

Sustrato genético del rechazo mediado
por anticuerpos tras el trasplante
cardíaco: variantes en genes de la
cascada del complemento y de la biología
de las células B

Autor/a: Grecia Manuela Marrón Liñares

Tese de doutoramento UDC / 2018

Director/a: Dr. Manuel Hermida Prieto

Dra. Lucía Núñez Fernández

Titor/a: Dr. Manuel Hermida Prieto

Programa de doutoramento en Ciencias da Saúde



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



SERVIZO
GALEGO
de SAÚDE

Complexo Hospitalario Universitario
A Coruña



instituto de
investigación biomédica
de a coruña

Dr. Manuel Hermida Prieto, miembro del grupo de investigación cardiovascular (GRINCAR) de la Universidad de La Coruña.

Dra. Lucía Núñez Fernández, miembro del grupo de investigación cardiovascular (GRINCAR) y profesora del departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de La Coruña.

Hacemos constar:

Como Directores de la Tesis Doctoral que lleva por título “Sustrato genético del rechazo mediado por anticuerpos tras el trasplante cardíaco: variantes en genes de la cascada del complemento y de la biología de las células B”, presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas, Dña. Grecia Manuela Marrón Liñares que la mencionada Tesis Doctoral cumple todos los requisitos para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente para optar al grado de doctor por la Universidad de La Coruña.

Y para que así conste firmamos el presente informe en La Coruña, a 26 de Febrero de 2018.

Dr. Manuel Hermida Prieto

Dra. Lucía Núñez Fernández

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría empezar esta Tesis Doctoral agradeciendo a todas aquellas personas que a lo largo de estos 4 años me han ayudado a desarrollar, no solo mi trabajo, sino también a crecer como persona y a ser mejor profesional. Espero no olvidarme de ninguna al dar las gracias por su apoyo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Manuel Hermida Prieto y la Dra. Lucía Núñez por haberme permitido realizar esta Tesis Doctoral, aun cuando no era la candidata perfecta.

Al Dr. Manuel Hermida por acogerme en su grupo de investigación y así permitirme aprender tantas cosas durante estos años. GRACIAS por confiar en mí, por el apoyo recibido durante todo este tiempo y por enseñarme que siempre se debe ir un poco más allá.

A la Dra. Lucía Núñez, porque además de ser una magnífica directora, se ha convertido en una amiga. Gracias por confiar en mí desde el primer momento, por tener tanta paciencia a lo largo de estos años, impulsándome a ser mejor cada vez y por ayudarme en cada dificultad que ha surgido en estos 4 años, GRACIAS.

También quiero agradecer al Dr. José Manuel Vázquez Rodríguez, jefe del servicio de Cardiología, por acogerme en el grupo de investigación de cardiología del INIBIC.

Gracias a la Dra. María G. Crespo Leiro como jefa de la unidad de insuficiencia cardíaca avanzada y a todo su equipo por su colaboración con las muestras y por su ayuda en todos los aspectos clínicos que para mí, resultaban totalmente desconocidos.

Agradecer al Dr. Javier Muñoz García, por su ayuda en todo lo referente al doctorado y por ayudarme a entender un poquito más la estadística.

A todas las personas del área de Anatomía Patológica por su inestimable ayuda en la clasificación de los pacientes empleados en esta Tesis Doctoral, en especial a Jorge Pombo.

A la Dra. Natalia Suárez, por acogerme también durante el Máster y por su paciencia para resolver todas mis dudas sobre inmunología, o lo que fuese que me asaltase la curiosidad en ese momento.

Agradecer a mis compañeros de laboratorio y a todo el personal del INIBIC, por su ayuda en todo lo que fuese necesario y especialmente a mi compañero de poyata y futuro doctor, Eloy Álvarez, por estar siempre ahí, dispuesto a echar una mano en lo que hiciese falta y porque nadie comprende como nosotros la belleza de pasarse horas y horas examinando secuencias en un ordenador esperando encontrar algo “chulo”.

A mis compañeros de carrera, porque sin vosotros las cenas no serían lo mismo. A mi grupo de locas amigas tesistas, Lara, Andrea, Ana Y., Irene, Sandra y Alba, porque nadie como vosotras entiende lo que significa hacer “La Tesis” y por las risas y la compañía cuando las cosas se ponían complicadas, dentro y fuera del laboratorio. A Valentina, Bibiana y Romina por ser esas amigas encargadas de hacerte pensar en otras cosas que no fueran la tesis, lo cual no siempre ha resultado sencillo y por estar ahí apoyándome siempre incondicionalmente.

A mis padres, porque sin ellos nada de esto hubiese sido posible. GRACIAS por haber creído en mí, por ser mi principal apoyo y por haberme guiado y convertido en la persona que soy.

Por último, decir nuevamente GRACIAS a todos los que habéis pasado por mi vida y me habéis ayudado a lograr mis objetivos. Si me olvido de alguien, perdonadme y **MUCHAS GRACIAS.**

“En la vida, no hay nada que temer, solo hay que comprender”

-Maria Salomea Skłodowska-Curie

ABREVIATURAS

A: Adenina.

A₂₆₀: Absorbancia a 260 nm.

A₂₈₀: Absorbancia a 280 nm.

Ac: Anticuerpo.

ADA: Enzima adenosina desaminasa.

ADN: Ácido dexosirribonucleico.

ADNg: Ácido dexosirribonucleico genómico.

Ag: Antígeno.

AIC: *Akaike information criterion*.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATGAM: Globulina equina antitimocito.

BAFF: Factor activador de las células B.

BAM: *Binary Alignment/Map*.

BCR: *B-cell receptor*.

BEM: Biopsia endomiocárdica.

BIC: *Bayesian information criterion*.

BR: *Broad range*.

BSAP: *B cell specific activator protein*.

BWA: *Burrows-Wheeler aligner*.

C: Citosina.

CC: Quimiocina.

CFB: Factor B.

CFD: Factor D.

CFH: Factor H.

CFI: Factor I.

CFP: Factor P o Properdina.

CHUAC: Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.

CMV: Citomegalovirus.

CN: Control negativo.

Coil: Estructura *coiled coil*.

Collag: Dominio *collagen-like*.

CPAs: Células presentadoras de antígenos.

Cr: Creatinina.

C-terminal: Extremo *cytoplasmic tail*.

D: Donante.

dbSNP: Base de datos pública *Single Nucleotide Polymorphisms*.

d.e.: Desviación estándar.

DCI: Disfunción crónica del injerto.

dd-cfDNA: *Donor-derived cell-free DNA*.

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato.

Dominio N: *N-terminal Cysteines-rich*.

DP: Disfunción primaria.

DSA: *Donor-specific antibodies*.

EBF: *Early B-cell factor*.

ECMO: *Extracorporeal membrane oxygenation*.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EICH: Enfermedad del injerto contra huésped aguda.

ELISA: *Enzyme-Linked immunosorbent assay*.

ESEs: *Exonic splicing enhancers*.

EtOH: Etanol.

EVI: Enfermedad vascular del injerto.

ExAC: Base de datos *The Exome Aggregation Consortium*.

FbIII: Dominio fibronectina tipo-III.

Fc γ Rs: Receptores para las regiones Fc de antígenos.

FE: Fracción de eyección.

FN: Falsos negativos.

FP: Falsos positivos.

FRI: Función retardada del injerto.

Fw: *Forward*.

G: Guanina.

HBV: Virus hepatitis B.

HCV: Virus hepatitis C.

HS: *High sensitive*.

HSF: *Human splicing finder*.

HLA: *Human leukocyte antigen*.

IC: Intervalo de confianza.

ID: Identificación.

IF: Inmunofluorescencia.

IFN γ : Interferón gamma.

Ig: Inmunoglobulina.

IGV: Programa *Integrative genomics viewer*.

IH: Inmunohistoquímica.

IL: Interleucina.

IP: Inmunoperoxidasa.

ISHLT: *International Society of Heart and Lung Transplantation*.

ITGA4: Integrina α 4.

IVIg: Inmunoglobulinas intravenosas.

KIRs: Killer cell immunoglobulin-like receptors.

MAC: *Membrane attack complex.*

MAF: *Minor allele frequency.*

MBL: Lectina de union a manosa.

MCP: *Membrane cofactor protein.*

miARNs: micro-ARNs.

MICA: MHC class I polypeptide-related sequence A.

MIF: Factor activador de macrófagos.

MMF: Micofenolato de mofetilo.

ND: No disponible.

NEG: Negativo.

NGS: *Next generation sequencing.*

NK: *Natural killer.*

nt: Nucleótidos.

OR: *Odds ratio.*

OKT3: Anticuerpo monoclonal muromonab-CD3.

pb: Pares de bases.

PBS: *Phosphate buffered saline.*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PCR-Exo: PCR purificada con *ExoProStar 1-Step.*

PDB: *Protein data bank.*

PhDSNP: *Predictor of human deleterious single nucleotide polymorphisms.*

pRMA: Clasificación patológica del rechazo mediado por anticuerpos.

PPC: *PCR primers cocktail.*

Polyphen-2: *Polymorphism phenotyping.*

POS: Positivo.

Q: *Quality score.*

Q1: Cuartil 1.

Q3: Cuartil 3.

R: Receptor.

RATG: Globulina de ratón antitímocito.

RC: Rechazo celular.

RMA: Rechazo mediado por anticuerpos.

REs: Resistencia a esteroides.

rpm: revoluciones por minuto.

RS: Rechazo severo.

rs: *reference SNP*.

Rv: *Reverse*.

SAV: Programa *Illumina sequencing analysis viewer 1.10.2*.

SIFT: *Sorting intolerant from tolerant*.

SMB: *Streptavidin magnetic beads*.

SNP: *Single nucleotide polymorphism*.

SPB: *Sample purification beads*.

SSP: *Splice site prediction*.

SUH: Síndrome urémico hemolítico.

T: Timina.

TC: Trasplante cardíaco.

Th: *T helper*.

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa.

TR: Trasplante renal.

VCF: *Variant call format*.

Vf: Volumen final.

VN: Verdaderos negativos.

VNC: Variación en el número de copias.

VP: Verdaderos positivos.

WS: *Working solution.*

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XVIII
RESUMEN	1
ABSTRACT	5
RESUMO	9
INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 Rechazo mediado por anticuerpos	17
1.1.1 Frecuencia del RMA	22
1.1.2 DSAs en el RMA y daño endotelial	24
1.1.3 Cuestiones abiertas en el RMA en el TC	26
1.1.3.1 Problemas de definición y diagnóstico del RMA tras el TC	26
1.1.3.2 Técnicas de monitorización del RMA	29
1.1.3.3 Tratamiento del RMA.....	32
1.1.3.4 Genética del RMA	37
1.2 Papel del sistema de complemento en el RMA	39
1.2.1 Fisiología del complemento	39
1.2.2 Regulación del complemento	45
1.2.3 Variantes genéticas en el complemento y el trasplante.....	46

1.2.3.1 Variantes genéticas del complemento en patologías	
post-trasplante	47
1.3 Papel de las células B en el RMA.....	49
1.3.1 Diferenciación y activación de las células B.....	49
1.3.2 Regulación de la diferenciación de las células B	52
1.3.3 Variantes genéticas en las células B.....	54
1.3.3.1 Variantes genéticas de las células B en patologías	
post-trasplante.....	55
OBJETIVOS	59
MATERIAL Y MÉTODOS	63
3.1 Selección de pacientes	65
3.1.1 Receptores de TC	65
3.1.2 Donantes y parejas donante-receptor	66
3.2 Extracción del ADN	66
3.3 Cuantificación del ADN	68
3.3.1 Cuantificación del ADN total.....	68
3.3.2 Cuantificación del ADN de doble cadena.....	69
3.4 Secuenciación masiva (NGS)	71
3.4.1 Preparación de librerías.....	75

