liu W, Zhang F, Xin ZT et al. Sequence variations in the MBL gene and their relationship to pulmonary tuberculosis in the Chinese Han population. *Int J Tub Lung Dis* 2006;10:1098-1103.
252. García-Laorden MI, Pena MJ, Caminero JA et al. Influence of mannose-binding lectin on HIV infection and tuberculosis in a Western-European population. *Mol Immun* 2006;43:2143-2150.
253. Søbørg C, Madsen HO, Andersen AB, Lillebaek T, Kok-Jensen A, Garred P. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J Infect Dis* 2003;188:777-782.
254. Kato-Maeda M, Bifani PJ, Kreiswirth BN, Small PM. The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 2001;107:533-537.
255. López B, Aguilar D, Orozco H et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003;133:30-37.
256. Chai LY, Hsu LY. Recent advances in invasive pulmonary aspergillosis. *Curr Opin Pulm Med* 2011;17:160-166.
257. Cunha C, Di Ianni M, Bozza S et al. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood*. 2010;116:5394-402.
258. Rosentul DC, Plantinga TS, Oosting M et al. Genetic variation in the dectin-1/CARD9 recognition pathway and susceptibility to candidemia. *J Infect Dis*. 2011;204:1138-1145
259. Chai LY, de Boer MG, van der Velden WJ et al. The Y238X stop codon polymorphism in the human  $\beta$ -glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *J Infect Dis*. 2011;2035:736-743.
260. Usluogullari B, Gumus I, Gunduz E et al. The role of Human Dectin-1 Y238X Gene Polymorphism in recurrent vulvovaginal candidiasis infections. *Mol Biol Rep*. 2014;41:6763-6768.

## Bibliografía

261. Qu X, Che C, Gao A et al. Association of Dectin-1 and DC-SIGN gene single nucleotide polymorphisms with fungal keratitis in the northern Han Chinese population. *Mol Vis.* 2015;10;21:391-402.
262. Lee YH, Song GG. Pathway analysis of a genome-wide association study of ileal Crohn's disease. *DNA Cell Biol.* 2012;10:1549-1554.





**9. ANEXOS**



## **PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO\***

\*Sólo se menciona las publicaciones en revistas internacionales con factor de impacto

1. Sánchez-Castañón M, Baquero IC, Sánchez-Velasco P, Fariñas MC, Ausín F, Leyva-Cobián F, Ocejo-Vinyals JG. Polymorphisms in CCL5 promoter are associated with pulmonary tuberculosis in northern Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:480-485.
2. Ocejo-Vinyals JG, Puente de Mateo E, Ausín F, Agüero R, Arroyo JL, Gutiérrez-Cuadra M, Fariñas MC. Human toll-like receptor 1 T1805G polymorphism and susceptibility to pulmonary tuberculosis in northern Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013;17:652-654.
3. Ocejo-Vinyals JG, de Mateo EP, Hoz MÁ, Arroyo JL, Agüero R, Ausín F, Fariñas MC. The IL-17 G-152A single nucleotide polymorphism is associated with pulmonary tuberculosis in northern Spain. *Cytokine* 2013;64:58-61.

## **COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES**

1. Dectin-1/CARD9 single nucleotide polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis. J. Irure Ventura, A. R. Guerra, E. Asensio, F. Ausín, J. Arroyo, R. Agüero, M. Fariñas, J. Ocejo-Vinyals. 4<sup>th</sup> European Congress of Immunology. Vienna. September 6-9, 2015.
2. KIR repertoire in a healthy Caucasian population. Comparison with latent infection and pulmonary tuberculosis patients from Northern Spain. E. Asensio-Montañés, Fernando Ausín, José Luis Arroyo, Ramón Agüero, M. Carmen Fariñas, J. Gonzalo Ocejo-Vinyals. 4<sup>th</sup> European Congress of Immunology. Vienna. September 6-9, 2015.
3. Distribution of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors genes in Patients with Pulmonary Tuberculosis from Northern Spain. J.G. Ocejo-Vinals, C. González Rico, F. Ausín, E. Puente de Mateo, J.L. Arroyo, R. Agüero, M.C. Fariñas. 24<sup>th</sup> European Congress Of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelona, Spain. 10-13/05/2014.