3.4.1.1 Preparación de las muestras	76
3.4.1.1.1 Fragmentación y marcado del ADN genómico	76
3.4.1.1.2 Limpieza del ADN marcado	77
3.4.1.1.3 Primera PCR	78
3.4.1.1.4 Purificación de la PCR.....	80
3.4.1.1.5 Cuantificación de las librerías.....	80
3.4.1.2 Formación del <i>pool</i>	80
3.4.1.3 Hibridación, captura y purificación	81
3.4.1.3.1 Primera hibridación.....	81
3.4.1.3.2 Primera captura	82
3.4.1.3.3 Lavado de muestras de captura	83
3.4.1.4 Segunda amplificación por PCR.....	83
3.4.1.5 Purificación de la PCR.....	83
3.4.1.6 Cuantificación del <i>pool</i>	84
3.4.2 Secuenciación por síntesis de Illumina	84
3.4.3 Análisis bioinformático	89
3.5 Visualización de las secuencias	91
3.6 Sensibilidad, exactitud y especificidad de la NGS	93
3.7 Asociación de variantes con el RMA	98

3.7.1 Asociación de polimorfismos presentes en receptores y donantes, con el RMA	98
3.7.2 Asociación de la presencia de haplotipos con el RMA	101
3.7.3 Asociación de polimorfismos presentes en parejas donante-receptor y el RMA	102
3.8 Consulta de información en bases de datos de las variantes detectadas.....	103
3.9 Herramientas <i>in silico</i>	104
3.9.1 Visualización de las variantes en modelos 3D	104
3.9.2 Predictores de efecto para la sustitución aminoacídica	104
3.9.3 Predictores del efecto de la variante en el <i>splicing</i>	105
3.10 Estudios de expresión	105
3.10.1 Estudio de expresión para la proteína MBL.....	105
3.10.2 Estudio de expresión para la proteína properdina	108
3.10.3 Estudio de expresión para la proteína integrina $\alpha 4$	111
3.11 Análisis estadístico	114
RESULTADOS	117
4.1 Características clínicas	119
4.1.1 Características clínicas de los pacientes seleccionados	119
4.1.2 Características clínicas de los donantes y de las parejas	

donante-receptor.....	120
4.2 Calidad de las secuencias	122
4.2.1 Puntuación de Phred de calidad (Q30).....	122
4.2.2 Sensibilidad, exactitud y especificidad de la NGS.....	122
4.3 Variantes presentes en receptores con TC y su asociación con el RMA.....	123
4.3.1 Polimorfismos presentes en los genes del complemento y su relación con el RMA.....	123
4.3.1.1 Polimorfismo p.Gly54Asp- <i>MBL2</i> en el RMA.....	125
4.3.1.1.1 Bases de datos, análisis de asociación y pruebas <i>in silico</i>	126
4.3.1.1.2 Estudio de expresión para la proteína MBL	128
4.3.1.2 Polimorfismo p.Asn428(p=)- <i>CFP</i> en el RMA	129
4.3.1.2.1 Bases de datos, análisis de asociación y pruebas <i>in silico</i>	130
4.3.1.2.2 Estudio de expresión para la proteína properdina.....	132
4.3.2 Polimorfismos presentes en los genes implicados en la biología de las células B y su relación con el RMA	133
4.3.2.1 Polimorfismos (p.Thr615(p=), p.Gln878Arg y p.His961(p=))- <i>ITGA4</i> en el RMA	135
4.3.2.1.1 Bases de datos, análisis de asociación y pruebas <i>in silico</i>	136
4.3.2.1.2 Estudio de expresión para la proteína integrina $\alpha 4$	142
4.4 Variantes presentes en Donantes y su asociación con el RMA.....	143

4.4.1 Polimorfismos presentes en los genes del complemento, en donantes y su relación con el RMA.....	143
4.4.2 Polimorfismos presentes en los genes implicados en la biología de las células B, en donantes y su relación con el RMA	145
4.4.2.1 Polimorfismo p.Ile75Val- <i>IL4Rα</i> en el RMA	147
4.4.2.1.1 Bases de datos, análisis de asociación y pruebas <i>in silico</i>	148
4.5 Variantes presentes en las parejas donante-receptor y su asociación con el RMA	150
4.5.1 Polimorfismo p.Val178(p=)- <i>ADA</i> en el RMA	151
4.5.1.1 Bases de datos, análisis de asociación y pruebas <i>in silico</i>	152
DISCUSIÓN.....	155
5.1 Variantes presentes en pacientes con TC y su asociación con el RMA	159
5.1.1 Polimorfismos presentes en los genes del complemento y su relación con el RMA.....	159
5.1.1.1 Efecto protector del polimorfismo p.Gly54Asp- <i>MBL2</i> frente al RMA.....	160
5.1.1.2 Efecto del polimorfismo p.Asn428(p=)- <i>CFP</i> en el RMA	162
5.1.2 Polimorfismos presentes en genes relacionados con la biología de las células B y su relación con el RMA	163

5.1.2.1 Efecto de los polimorfismos (p.Thr615(p=), p.Gln878Arg y p.His961(p=))- <i>ITGA4</i> en el RMA	164
5.2 Variantes presentes en donantes y su asociación con el RMA	167
5.2.1 Efecto del polimorfismo p.Ile75Val- <i>IL4Rα</i> en el RMA	168
5.3 Análisis de variantes presentes en las parejas donante-receptor y su asociación con el RMA	169
5.3.1 Efecto del polimorfismo p.Val178(p=)- <i>ADA</i> en el RMA	170
CONCLUSIONES	173
BIBLIOGRAFÍA	177
ANEXOS	209
Anexo 1: Polimorfismos encontrados en los genes de la vía del complemento, en receptores con TC	211
Anexo 2: Polimorfismos encontrados en genes relacionados con las células B, en receptores con TC	223
Anexo 3: Polimorfismos encontrados en genes de la vía del complemento, en donantes	235
Anexo 4: Polimorfismos encontrados en genes relacionados con las células B, en donantes	247
Anexo 5: Polimorfismos encontrados en genes de la vía del complemento y las células B, en las parejas donante-receptor con TC	257

DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....285

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Línea temporal que muestra la historia del RMA en el trasplante	20
Figura 2. Mecanismos de los DSAs para mediar el daño endotelial	25
Figura 3. Fotomicrografías del pRMA	29
Figura 4. Sistema del complemento	40
Figura 5. Vía clásica del complemento	42
Figura 6. Vía de las lectinas de activación del complemento.....	43
Figura 7. Vía alternativa de activación del complemento	44
Figura 8. Vía final del complemento	45
Figura 9. Diferenciación y activación de las células B.....	51
Figura 10. Regulación del proceso de diferenciación de las células B.....	54
Figura 11. Esquema extracción de ADN con <i>QIAamp DNA Blood Mini Kit</i>	67
Figura 12. Gráfico absorbancias	69
Figura 13. Instrucciones para la preparación de las muestras para su medición en el <i>Qubit® 3.0</i>	70
Figura 14. Flujo de trabajo para la preparación de las librerías con el kit <i>TruSight™ One Sequencing Panel Library Preparation</i>	76
Figura 15. Marcado del ADNg con la transposasa de <i>Nextera</i>	77
Figura 16. Protocolo primera PCR	79
Figura 17. Protocolo segunda PCR.....	83

Figura 18. Secuenciación de tipo <i>paired end</i>	85
Figura 19. Celda de flujo <i>NextSeq® 500</i>	85
Figura 20. Proceso de amplificación de los <i>clusters</i> en fase sólida.....	86
Figura 21. Secuenciación por síntesis Illumina	87
Figura 22. Imágenes secuenciación 2 canales	88
Figura 23. Imagen de placa durante la secuenciación	89
Figura 24. Pasos para la generación de archivos de análisis	90
Figura 25. Alineamiento de las secuencias con el genoma humano (hg19).....	91
Figura 26. Visualización de los ficheros BAM y VCF con IGV.....	92
Figura 27. Mezcla de reacción y protocolo de PCR para amplificación de las secuencias.....	96
Figura 28. Mezcla de reacción de secuenciación de ADN y protocolo de PCR	97
Figura 29. Análisis de las secuencias por el método de Sanger	98
Figura 30. Base de datos para análisis de polimorfismos con <i>SNPStats</i>	99
Figura 31. Estudios de asociación con el paquete “ <i>SNPassoc</i> ” de <i>R</i>	101
Figura 32. Esquema realización ELISA para proteína MBL.....	106
Figura 33. Recta patrón ELISA MBL	107
Figura 34. Esquema realización ELISA para proteína properdina	109
Figura 35. Recta patrón ELISA properdina.....	110

Figura 36. Esquema realización ELISA para proteína integrina $\alpha 4$	112
Figura 37. Recta patrón ELISA ITGA4.....	112
Figura 38. Distribución de los SNPs detectados en los genes del complemento	124
Figura 39. Profundidad media de los 51 genes seleccionados por su papel en la vía del complemento	125
Figura 40. Tránsito del gen <i>MBL2</i> , dominios y estructura de MBL.....	126
Figura 41. Concentraciones de la proteína MBL en suero según el genotipo <i>MBL2</i>	129
Figura 42. Tránsito del gen <i>CFP</i> y dominios de la proteína properdina	129
Figura 43. Concentración de properdina en suero según el genotipo <i>CFP</i>	133
Figura 44. Distribución de los SNPs detectados en los genes implicados en la biología de las células B	134
Figura 45. Profundidad media de los 61 genes seleccionados por su papel en la biología de las células B	135
Figura 46. Estructura del gen <i>ITGA4</i> y de la proteína integrina $\alpha 4$	136
Figura 47. Concentración de integrina $\alpha 4$ en suero según el genotipo <i>ITGA4</i>	143
Figura 48. Distribución de los SNPs detectados en los genes del complemento, en los donantes	144
Figura 49. Profundidad media de los 51 genes seleccionados por su papel en la vía del complemento, en los donantes.....	145

Figura 50. Profundidad media de los 61 genes seleccionados por su papel en la biología de las células B, en los donantes.....146

Figura 51. Distribución de los SNPs detectados en los genes relacionados con la biología de las células B, en los donantes147

Figura 52. Tránsito del gen *IL4R α* , dominios y estructura *IL4R α* 148

Figura 53. Tránsito del gen *ADA* y estructura primaria de *ADA*152

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de casos de RMA en función del órgano trasplantado	23
Tabla 2. Hallazgos RMA agudo en corazón según la clasificación ISHLT 2005	27
Tabla 3. Clasificación ISHLT 2013 para el diagnóstico patológico del RMA tras el TC	28
Tabla 4. Variantes genéticas en los genes del complemento, asociadas con patologías post-trasplante.....	48
Tabla 5. Variantes genéticas en las células B, relacionadas con patologías Post-trasplante	56
Tabla 6. Lista de genes incluidos en el estudio por su papel en el sistema del complemento o en la biología de las células B.....	72
Tabla 7. Amplicones seleccionados para el cálculo de la sensibilidad, precisión y exactitud de la NGS.....	94
Tabla 8. Datos demográficos de los receptores seleccionados	120
Tabla 9. Datos demográficos de las parejas donante-receptor seleccionadas	121
Tabla 10. Puntuación Q30 para los 7 <i>pools</i> secuenciados.....	122
Tabla 11. Análisis de asociación para el SNP p.Gly54Asp en el gen <i>MBL2</i>	127
Tabla 12. Análisis <i>in silico</i> para el SNP p.Gly54Asp.....	128
Tabla 13. Análisis de asociación para el SNP p.Asn428(p=) en el gen <i>CFP</i>	131
Tabla 14. Análisis <i>in silico</i> para la variante p.Asn428(p=)	132

Tabla 15. Análisis de asociación para los SNP p.Thr615(p=), p.Gln878Arg y p.His961(p=) en el gen <i>ITGA4</i>	137
Tabla 16. Análisis de haplotipos con <i>SNPStats</i> y <i>THESIAS 3.1</i>	139
Tabla 17. Análisis <i>in silico</i> para el SNP p.Gln878Arg.....	140
Tabla 18. Análisis <i>in silico</i> para las variantes sinónimas en el gen <i>ITGA4</i>	141
Tabla 19. Análisis <i>in silico</i> para las variantes p.Thr615(p=) y p.His961(p=)	141
Tabla 20. Análisis de asociación para el SNP p.Ile75Val en el gen <i>IL4Rα</i>	149
Tabla 21. Análisis <i>in silico</i> para el SNP p.Ile75Val	150
Tabla 22. Distribución del SNP p.Val178- <i>ADA</i>	152
Tabla 23. Análisis <i>in silico</i> para la variante p.Val178(p=).....	154

RESUMEN

Una de las principales complicaciones tras el trasplante cardíaco (TC) es la aparición del rechazo mediado por anticuerpos (RMA), donde la cascada del complemento y las células B juegan un papel fundamental. En esta tesis doctoral nos planteamos estudiar los genes implicados en la biología de las células B y en la activación de la cascada del complemento, en los pacientes trasplantados y sus donantes que aportan información relevante sobre el RMA.

Para ello, se analizaron las variantes genéticas detectadas en 112 genes, 51 genes relacionados con la vía del complemento y 61 genes implicados en la biología de las células B en 46 receptores con TC, 23 con RMA y 23 sin RMA y en 28 donantes, 14 donantes de los pacientes con RMA y 14 donantes de los pacientes sin RMA.

Se identificaron 7 polimorfismos (SNP) con diferencias significativas entre ambos grupos: 5 SNPs presentes en receptores: 2 SNPs en genes de la vía del complemento (p.Gly54Asp-*MBL2* y p.Asn428(p=)-*CFP*) y 3 SNPs en el gen *ITGA4* implicado en la biología de las células B [p.Thr615(p=), p.Gln878Arg y p.His961(p=)]. Un SNP en el gen *IL4R α* (p.Ile75Val), relacionado con la biología de las células B, en los donantes y un SNP en el gen *ADA* (p.Val178(p=)), que participa en la regulación de las células B, en las parejas donante-receptor con TC.

Además, para examinar el papel de las variantes p.Gly54Asp-*MBL2*, p.Asn428(p=)-*CFP* y para el haplotipo AGT-*ITGA4*, se llevaron a cabo estudios de expresión, en pacientes con presencia y ausencia de dichas variantes, que corroboraron su posible papel en el desarrollo del RMA.

La conclusión más relevante de este estudio es que los polimorfismos presentes en los genes *MBL2* y *CFP* de la vía del complemento, en receptores con TC, y en los genes

ITGA4, *IL4Rα* y *ADA*, en las células B, en receptores con TC y donantes, juegan un importante papel en el RMA.

ABSTRACT

One of the main problems involved in heart transplantation (HT) is the humoral response now termed antibody-mediated rejection (AMR), where complement cascade and B-cells play a key role. Thus, in this doctoral thesis, we explore the importance of genes related to complement pathway and B-cell biology in heart transplant patients and their donors that can yield diagnostic and prognostic information about AMR.

For this purpose, genetic variants in 112 genes (51 complement pathway and 61 B-cell biology genes) were analyzed by next generation sequencing in 46 HT patients, 23 with and 23 without AMR and 28 donors, 14 donors from patients with and 14 donors from patients without AMR.

We have identified 7 polymorphisms (SNPs) between groups which correlates with the development of AMR: 5 SNPs in receptors: 2 SNPs in complement genes (p.Gly54Asp-*MBL2* and p.Asn428(p=)-*CFP*) and 3 SNPs in *ITGA4* gene, related with B-cell biology [p.Thr615(p=), p.Gln878Arg y p.His961(p=)]. We have identified one SNP in donors in genes related with B-cell biology, p.Ile75Val-*IL4R α* , which correlates with the development of AMR. Moreover, in the analysis of discrepancies between recipient-donor genotypes, we have identified another SNP, in this case in *ADA* gene (p.Val178(p=)), which is related with B-cell biology, associated with AMR.

In addition, to examine the role of the variants p.Gly54Asp-*MBL2*, p.Asn428 (p =)-*CFP* and for the AGT-*ITGA4* haplotype, expression studies were carried out, in patients with presence and absence of these variants, that corroborated their possible role in the development of the AMR.

The most relevant conclusion of this study is that polymorphisms in HT receptors in *MBL2* and *CFP* genes of the complement pathway and polymorphisms in *ITGA4*,

IL4R α , and *ADA* genes belonging to the B cells biology in HT receptors and in donors could have an important role in AMR.

RESUMO

Unha das principais complicacións tras o transplante cardíaco é a aparición do rexeitamento mediado por anticorpos (RMA), onde a cascada do complemento e as células B xogan un papel fundamental. Nesta tese de doutoramento nos plantexamos o estudo dos xenes implicados na bioloxía das células B e na activación da cascada do complemento, en pacientes transplantados e nos seus doantes que aportan información diagnóstica e prognóstica sobre o RMA.

Para iso, analizáronse as variantes xenéticas detectadas en 112 xenes, 51 xenes relacionados coa vía do complemento e 61 xenes implicados na bioloxía das células B en 46 receptores con TC, 23 con RMA e 23 sen RMA e en 28 doantes, 14 doantes dos pacientes con RMA e 14 doantes dos pacientes sen RMA.

Identificáronse 7 polimorfismos (SNP) con diferenzas significativas entre ambos grupos: 5 SNPs presentes en receptores: 2 SNPs en xenes da vía do complemento (p.Gly54Asp-*MBL2* y p.Asn428(p=)-*CFP*) e 3 SNPs no xen *ITGA4* implicado na bioloxía das células B [p.Thr615(p=), p.Gln878Arg y p.His961(p=)]. Un SNP no xen *IL4Rα* (p.Ile75Val), relacionado coa bioloxía das células B, nos doantes e un SNP no xen *ADA* (p.Val178(p=)), que participa na regulación das células B, nas parexas doante-receptor con TC.

Ademais, para examinar o papel das variantes p.Gly54Asp-*MBL2*, p.Asn428(p=)-*CFP* e para o haplotipo AGT-*ITGA4*, leváronse a cabo estudos de expresión en pacientes, con presenza e ausencia de ditas variantes, que corroboraron o seu posible papel no desenvolvemento do RMA.

A conclusión máis relevante deste estudo é que os polimorfismos presentes nos xenes *MBL2* e *CFP* da vía do complemento, en receptores con TC, e nos xenes *ITGA4*, *IL4Rα*

e *ADA*, nas células B, en receptores con TC e en doantes, xogan un importante papel no RMA.

INTRODUCCIÓN

1.1 Rechazo mediado por anticuerpos

La idea de reemplazar órganos afectados del cuerpo por otros sanos, ha cautivado la imaginación humana desde la antigüedad y encontramos referencias a los trasplantes en escritos antiguos procedentes de Egipto, India, China y la cultura cristiana con referencias que se remontan incluso al año 2.000 a.C. (1). En antiguos manuales chinos, ya se hace referencia al médico Pien Ch'iao que intercambié los corazones de dos guerreros entre sí con el fin de lograr un equilibrio entre las fuerzas de ambos individuos (2). En el antiguo testamento se hace la que probablemente sea la primera referencia al trasplante cardíaco cuando el profeta Ezequiel dice, “Yo les daré un solo corazón...Y quitaré de su carne el corazón de piedra y les daré un corazón de carne”. Pero, quizás la leyenda más famosa sobre los trasplantes sea “el milagro de la pierna negra”, descrita en el año 300 a.C. por los Santos Cosmas y Damian quienes sustituyeron la pierna gangrenada de un diacono romano por una pierna sana de un etíope que había fallecido recientemente (3). Si bien resulta poco probable que ninguno de estos escritos derive de hechos reales, ponen de manifiesto la fascinación por el trasplante (4).

Más allá del folclore, durante siglos se hicieron intentos por trasplantar diferentes tipos de tejidos. Así, encontramos referencias al trasplante de injertos en el manual indio titulado *Sushruta Samhita* del año 600 a.C., que recoge los procedimientos aplicados para la reparación de nariz empleando piel de la frente del individuo, al cual se le había amputado la misma, normalmente como castigo por un crimen (5-6). En los manuales chinos encontramos referencias al médico chino Hua Tuo, quien, en el siglo II, realizó trasplantes de órganos enfermos administrando a sus pacientes plantas medicinales que funcionaban como anestésicos. Sin embargo, Hua Tuo fue ejecutado por sus prácticas y

todos sus manuales fueron quemados y sus prácticas quedaron en desuso (4,7). Muchos siglos después, en el S. XVI, debido a la creciente popularidad del duelo con espadas, en los cuales eran frecuentes las amputaciones de nariz, Gaspare Tagliacozzi, basándose en el método italiano de reparación nasal descrito por los sicilianos Gustavo Branca y su hijo Antonio, logró reparar con éxito la nariz empleando injertos autógenos procedentes del propio brazo del individuo (5,8-9). Aunque durante el siglo XVI, se hicieron varios intentos con aloinjertos, es decir injertos procedentes de otro individuo de la misma especie, éstos, a diferencia de los injertos autógenos, no funcionaban. Tagliacozzi y otros científicos de la época especularon sobre si esto era debido a la “fuerza del individuo” (10). A pesar de esta observación, hasta el siglo XX no se documenta la posibilidad de que los injertos puedan ser rechazados por el cuerpo del individuo trasplantado. Es entonces cuando se empiezan a investigar las bases inmunológicas del trasplante (4,9).

En esta línea, si revisamos la historia del rechazo mediado por anticuerpos (RMA) en el trasplante (Figura 1), vemos que la primera evidencia sobre el posible papel de los anticuerpos en el rechazo de injertos, fue explicada por Peter Gorer en 1936. Gorer, describió el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en ratones, como un antígeno de grupo sanguíneo al que llamó antígeno 2 y que estaba involucrado en el rechazo de trasplante de tejidos y tumores (11). En la década siguiente, George Snell desarrolló cepas de ratones congénicas que solo diferían en entre sí en un pequeño segmento cromosómico. El análisis serológico de estas cepas, permitió la confirmación de lo descrito anteriormente por Gorer, al establecer que los genes que controlaban la resistencia ante los injertos tumorales eran los mismos, o estaban estrechamente relacionados, con genes codificados por el antígeno 2 que fue designado como H-2 (12). Los trabajos de los Drs. Gorer y Snell, proporcionaron la base al Dr. Dausset, quien en

1958 describió por primera vez el antígeno leucocitario humano (*Human leukocyte antigen*, HLA) (13). Los trabajos de los Drs. Dausset y Snell en el campo de la histocompatibilidad, les llevaron a conseguir, en el año 1980 el premio Nobel de medicina, junto al Dr. Benacerraf, por sus estudios sobre los genes que regulan la respuesta inmune. A partir del descubrimiento de Dausset, los Drs. Payne y van Rood identificaron rápidamente los anticuerpos contra los antígenos HLA, en pacientes con transfusiones previas y mujeres multíparas (14-15). Años más tarde el Dr. Terasaki desarrolló los test de identificación de los antígenos HLA (16). Paralelamente, Medawar y colaboradores (17), postularon que el rechazo del injerto se asemejaba a una reacción de hipersensibilidad retardada mediada por células, trabajo por el que se le otorgó el premio Nobel en el año 1960. Debido a la gran reputación del Dr. Medawar, la mayoría de los investigadores se inclinaron por la teoría celular del rechazo de injertos, dejando la teoría del rechazo mediado por anticuerpos en segundo plano hasta que, en el año 1970, el Dr. Jeannet y colaboradores señalaron la correlación existente entre anticuerpos circulantes específicos contra antígenos de donante (*Donor-specific antibodies* (DSA)) y la presencia de lesiones en el injerto renal (9,18-19).