4. Asociación de los antígenos HLA de clase I y II con susceptibilidad a la tuberculosis pulmonar en una población caucásica del norte de España. .G. Ocejo-Vinals, F. Ausín, E. Puente de Mateo, C. González Rico, J.L. Arroyo, R. Agüero, M.C. Fariñas. XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia, 9-11 de abril de 2014.
5. Association between a functional TLR1 single nucleotide polymorphism and susceptibility to pulmonary tuberculosis. D. Ferrer, E. Puente, F. Ausín, R. Agüero, J.L. Arroyo, M. Gutiérrez, M.C. Fariñas, J.G. Ocejo-Vinyals. European Respiratory Society. Annual Congress 2013. Principal 7-11 September, 2013.
6. Relationship between a functional IL-17 single nucleotide polymorphism and susceptibility to pulmonary tuberculosis. J.J. Ruiz, E. Puente, M.A. Hoz, R. Agüero, J.L. Arroyo, F. Ausín, M.C. Fariñas, J.G. Ocejo-Vinyals. European Respiratory Society. Annual Congress 2013. Barcelona 7-11 September, 2013.
7. Mannose-binding lectin promoter polymorphisms and gene variants in pulmonary tuberculosis patients from Cantabria (Northern Spain). D. Ferrer, L. Lavín, P. Sánchez, F. Ausín, R. Agüero, F. Leyva, J.G. Ocejo. European Respiratory Society. Annual Congress 2013. Barcelona 7-11 September, 2013.
8. The human Toll-Like Receptor 1 T1805G polymorphism influence susceptibility to pulmonary tuberculosis in Northern Spain. J.G. Ocejo-Vinyals, Elena Puente de Mateo, Fernando Ausín, Ramón Agüero, Jose L. Arroyo, Manuel Gutiérrez-Cuadra, M. Carmen Fariñas 27<sup>th</sup> European Immunogenetics and Histocompatibility Conference. Maastricht, The Netherlands, 11-14 de mayo de 2013.
9. A functional single nucleotide polymorphism in the IL-17 promoter is associated with pulmonary tuberculosis. J.G. Ocejo-Vinyals, Elena Puente de Mateo, Jose L. Arroyo, M. Ángeles Hoz, Ramón Agüero, Fernando Ausín, M. Carmen Fariñas. 27<sup>th</sup> European Immunogenetics and Histocompatibility Conference. Maastricht, The Netherlands, 11-14 de mayo de 2013.
10. Asociación del polimorfismo rs8177374 (C>T) en el gen *TIRAP*, causante de la variante S180L en la proteína adaptadora MAL (MYD88-Adaptor Like), y tuberculosis en la población de

## Anexos

Cantabria. E. Puente de Mateo, M. Gutiérrez Cuadra, J.L. Arroyo, R. Agüero Balbín, M.A. Hoz, P. Sánchez Velasco, F. Ausín Ortega, F. Leyva Cobián y J.G. Ocejo Vinyals. XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología, Pamplona, 8-11 de junio de 2011.

11. Importancia en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar latente de la producción antígeno-específica de CXCL9, CXCL10 y otras citocinas y su correlación con la producción de interferon-gamma y la reacción de Mantoux. N. Villegas, J.L. Arroyo, A. Ferrero, F. Ausín, P. Sánchez-Velasco, F. Leyva-Cobián, J.G. Ocejo-Vinyals. XXXV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología, San Sebastián, 23-26 de junio de 2010.
12. Estimación de la Infección tuberculosa en donantes de sangre de la Comunidad de Cantabria mediante la determinación de IFN-gamma tras estimulación con antígenos de Mycobacterium tuberculosis. Villegas N, Gonzalo Ocejo-Vinyals J, Amunárriz C, Ausín F, Leyva-Cobián F, Arroyo JL. XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Palma de Mallorca, 21-24 Mayo 2008.
13. Utilización de un método de hibridación con sondas específicas de secuencia para la determinación de la frecuencia de genotipos KIR en la población de donantes de sangre de Cantabria. Sánchez-Velasco P, Lavín-Alconero L, Arroyo JL, Ausín F, Amunárriz C, Leyva-Cobián F, Gonzalo Ocejo-Vinyals J. XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Palma de Mallorca, 21-24 Mayo 2008.
14. Variantes en el gen de la lectina de unión a manosa (MBL) y su asociación con tuberculosis en Cantabria. Lavín-Alconero L, Sánchez-Velasco P, Villegas N, Ausín F, Leyva-Cobián F, Gonzalo Ocejo-Vinyals J. XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Palma de Mallorca, 21-24 Mayo 2008.
15. Asociación entre los polimorfismos funcionales -403 G/A y -28 C/G de RANTES (CCL5) y tuberculosis en Cantabria. Sánchez-Castañón M, Baquero Mejía I, Sánchez-Velasco P, Ausín Ortega F, Leyva-Cobián F, Gonzalo Ocejo-Vinyals J. MXXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Palma de Mallorca, 21-24 Mayo 2008.
16. Genotipos KIR en pacientes con tuberculosis. Guerrero MA, Ocejo-Viñals G, Sánchez-Velasco P, Ausín F, Fariñas C, Leyva-Cobián F. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Granada, 28-31 de marzo de 2007.

## Anexos

**Publicaciones**



**Comunicaciones**