En la década siguiente, el Dr. Herskowitz y colaboradores (20) definieron por primera vez los aspectos clínicos del RMA en el trasplante cardíaco (TC), caracterizado por la presencia de vasculitis o edema severo, en ausencia de infiltrado celular y con un mal pronóstico. Dos años más tarde, el Dr. Hammond y colaboradores (21) describieron un patrón de rechazo humoral en 6 pacientes con TC asociados con depósitos de anticuerpos y de moléculas del complemento. Finalmente en los años 90, el concepto de RMA comienza a ser aceptado, con cierta controversia, como una patología diferente del rechazo celular (RC), mediado por linfocitos T, al establecerse la presencia de depósitos de C4d como marcador de fijación del complemento en el injerto, seguido del

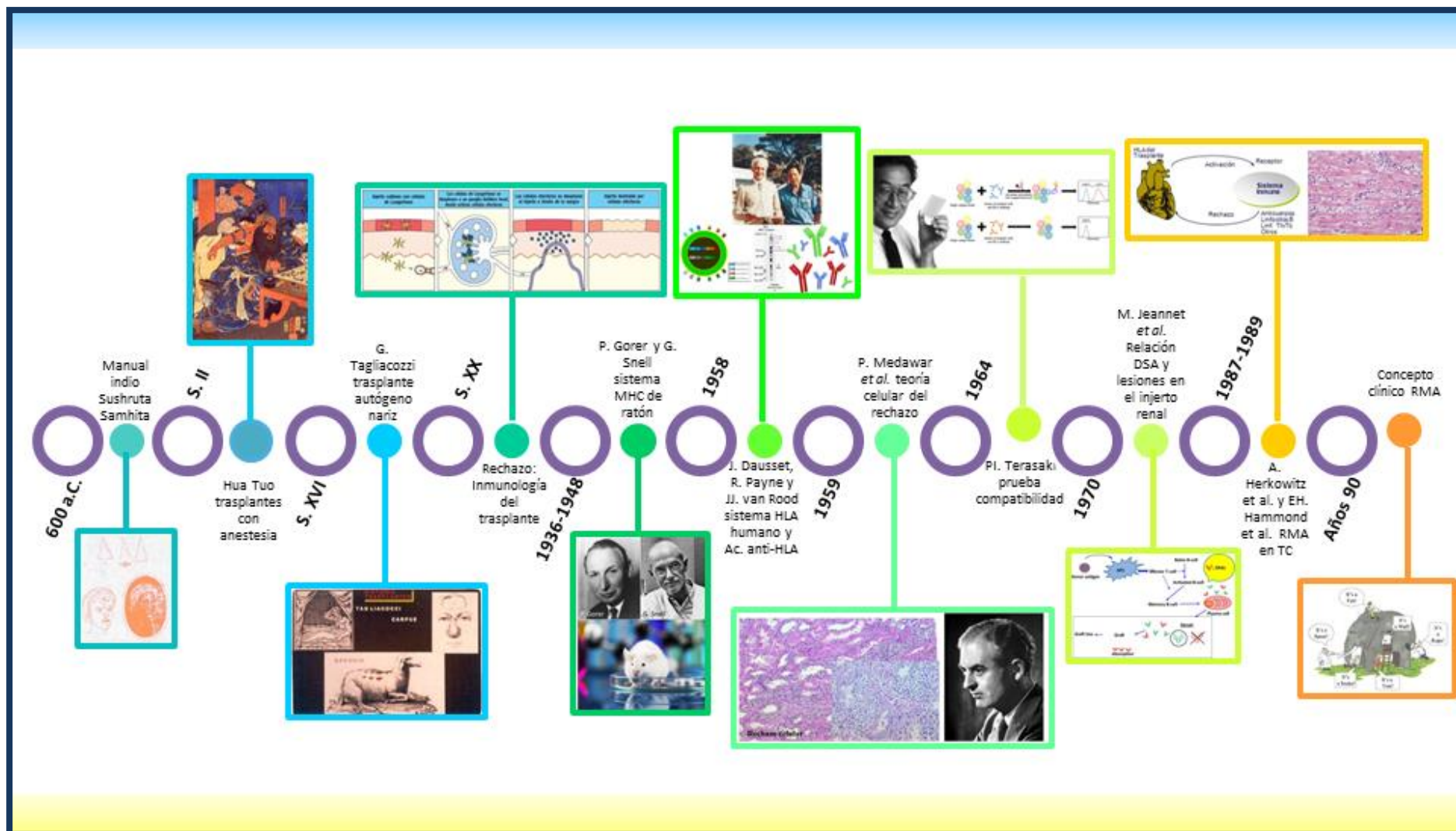


Figura 1. Línea temporal que muestra la historia del RMA en el trasplante.

hallazgo que asociaba la presencia de estos depósitos, con anticuerpos DSA (22-23). A pesar de estos hallazgos, el debate sobre el RMA continuó, en gran parte debido a la ausencia de técnicas que permitiesen detectar con fiabilidad la presencia de anticuerpos y depósitos del complemento en el injerto.

Hoy en día, aunque la definición sigue estando en discusión, sabemos que el RMA se produce cuando los anticuerpos del receptor son dirigidos contra antígenos HLA del donante, bien por la presencia de anticuerpos preformados debido a un proceso de sensibilización previa del receptor, producido frecuentemente por transfusiones previas, trasplantes anteriores, o en mujeres con embarazos múltiples; o bien debido a la producción *de novo* de anticuerpos DSA (24-26). Así pues, se considera que la presencia de anticuerpos es la causa principal del fallo del injerto, mediante la fijación y activación del complemento, induciendo un proceso inflamatorio. Este estado inflamatorio, produce una serie de respuestas que incluyen la activación de plaquetas, macrófagos y células dendríticas, lo que finalmente producirá la disfunción del injerto (25-27).

El RMA se caracteriza, histológicamente, por la presencia de grandes células endoteliales que reflejan la activación endotelial que es consecuencia de la señalización intracelular inducida por los anticuerpos, y posteriormente, por el sistema del complemento. La presencia de vasculitis o infiltrado leucocitario a través del endotelio, en la pared de los vasos, demuestra la activación de la respuesta humoral con citotoxicidad dependiente de anticuerpos, citoquinas y reclutamiento de monocitos circulantes (25). Esta caracterización suele ir acompañada de hallazgos inmunopatológicos, relacionados con la presencia de depósitos de inmunoglobulina,

complemento (C4d, C3d y/o C1q) y macrófagos (CD68) en los capilares, detectables mediante técnicas de tinción inmunohistoquímica e inmunofluorescente (28).

Por tanto, podemos definir el RMA como un proceso inmunopatológico mediante el cual el sistema inmune del receptor, intenta destruir el injerto trasplantado mediante la producción de anticuerpos, citoquinas y complemento. Clínicamente, se asocia con compromiso hemodinámico, incremento de disfunción del injerto, aceleración de la enfermedad vascular del injerto (EVI) y un descenso en la tasa de supervivencia (24,27,29-30).

1.1.1 Frecuencia del RMA

El RMA puede aparecer inmediatamente tras el trasplante, durante las primeras horas o días tras la reperfusión del injerto (RMA hiperagudo), a las pocas semanas (RMA agudo) o incluso años después del trasplante (RMA crónico) (24). Este último asociado a la producción *de novo* de anticuerpos DSA (26).

Hasta hace unos años, la forma más frecuente de RMA, era el rechazo hiperagudo que se manifestaba casi de forma inmediata tras el trasplante, asociado a:

- Presencia de anticuerpos preexistentes,
- Pruebas cruzadas donante/receptor positivas,
- Sensibilización previa positiva para el anticuerpo monoclonal muromonab-CD3 (OKT3),
- Pruebas para citomegalovirus (CMV) positivas,
- Implantación de un dispositivo de asistencia ventricular o sensibilización previa del receptor (31).

Sin embargo, en los últimos años, el avance en los tratamientos inmunosupresores y los estudios previos de compatibilidad, han hecho que este tipo de rechazo hiperagudo

decrezca. Actualmente los tipos de RMA más frecuentes son el rechazo agudo y el crónico (31-32).

En cuanto a la frecuencia del RMA, no es sencillo establecerla debido a los cambios que ha habido en los últimos años en los criterios de diagnóstico del RMA y a la escasez, en la mayoría de centros, de rutinas de monitorización en pacientes asintomáticos con RMA. Todo esto ha hecho que exista disparidad entre diferentes hospitales con respecto a la cantidad de casos registrados (31). En la Tabla 1 se muestra el rango de incidencias descritas para el RMA según el tipo de órgano trasplantado. Así, vemos que el RMA se ha descrito con mayor frecuencia en el trasplante renal (TR) y cardíaco, presentando en todos los casos, un rango variable.

Tipo de trasplante	Incidencia del RMA
Cardíaco (25,29)	3-85%
Hepático (33-34)	10-24%
Pancreático (35-36)	10-20%
Pulmonar (34)	4-25%
Renal (34,37)	6-60%

Tabla 1. Porcentaje de casos de RMA en función del órgano trasplantado.

Debido a que en esta tesis doctoral, incluimos pacientes con TC como modelo de estudio del RMA, a partir de este apartado nos centraremos en el RMA tras el TC. Es importante destacar que la unidad de Insuficiencia cardíaca y trasplante cardíaco del Hospital Universitario de A Coruña (CHUAC) es uno de los grupos de referencia en este campo, con alrededor de 20 trasplantes cardíacos al año.

1.1.2 DSAs en el RMA y daño endotelial

El mecanismo por el que se produce daño endotelial, no es del todo conocido pero se han descrito tres mecanismos por los cuales los DSAs, producidos en el RMA, podrían provocar daño endotelial tras el trasplante (Figura 2):

A. La vía clásica mediante la fijación del complemento:

En esta vía, los antígenos unidos al complemento, son capaces de interaccionar de forma más eficiente con las células B mediante el receptor CR2 reduciendo así la cantidad de antígenos necesaria para inducir la producción de anticuerpos (38-39). A su vez, los anticuerpos formados, son capaces de unirse a la superficie endotelial del injerto provocando la activación de la vía clásica del complemento y la lisis celular (39-41).

B. Receptores Fc y lesión del injerto:

Los monocitos, macrófagos, neutrófilos y las células *Natural Killer* (NK), expresan receptores para las regiones Fc de los anticuerpos (Fc γ Rs) que median las diferentes respuestas celulares de la inmunidad innata, tales como (42):

- Activación de células endoteliales y reclutamiento de leucocitos,
- Fagocitosis mediada por macrófagos,
- Citotoxicidad mediada por DSAs,
- Producción de interferón gamma (IFN γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y liberación de quimiocinas (CC) que pueden aumentar el efecto de los anticuerpos.

Todos estos procesos resultan relevantes en la etiología del RMA y sugieren que las células podrían mediar el daño endotelial a través de los Fc γ Rs (43-44).

C. Activación endotelial por los anticuerpos:

Diferentes estudios señalan que algunos DSAs tienen poca capacidad para fijar el complemento, lo cual sugiere que podrían participar en el RMA de una manera independiente al mismo, mediante la estimulación de señales proinflamatorias y otras que promueven la proliferación de células endoteliales (45-46). Esto también se observa en estudios clínicos que reflejan que, en algunos casos, los inhibidores del sistema del complemento no resultan eficaces para la prevención del RMA crónico (47-48). Por este motivo, en los últimos años se ha reconocido un subtipo de RMA C4d-negativo, lo cual ha hecho necesario reformular el esquema de diagnóstico del RMA para incluir esta entidad (49).

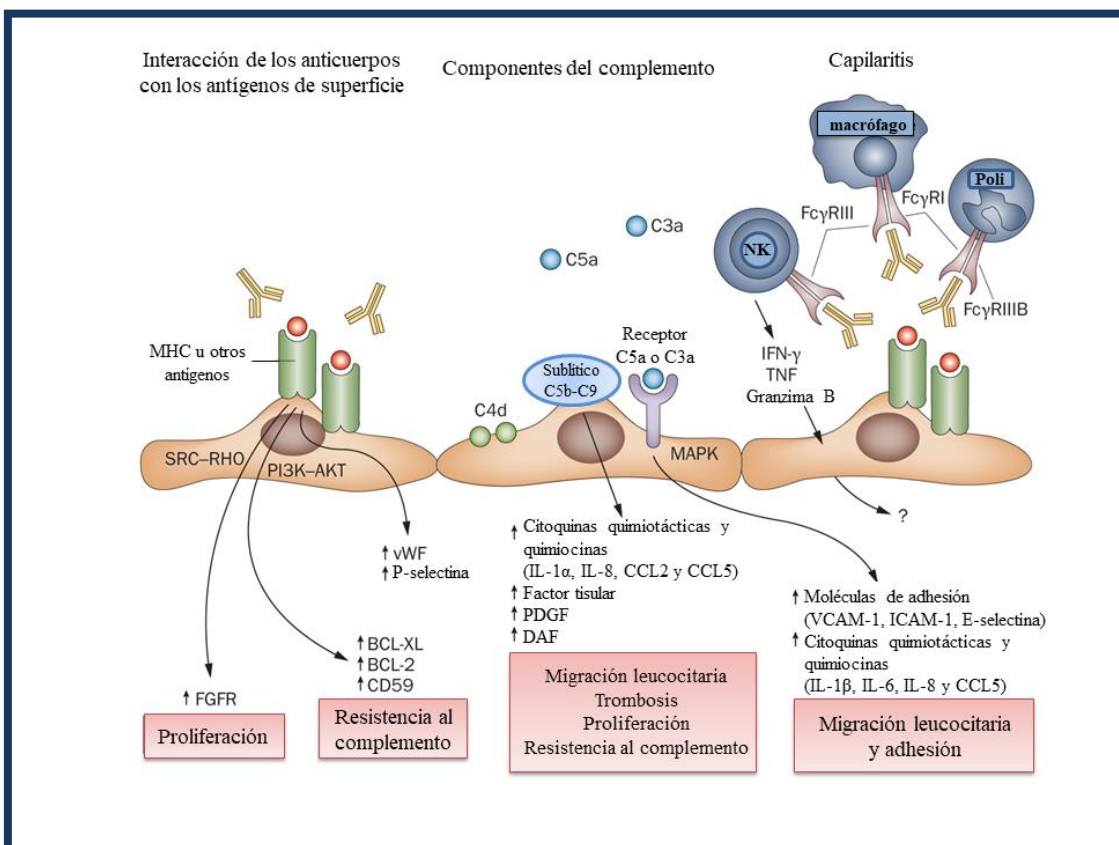


Figura 2. Mecanismos de los DSAs para mediar el daño endotelial (Modificado de 46).

1.1.3 Cuestiones abiertas en el RMA en el TC

En el RMA aún quedan algunos aspectos abiertos:

- Definición y diagnóstico del RMA en el TC,
- Monitorización del RMA,
- Tratamiento del RMA,
- Papel de la genética en el RMA.

El esclarecimiento de estas cuestiones podría mejorar el tratamiento y pronóstico de los casos de RMA (25,50).

1.1.3.1 Problemas de definición y diagnóstico del RMA tras el TC

Una de las principales cuestiones abiertas, es la progresión en la definición y diagnóstico del RMA tras el trasplante, que siguen siendo un tema de debate. Por una parte, el diagnóstico resulta sencillo cuando el paciente presenta disfunción del injerto, con una fracción de eyección reducida ($FE < 30\%$), y sin evidencias de rechazo celular en la biopsia endomiocárdica (BEM), acompañado de estudios inmunopatológicos en el tejido cardíaco que sugieran daño vascular, activación del complemento y presencia de anticuerpos circulantes. El paciente que presente todas estas características, constituiría el caso ideal de RMA (24). Sin embargo, los pacientes no siempre presentan estas características debido a la cantidad de fenotipos de RMA diferentes que dificultan el diagnóstico y la creación de una definición estándar.

En el año 2003, el Instituto Nacional de Salud americano, fijó como objetivo obtener una definición clara y uniforme de RMA (51). En el caso del TC, encontramos dos documentos consenso específicos, llevados a cabo por la Sociedad Internacional de trasplante cardíaco y pulmonar (*International Society of Heart and Lung Transplantation* (ISHLT)) en 2005-2006 y en 2011-2013 (25,51).

La clasificación de 2005-2006 tuvo como objetivo la estandarización del diagnóstico y definición del RMA en el TC creando una clasificación común que estableciese criterios de diagnóstico y tratamiento comunes, al tiempo que reconocía el RMA como una entidad independiente del RC. Como consecuencia, esta clasificación se basaba en la combinación de hallazgos patológicos y clínicos, estableciéndose 4 categorías de criterio diagnóstico: clínico, histopatológico, inmunopatológico y serológico (Tabla 2).

EVIDENCIAS	Hallazgos patológicos requeridos	Opcionales
1. Evidencia clínica de disfunción del injerto		Recomendado combinación con otras evidencias que soporten el diagnóstico de RMA
2. Evidencia histológica de lesión aguda en los capilares (se requieren a y b)	a. Cambios en los capilares endoteliales b. Macrófagos en capilares	c. Neutrófilos en capilares (severo) d. Hemorragia/edema intersticial (severo)
3. Evidencia inmunopatológica para lesión mediada por anticuerpos (requerido a, b o c)	a. IgG, IgM y/o IgA + C3d y/o C4d o C1q por IF b. CD68 para macrófagos en capilares (CD31 o CD34) y/o C4d (intensidad 2-3+) en capilares por IH en parafina c. Fibrina en vesículas (severo)	
4. Evidencia serológica de anti-HLA o anticuerpos anti-donante		Clase anti-HLA I y/o clase II u otros anticuerpos anti-donante en el momento de la biopsia (apoyado por evidencias clínicas y/o hallazgos morfológicos)

Tabla 2. Hallazgos RMA agudo en corazón según la clasificación ISHLT 2005 (25). HLA: antígeno leucocitario humano; IF: inmunofluorescencia; Ig: Inmunoglobulina; IH: inmunohistoquímica; RMA: rechazo mediado por anticuerpos.

A pesar de la publicación de estos criterios, en más del 50% de los centros se seguía realizando el diagnóstico de RMA basándose únicamente en la disfunción del injerto y en la ausencia de infiltrado celular en la BEM (25,30). Por este motivo, en el año 2013, la ISHLT creó una nueva clasificación en la que estableció la BEM para el diagnóstico del RMA tras el TC, usando una combinación de criterios histopatológicos e inmunopatológicos, de forma similar a la utilizada para el diagnóstico del RC (Tabla 3 y Figura 3) (26,52-53). La diferencia más destacable entre las guías de 2005 y 2013, es que la clasificación ISHLT del 2013 para el RMA tras el TC establecía pasar de un criterio diagnóstico, basado en la combinación de hallazgos clínicos y patológicos, a uno basado puramente en hallazgos patológicos (pRMA). Con ello, se intentaba reducir

las variaciones en el diagnóstico del RMA y proporcionar una base para el desarrollo de nuevas terapias estandarizadas (25,51).

Clasificación	Características Histológicas	Características IF	Características IP	Comentarios
pRMA 0	Negativo	Negativo	Negativo	
pRMA 1 (H+)	Hinchazón endotelial capilar o denudación; acumulación intravascular de macrófagos o neutrófilos; edema intersticial	Negativo	Negativo	Puede presentar patrón de tinción ligera para IF e IP sin resultar positiva
pRMA 1 (I+)	Ninguna o solo focales	Tinción intensa difusa o multifocal con C4d y/o C3d en capilares	Tinción intensa difusa o multifocal de capilares con C4d y CD68 si se usa	IF o IP positivas. Hallazgos similares en algunos controles
pRMA 2	Hinchazón endotelial capilar o denudación; acumulación intravascular de macrófagos o neutrófilos; edema intersticial	Tinción intensa difusa o multifocal con C4d y/o C3d en capilares; tinción intensa con HLA de capilares	Tinción intensa difusa o multifocal de capilares con C4d y CD68 si se usa	IF o IP positivas
pRMA 3	Hinchazón endotelial capilar o denudación; acumulación intravascular de macrófagos o neutrófilos; edema intersticial; trombo intravascular; necrosis de miocitos sin rechazo celular; residuos de tejido intersticial	Tinción interrumpida o multifocal con C4d y/o C3d en capilares; tinción débil o interrumpida de HLA; acumulación de fibrina; C3d o C4d de necrosis de miocitos	Tinción intensa difusa o multifocal de capilares con C4d y CD68 si se usa; tinción de CD31 o CD34 en capilares demostrando el daño en las paredes o la pérdida de capilares	Características histológicas difícilmente distinguibles del rechazo celular severo (ISHLT 3R)

Tabla 3. Clasificación ISHLT 2013 para el diagnóstico patológico del RMA tras el TC (26,53).HLA: antígeno leucocitario humano; IF: inmunofluorescencia; IP: inmunoperoxidasa; pRMA: clasificación patológica del rechazo mediado por anticuerpos.

No obstante, tal y como se ve en la columna de comentarios de la Tabla 3, el establecimiento de este tipo de biopsias no soluciona el problema completamente pues sigue sin aunar la evidencia clínica y la patológica. De hecho, recientemente se ha planteado la necesidad de revisar esta clasificación para evaluar críticamente si la misma separa de forma efectiva los diferentes tipos de RMA. Esto plantea nuevamente la necesidad de crear un nuevo criterio clínico-patológico que permita mejorar el diagnóstico y crear un esquema que facilite la comunicación entre patólogos, clínicos e inmunólogos, permitiendo avanzar en la investigación del RMA (26,54-55).

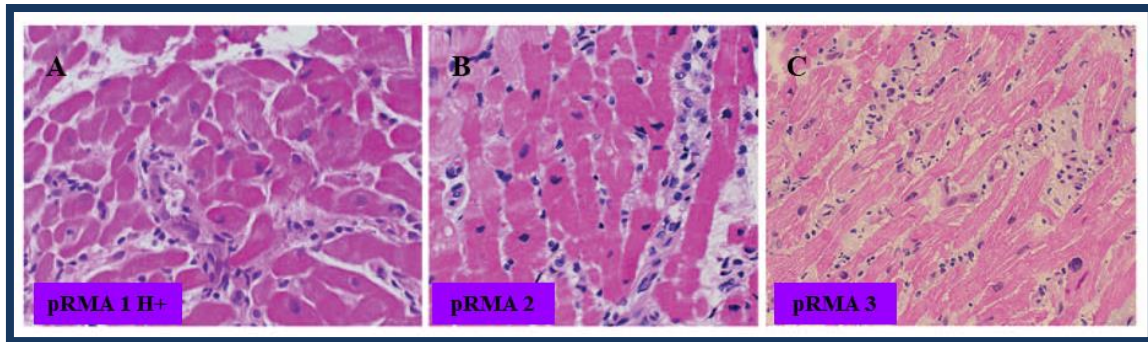


Figura 3. Fotomicrografías del pRMA: **A.** pRMA 1H+; **B.** pRMA 2 y **C.** pRMA 3. En todas las fotografías se observan células endoteliales hinchadas y macrófagos de adherencia. En pRMA3, también hay un importante edema intersticial y restos necróticos, lo que indica que se ha producido un mayor daño en los capilares (26).

1.1.3.2 Técnicas de monitorización del RMA

El seguimiento de los pacientes con RMA en el TC, se ha basado casi exclusivamente en la realización de BEMs para la clasificación pRMA y en la introducción de pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti-HLA (56-57). Dichas pruebas permiten:

- Antes del TC:
 - Tipificación HLA tanto del receptor como de su potencial donante,
 - Cribado e identificación de los anticuerpos HLA en el receptor y la detección de anticuerpos en el receptor que pudiesen ser reactivos frente a los linfocitos de un donante prospectivo (pruebas cruzadas).
- Después del TC:
 - Monitorización del daño en el injerto tras un episodio de RMA y seguimiento de los DSAs.

Sin embargo, el uso de las BEM también presenta ciertas desventajas:

- Es una técnica invasiva,
- Ausencia de protocolos estandarizados para su uso,
- Limitaciones cuantitativas y cualitativas,
- Baja sensibilidad de las biopsias C4d,

- Presencia de RMA subclínico o con ausencia de depósitos de C4d.

No obstante, la limitación más relevante, tanto de la BEM como de la detección de anticuerpos anti-HLA, sigue siendo la ausencia de protocolos estandarizados para monitorizar el RMA. Por ello, se ha establecido la recomendación de realizar BEMs para la evaluación pRMA y pruebas para la detección de anticuerpos circulantes (24,26,56-57):

A. En la BEM:

- Evaluación histológica e inmunopatológica (inmunoperoxidasa (IP)/ inmunofluorescencia (IF)) para C4d a las 2 semanas, a los 90 días y tras 3, 6, 9 y 12 meses post-TC y siempre que exista sospecha clínica de RMA,
- Realización de rutina de C4d tras un resultado positivo hasta negativización.

B. Anticuerpos circulantes: se recomienda hacer pruebas para detectar la presencia de DSA HLA I y II para los mismos intervalos que la BEM y en caso de que estos no sean detectados, se aconseja la búsqueda de anticuerpos no HLA. También se han empezado a implantar estos protocolos para la detección de RMA subclínico pero sus beneficios aún no han sido demostrados.

Cabe destacar que estudios recientes, señalan la importancia de incluir en estos protocolos de seguimiento, datos de los donantes en el momento de la donación, muestras de tejido durante la reperfusión isquémica y alícuotas de suero para DSA y otros marcadores de la activación de la respuesta inmune durante el TC. El análisis conjunto de estos datos permitiría definir los descriptores más importantes para el seguimiento del TC (54,26,58).

Asimismo, se ha empezado a investigar nuevas técnicas que permitan diagnosticar el RMA de una forma más precisa y menos invasiva que las BEMs:

- Búsqueda de nuevos transcritos y señales proteicas, tanto en sangre como en orina, que permitan diferenciar entre RC y RMA de forma precisa. Así, en el estudio de Rabant y colaboradores (59) describieron que, combinando el ratio quimiocina CXCL10:creatinina (CXCL10:Cr) con la monitorización de los DSAs, mejoraba significativamente el diagnóstico del RMA en TR, de forma no invasiva. En otro estudio, Danger y colaboradores (60), emplearon células mononucleares de sangre periférica de pacientes con RMA crónico y examinaron el perfil de expresión para 257 micro-ARNs (miARNs). En dicho estudio describieron que la sobreexpresión del miR-142-5p en los pacientes con RMA crónico podría usarse como marcador para el diagnóstico.
- Uso de *microarrays* para el estudio de niveles de expresión génica en tejido y su potencial para determinar el grado de RMA. En un trabajo reciente, Loupy y colaboradores (61) plantearon que la sobreexpresión de ciertos genes relacionados con las células NK, activación endotelial e interferón- γ puede estar relacionada con la presencia de pRMA y por tanto estos genes podrían actuar como marcadores para el diagnóstico del RMA.
- Detección de Ácido desoxirribonucleico (ADN) libre de células derivadas de donante (*Donor-derived cell-free DNA* (dd-cfDNA)) en la sangre de los receptores, como posible marcador no invasivo para la detección de rechazo, tanto en TR como en TC. Esta técnica se basa en la premisa de que los niveles de dd-cfDNA permiten distinguir entre los pacientes con RC y aquellos con RMA (62-63).

Por tanto, parece clara la necesidad de incorporar nuevas técnicas específicas y protocolos estandarizados para el diagnóstico y monitorización del RMA. Además, el avance en estas cuestiones puede abrir nuevas vías de estudio en la terapia inmunosupresora para el tratamiento de esta patología.

1.1.3.3 Tratamiento del RMA

Los tratamientos para el RMA, van dirigidos principalmente a eliminar los anticuerpos circulantes, a reducir la producción de anticuerpos adicionales y a suprimir las respuestas mediadas por las células B y T. Sin embargo, a pesar de la variedad de tratamientos, resulta complicado realizar ensayos clínicos para evaluar prospectivamente el uso de estas terapias en el RMA. Actualmente no existe ningún tratamiento estándar para el RMA y los protocolos varían entre los diferentes centros (25,57).

Las terapias disponibles actualmente para el tratamiento del RMA son (25,50,57,64,65-66):

- **Corticoesteroides**

Son un potente agente inmunosupresor y antiinflamatorio, capaz de afectar la distribución, las funciones y la cantidad de los leucocitos y células endoteliales.

Los corticoesteroides han sido descritos como uno de los agentes más empleados en el tratamiento del RMA (25,57).

- **Inmunoglobulinas intravenosas (IVIg)**

Las IVIg pueden usarse como tratamiento en pacientes con sensibilización previa al trasplante o bien, en combinación con otros fármacos para el tratamiento del RMA. Actúan neutralizando la actividad de los anticuerpos residuales y de las citoquinas, bloqueando los receptores Fc γ , inhibiendo el

complemento y desregulando la actividad de los receptores de las células B (25,50,57,64).

- Plasmaféresis

El intercambio de plasma consiste en la separación extracorpórea del plasma del resto de componentes celulares de la sangre, mediante el uso de una membrana de filtración o por centrifugación. La plasmaféresis se emplea para la eliminación mecánica de anticuerpos circulantes en pacientes hipersensibilizados a la espera de un TC y como terapia estándar para el RMA (25,50,57,64).

- Fotoféresis

También llamada fotoquimioterapia extracorpórea, es una técnica de aféresis en la cual las células mononucleares de sangre periférica son tratadas con psoraleno y radiación ultravioleta A y reinfundidas posteriormente al paciente. Se desarrolla así una respuesta inmune dirigida contra los linfocitos reinfundidos que sufren procesos de apoptosis y son fagocitados por monocitos activados (25). A pesar de que no existen datos sobre la eficacia de la fotoféresis como tratamiento del RMA, sí se ha empleado como tratamiento de rechazos recurrentes y del rechazo celular agudo (67).

- Globulina antilinfocítica

Son anticuerpos dirigidos contra los linfocitos T. Existen 2 categorías:

1. anticuerpo monoclonal, como el muromonab-CD3 (OKT3),
2. anticuerpo policlonal, conocido comúnmente como inmunoglobulina linfocitaria o ATG, para la cual existen 2 formulaciones:
 - 2.1 globulina de ratón antitimocito (RATG o timoglobulina),
 - 2.2 globulina equina antitimocito (ATGAM).

Aunque la mayoría de los ensayos con globulinas, han sido realizados para el tratamiento del RC, su uso se ha adaptado para el tratamiento del RMA (68-69). Además se usan como tratamiento de pacientes hipersensibilizados, en combinación con otras terapias como IVIg, plasmaféresis o rituximab (25,65-66).

- Anticuerpos monoclonales

Se emplean 2 tipos principales:

1. El rituximab, que es un anticuerpo monoclonal quimérico murino y humano, obtenido por ingeniería genética. Está dirigido contra el marcador CD20, encargado de regular el desarrollo y diferenciación de las células B. El rituximab fue empleado para el tratamiento del linfoma de no Hodgkin y de enfermedades autoinmunes como la miastenia gravis o el tratamiento de desórdenes linfoproliferativos post-trasplante (70). Además, se usa en el tratamiento del RMA, normalmente en combinación con otras terapias, lo que ha dificultado estudiar su eficacia como agente único (25,57,65).
2. El alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD52, común en la superficie de los linfocitos B y T, de la mayoría de los monocitos, macrófagos y células NK. Alemtuzumab actúa deplecionando los linfocitos T y B. Se ha testado su uso en protocolos de desensibilización pero hay pocos estudios acerca de su uso en el tratamiento del rechazo (25,65).

- Bortezomib

Es un inhibidor reversible del proteasoma 26S que reduce los niveles de células plasmáticas, encargadas de la producción de anticuerpos. Bortezomib se emplea en el tratamiento del RMA, en combinación con otras terapias como IVIg, plasmaféresis, rituximab y corticoesteroides (25,57). Sin embargo, no existen

datos sobre el uso de bortezomib como tratamiento único para el RMA en el TC y los existentes en TR han demostrado una eficacia variable (71-73).

- Eculizumab

El mecanismo de acción de eculizumab consiste en el boqueo del sistema del complemento, mediante su unión a C5 inhibiendo su activación. Aunque no se ha indicado el tratamiento del RMA con inhibidores del complemento, estudios con eculizumab, combinado con rituximab, IVIg y plasmaféresis, han reflejado una remisión completa del RMA (25,57,64,74).

- Micofenolato de mofetilo (MMF)

Su uso en el tratamiento del RMA radica en su capacidad para reducir los niveles de anticuerpos circulantes, además de reducir la proliferación de las células B y la producción *de novo* de anticuerpos. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios sistemáticos sobre el uso del MMF en el manejo del RMA (25,66).

- Ciclofosfamida

Es un agente antineoplásico del grupo de las mostazas nitrogenadas que tiene como diana farmacológica las células B. Aunque su uso principal ha sido el tratamiento de diversos tipos de cáncer, en las últimas décadas se ha empleado para reducir el nivel de anticuerpos en los pacientes hipersensibilizados y en combinación con plasmaféresis y rituximab para el tratamiento del RMA (25,75).

- Esplenectomía

Consiste en la extirpación del bazo que alberga células plasmáticas productoras de anticuerpos y células B que contribuyen al RMA. La esplenectomía puede reducir la producción de anticuerpos a niveles que pueden ser manejados

mediante otras terapias. Sin embargo, se ha descrito que este proceso puede acarrear infecciones, por lo que solo se recomienda su uso en pacientes con RMA en los que no ha resultado el uso de otras terapias (25).

La mayoría de las terapias descritas anteriormente para el tratamiento del RMA se emplean, bien de forma simultánea o bien de manera consecutiva, dependiendo de la respuesta del paciente. Dentro de las nuevas terapias para el tratamiento del RMA, se encuentran las derivadas de experiencias previas en el área de oncología y hematología como:

- El carfilzomib es un inhibidor irreversible del proteasoma que se ha empleado en enfermedades hematológicas y recientemente se ha comenzado a testar en el RMA (76).
- Anticuerpos monoclonales, como el belimumab, dirigido directamente contra las células B (77-78).
- Uso de la oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) como una terapia para la mejora de los pacientes con RMA y compromiso hemodinámico (79).

A pesar de la variedad de tratamientos disponibles para el RMA, es importante destacar la necesidad de optimizar el régimen inmunosupresor así como la creación de protocolos estandarizados de actuación, que ayudarían a reducir la variabilidad observada entre los distintos centros. A este respecto, en una encuesta realizada entre 5 centros, el tratamiento más común incluía el uso de corticosteroides, plasmaféresis e IVIg (25). A pesar de la evolución del sistema patológico de clasificación para el RMA, la decisión sobre el tiempo y modo de tratamiento, dada las múltiples combinaciones potenciales de hallazgos histopatológicos, manifestaciones clínicas y cuantificación de anticuerpos, aún no se ha resuelto. Todo esto sumado a la falta de un protocolo

estandarizado de actuación y a que la respuesta inmune sigue siendo una importante barrera, hace que los tratamientos actuales produzcan resultados variables y en algunos casos sean ineficaces. De ahí, la importancia de ampliar el conocimiento sobre las vías moleculares implicadas en el RMA (25,57).

1.1.3.4 Genética del RMA

La introducción de las pruebas genéticas de histocompatibilidad ha contribuido de manera fundamental en la mejora de la tasa de supervivencia y éxito de los trasplantes. Por este motivo, se busca tener tantas similitudes genéticas o compatibilidades, entre donante y receptor como sea posible. Como principal exponente de la necesidad de compatibilidad, tenemos los trasplantes de médula ósea en el cual es fundamental para el éxito del trasplante, que tanto el donante, como el receptor, sean genéticamente idénticos para los *loci* HLA, razón por la cual en este tipo de trasplantes se suelen buscar primeramente donantes entre los familiares de primer grado (80-81).

Para testar la compatibilidad genética se emplean técnicas que permiten reducir el riesgo de desarrollar cualquier tipo de rechazo del injerto (82-84):

- ❖ Tipificación de los *loci* de grupo sanguíneo (ABO) para donante y receptor,
- ❖ Tipificación de los *loci* HLA,
- ❖ Monitorización de anticuerpos circulantes preformados,
- ❖ Pruebas cruzadas de compatibilidad.

En los últimos años, también se han relacionado otros genes no HLA, como *MICA* (*MHC class I polypeptide-related sequence A*) y *KIRs* (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), con procesos de histocompatibilidad tras el trasplante. Estos genes se expresan intracelularmente, en la superficie de las células endoteliales y en las células

apoptóticas y son capaces de participar en la activación de la vía del complemento y la interacción/activación de leucocitos (34,85). Los anticuerpos no-HLA junto con DSAs, crean un efecto sinérgico en el injerto que se ha relacionado con la presencia de RMA en el TC (86-87).

Cabe destacar que tanto los genes del sistema HLA, de tipo I (A, B y C) y II (DP, DQ y DR); así como los genes *MICA* y *KIR*, son altamente polimórficos y de ahí la importancia de estudiar la compatibilidad, es decir, las semejanzas alélicas existente entre donante y receptor para estos genes. Para determinar el grado de compatibilidad existente entre donante y receptor, se han desarrollado durante años diferentes pruebas serológicas (test de citotoxicidad dependiente de complemento, ELISAs, Luminex y citometría de flujo). Además, estas pruebas permiten estudiar la presencia de DSAs que pudiesen estar presentes como consecuencia de una sensibilización previa del receptor (24,83).

La introducción de técnicas moleculares, como la secuenciación masiva o *Next Generation Sequencing* (NGS), pueden ayudar en la investigación de diferentes patologías asociadas al trasplante como el RMA, puesto que permite la tipificación de multitud de genes simultáneamente de forma rápida y precisa. Así, se están llevando a cabo estudios que analizan la importancia de la presencia de polimorfismos (*Single nucleotide polymorphisms* (SNPs)), en donante y receptor, en genes relacionados con procesos inmunológicos (genes de la vía del complemento, citoquinas, células T y B, etc) y su relación con el RC, la supervivencia o la progresión del injerto tras el trasplante. Otros estudios se centran en la relación entre la presencia de SNPs y su efecto sobre la expresión de proteínas que intervienen en el transporte, metabolismo o mecanismo de acción de fármacos empleados tras el trasplante (88-93).

En relación con el RMA, parece importante el estudio de los genes implicados en la cascada del complemento y de la biología de las células B como responsables principales del fallo del injerto y producción de anticuerpos, tal y como hemos visto en el capítulo 1.1.2. A día de hoy, no hay estudios sistemáticos sobre el papel de las variantes genéticas en los genes de ambas vías y como podrían influir en el riesgo de desarrollar RMA.

1.2. Papel del sistema de complemento en el RMA

El importante papel que el sistema del complemento tiene en el RMA se pone de manifiesto debido a su acción en el daño del injerto. La presencia de depósitos de complemento en los capilares, constituyó la primera evidencia del RMA como entidad independiente inducida por la inmunidad humoral. Debido a esto, se ha establecido la presencia de depósitos de moléculas del complemento, como condición indispensable para el diagnóstico del RMA (25,94).

1.2.1 Fisiología del complemento

El complemento es un sistema funcional de receptores, reguladores y moléculas efectoras que constituye un potente amplificador de la respuesta inmune innata. El sistema del complemento, es capaz de cooperar con otros componentes del sistema inmune actuando como puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, mejorando la respuesta de los linfocitos B y aumentando su capacidad de memoria (38). En el sistema del complemento participan más de 50 genes que codifican alrededor de 40 proteínas, la mayoría proteasas, que crean una respuesta en cascada cuando se activan, donde cada proteasa activa la siguiente de la cadena (Figura 4) (39,63,95).

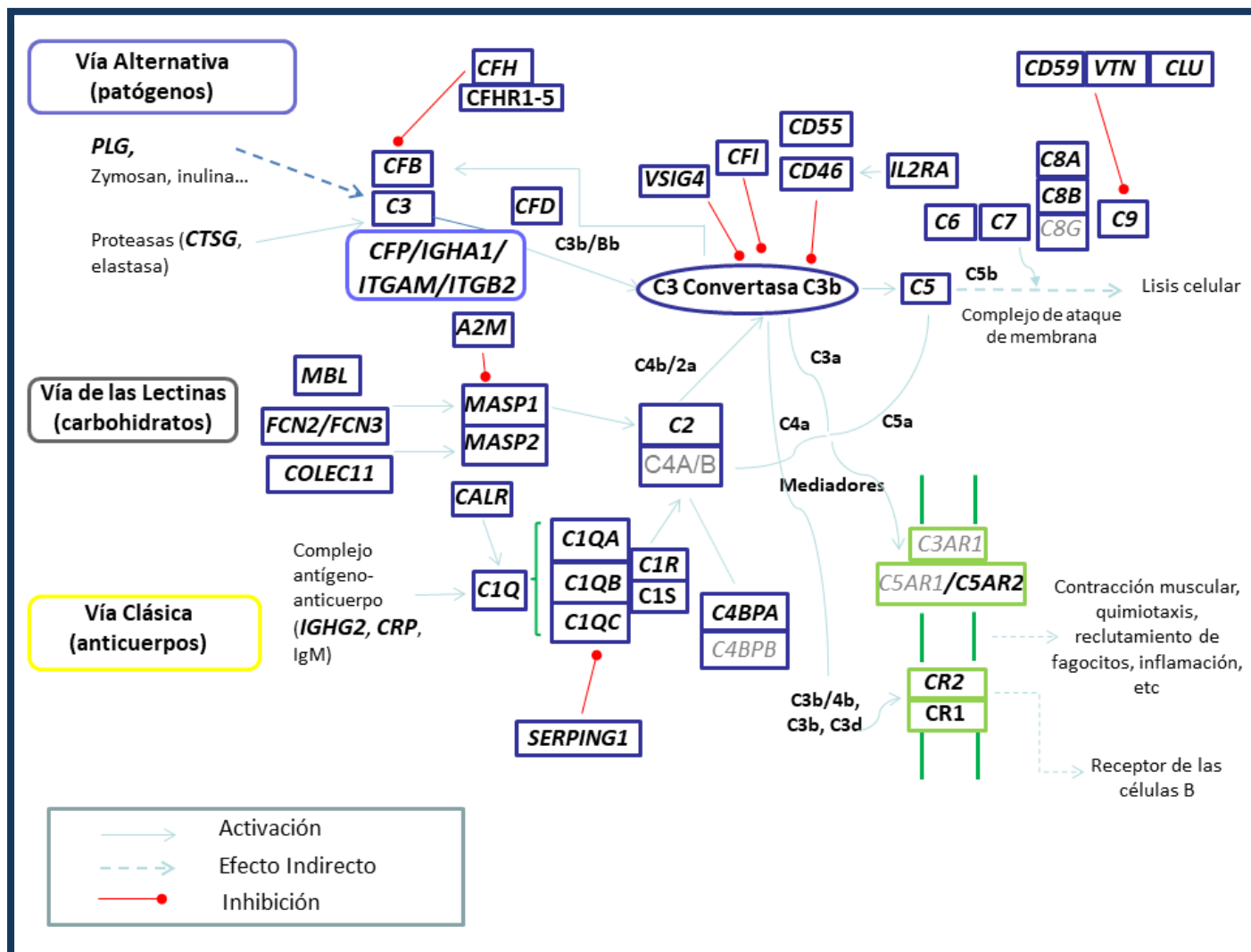


Figura 4. Sistema del complemento (Modificación de "Coagulation and complement cascades" mapa de la enciclopedia Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (map04610)).

A. Vías de Activación del complemento

La activación del sistema del complemento se puede producir por tres vías principales: la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas. Todas las vías, consisten en una serie de reacciones que finalmente generan las convertasas C3 y C5 que inician la vía final del complemento (63,96).

A.1 Vía clásica

La vía clásica del complemento puede ser activada por cualquier molécula que sea reconocida por el complejo C1q. Este complejo está codificado por los genes *CIQA*, *CIQB* y *CIQC* que son capaces de unirse a diferentes ligandos de forma independiente (97). Los cambios producidos en C1q tras la unión al complejo antígeno-anticuerpo (Complejo Ag-Ac), produce la activación de las proteasas C1r y C1s formando el complejo C1.

El complejo enzimático C1 tiene capacidad para escindir las moléculas de C4 y C2, formando el complejo proteasa C4b2a que tiene actividad de C3 convertasa, requerida para escindir C3. La activación de un único complejo C1 puede producir miles de moléculas de C3 que al escindirse forman diversas subunidades. La subunidad C3b es capaz de unirse al complejo C4b2a para formar la C5 convertasa e iniciar la vía final del complemento (Figura 5) (38-39).

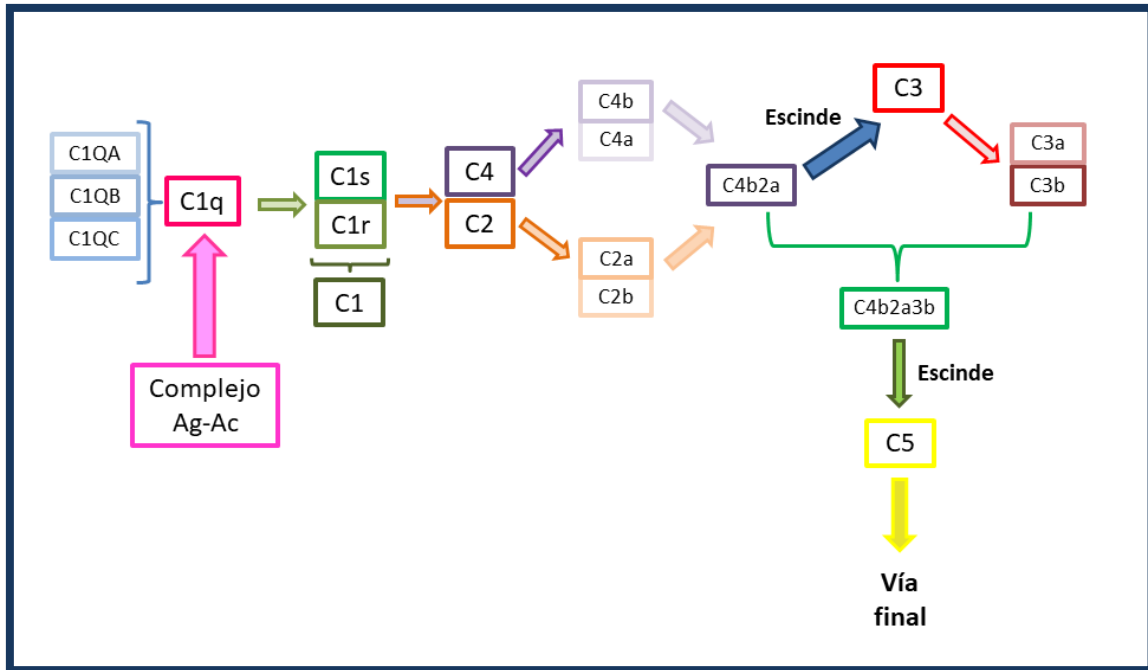


Figura 5. Vía clásica del complemento.

A.2 Vía de las lectinas

La activación del complemento por la vía de las lectinas, se puede llevar a cabo bien por las colectinas CL-L1, CL-K1 y la lectina de unión a manosa (MBL), o por las ficolinas 1, 2 y 3, de forma similar a C1q (39). Tanto MBL, que es el miembro mejor caracterizado de la familia de las colectinas, codificada por el gen *MBL2*, como las ficolinas, son capaces de unirse a estructuras de carbohidratos, lo que permite el reconocimiento de una gran variedad de bacterias, virus y levaduras (98-99). La vía de las lectinas también puede ser activada por moléculas que se encuentran en la superficie de las células y que pueden ser reconocidas por patrones de reconocimiento al ser liberados al medio debido a que la célula ha sido necrosada (39).

En el caso de MBL, cuando forma un complejo con la sustancia reconocida, induce la actividad proteolítica de las serinoproteasas asociadas, MASP-1 y MASP-2, que desde un punto de vista estructural se asemejan a C1r y C1s de la vía clásica. Estas serinoproteasas participan en la adhesión enzimática del resto de componentes de forma análoga a la vía

clásica y convergen en la vía final (Figura 6) (38,96). Recientemente se ha visto que la vía de las lectinas puede influir en la activación de la vía alternativa; para ello las proteasas MASPs inducen al pro-CFD a CFD (factor D), que es capaz de activar entonces la vía alternativa (96).

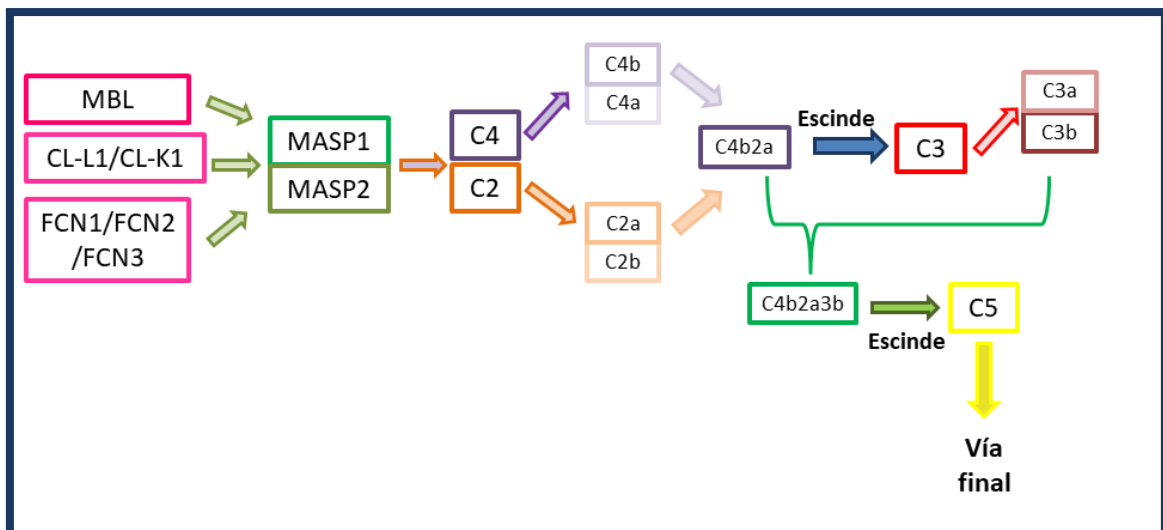


Figura 6. Vía de las lectinas de activación del complemento.

A.3 Vía alternativa

La principal característica de la vía alternativa es la capacidad para activar el complemento en ausencia de anticuerpos, amplificando la respuesta en presencia de sustancias extrañas presentes en la superficie celular. En condiciones normales, un enlace tioléster interno en C3 se activa de forma espontánea a muy baja velocidad para formar el compuesto intermediario reactivo C3b o bien una molécula de función similar denominada C3i o C3(H₂O). En presencia de Mg²⁺, estas moléculas pueden formar complejos con el factor B (CFB) que posee características similares a las de C2. Esta unión forma el complejo C3FB que a su vez puede ser escindido por CFD, para formar el complejo C3bBb que tiene actividad enzimática, conformando una nueva C3 convertasa que es capaz de dividir C3 en C3a y C3b (38). Sin embargo, es importante destacar que la activación espontánea de C3 es un proceso controlado por proteínas

reguladoras, puesto que se trata de un sistema de retroalimentación positivo que podría salirse de control rápidamente. A este respecto, la proteína conocida como properdina o factor P (CFP), que es producida por los neutrófilos activados y es el único regulador positivo conocido en la activación del complemento, tiene como papel principal estabilizar la convertasa C3bBb fijada, mediante la formación del complejo C3bBbP, evitando así su degradación y acelerando la deposición de C3b sobre las superficies diana. (38,100). Además, se ha visto que CFP es capaz de seguir atrayendo moléculas de C3b y CFB aun cuando este ya unida a la superficie diana con C3b. La formación del compuesto C3bBbC3b, conocida como convertasa C5, iniciará la vía final del complemento (Figura 7) (100).

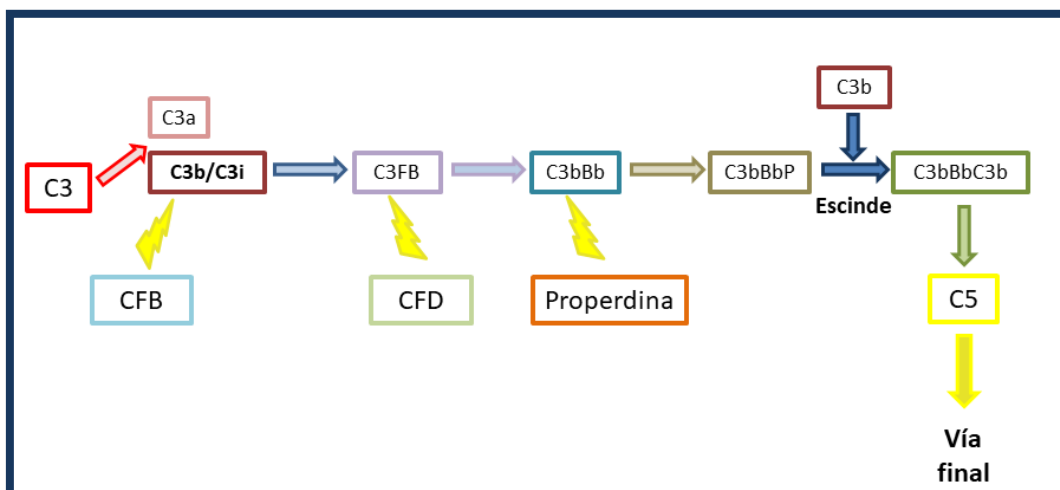


Figura 7. Vía alternativa de activación del complemento.

B. Vía final del complemento

Esta vía, también llamada vía lítica del complemento, se inicia con la formación y activación de las convertasas C3 y C5 por cualquiera de las tres vías de activación antes comentadas. La convertasa C5 escinde proteolíticamente a C5 en dos fragmentos, uno pequeño C5a y otro, de mayor tamaño, C5b. A continuación se produce la adherencia secuencial de C6 y C7 a C5b, formando un complejo con un sitio de unión a membrana transitorio y afinidad por C8. Este nuevo complejo, se sitúa

en la superficie de la membrana y dirige cambios conformacionales en C9, que se transforma en una molécula anfipática capaz de insertarse en la bicapa lipídica y polimerizarse para constituir el complejo de ataque de membrana (*Membrane Attack Complex, MAC*) (38,96). Una vez formado MAC, se crea un canal transmembrana que es totalmente permeable a los electrolitos y al agua y en el que, debido a la elevada presión osmótica, se produce un flujo neto de iones Na^+ y agua hacia el interior, lo que a menudo produce la lisis celular (Figura 8) (38-39).

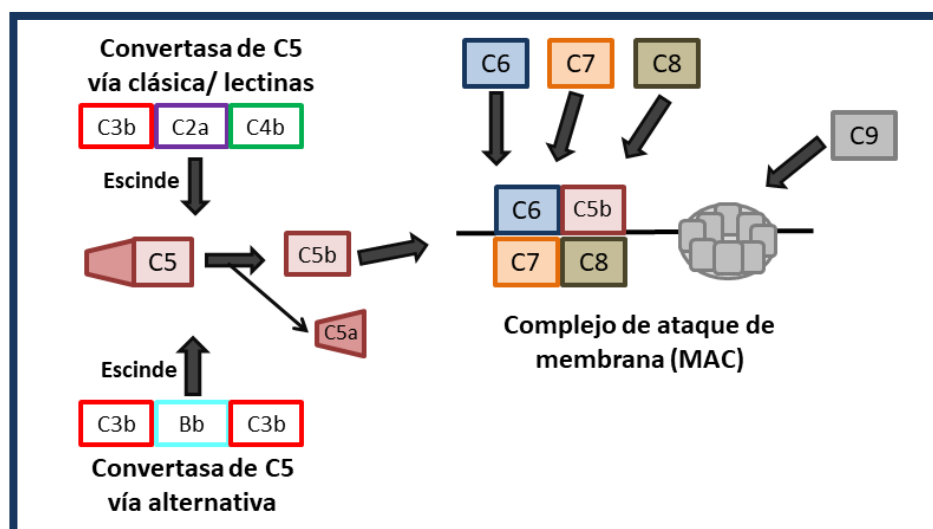


Figura 8. Vía final del complemento (Modificado de 101).

1.2.2 Regulación del complemento

Es esencial una correcta regulación del complemento puesto que, su activación incorrecta puede producir daños en las células sanas del receptor (39,63,96). Algunos de los reguladores tienen la capacidad de inhibir directamente la función de las convertasas, mientras otros actúan directamente o como cofactores para la degradación de proteínas específicas (38-39,102).

- El inhibidor de unión a membrana DAF o CD55, produce la disociación de las moléculas Bb y C2a de la convertasa C3, impidiendo además que esta se reensamble nuevamente.

- El receptor de complemento CR1/CD35, es capaz de influir en la activación del complemento por las 3 vías mediante su unión a C3b y C4b. Además, actúa como cofactor para el factor I (CFI) que participa en la degradación de estas moléculas.
- La proteína CD46 actúa como cofactor de CFI para la degradación de C3b y C4b.
- La proteína C4bp, puede actuar como cofactor de CFI para la degradación de C4b, jugando un papel tanto en la vía clásica, como en la de las lectinas.
- El inhibidor C1-Inh produce la disociación de C1q, evitando así la excesiva activación de la vía clásica.
- Las proteínas CD59, VTN y CLU actúan como inhibidores impidiendo la formación del MAC mediante su unión a los factores C8 y C9 de la vía final del complemento.

Por otra parte, encontramos reguladores dirigidos de forma específica hacia los productos de la vía alternativa debido a que esta se activa de manera espontánea y por tanto resulta la más peligrosa para las células del receptor (38-39,100).

- El factor H (CFH) es capaz de desplazar a CFB con relativa facilidad, formando el complejo C3bH que puede ser inactivado por CFI. El iC3b inactivado carece de actividad biológica por lo que puede ser degradado por la acción de las proteasas presentes en los líquidos corporales.
- La proteína cofactor de membrana MCP/CD46, puede actuar como cofactor para CFI, participando en la escisión proteolítica de C3b y C4b.

1.2.3 Variantes genéticas en el complemento y el trasplante

Las proteínas del complemento, así como sus reguladores, pueden jugar un importante papel en enfermedades autoinmunes (95-96,102), así como en la respuesta inmune post-trasplante y por ello, variantes en estos genes pueden influir en dicha respuesta post-

trasplante. En la literatura se pueden encontrar distintos estudios que han descrito la presencia de variantes relacionadas con diversas patologías post-trasplante.

1.2.3.1 Variantes genéticas del complemento en patologías post-trasplante

En la literatura se ha descrito, en al menos 15 estudios, que la presencia de polimorfismos en los genes del complemento, puede influir en la progresión del trasplante (Tabla 4). Es importante resaltar que 11 de los 15 estudios recogidos en la Tabla 4 muestran una asociación entre la presencia de polimorfismos en los genes del complemento y la progresión de patologías post-trasplante como el síndrome urémico hemolítico (SUH) (103-105), el RC (106-109), la progresión del injerto (110-113) y la supervivencia (114-115). Además, también llama la atención que 12 de los 15 estudios se han llevado a cabo en riñón y solo el de Keslar y colaboradores (106) se llevó a cabo en TC y en él se medían los niveles de expresión de proteínas del complemento y su relación con el grado de RC. En este caso, se encontró que las biopsias de grado 3 de pacientes con RC, presentaban mayor cantidad de transcritos de CFB, C3, C5, interferón- γ , PRF1, GZMA y CFP lo cual sugería que el perfil de expresión de estos genes podría emplearse como herramienta para el diagnóstico del RC. Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de la presencia de polimorfismos en los genes del complemento, en pacientes con trasplante y su utilidad para estratificar el riesgo de que estos pacientes desarrollen diversas patologías post-trasplante. Sin embargo, cabe destacar el pequeño número de genes estudiados, entre 1-7, en relación con estas patologías por lo que, teniendo en cuenta que en el complemento participan más de 40 proteínas, podría quedar información relevante sin analizar.

Autores	Órgano trasplantado	D y R	Genes estudiados (polimorfismos)	Nº. De genes	Nº. De pacientes	Hallazgos clínicos	Conclusiones
Caprioli et al 2003 (103)	Riñón	R	<i>CFH</i> (17 polimorfismos conocidos)	1	101	SUH	Polimorfismos en <i>CFH</i> influencia en SUH
Brown et al 2006 (110)	Riñón	parejas D_R	<i>C3</i> (rs2230199)	1	501	Progresión del injerto	Sin asociación
Keslar et al 2008 (106)	Corazón	R	Niveles de expresión de <i>CFB</i> , <i>C3</i> , <i>C5</i> , interferón- γ , <i>PRF1</i> , <i>GZMA</i> y <i>CFP</i>	7	71	RC	Biopsias grado 3 de RC con más transcritos de <i>CFB</i> , <i>C3</i> , <i>C5</i> , interferón- γ , <i>PRF1</i> , <i>GZMA</i> y <i>CFP</i>
Varagunam et al 2009 (111)	Riñón	parejas D_R	<i>C3</i> (rs2230199)	1	1.147	Progresión del injerto	Discrepancias D_R: peor pronóstico.
Cervera et al 2009 (116)	Hígado	D	<i>MBL2</i> (Promotor y rs5030737, rs1800450 y rs1800451)	1	95	Infecciones, RC, y supervivencia	D con rs5030737, rs1800450, y rs1800451: peor pronóstico.
Dhillon et al 2010 (112)	Hígado	parejas D_R	<i>C3</i> (rs2230199)	1	296	Progresión del injerto	Sin asociación
Jeong et al 2011 (113)	Riñón	parejas D_R	<i>C5</i> (rs2159776, rs17611, rs25681 y rs2241004 (GGCG haplotipo)) y <i>C5aR</i> (rs10404456)	2	191	Progresión del injerto	Menor función renal con GGCG en R&D. Sin asociación con <i>C5aR</i>
Wahrmann et al 2011 (114)	Riñón	parejas D_R	<i>C4</i> (VNCs)	1	1.969	Supervivencia	Sin asociación
Bazyar et al 2012 (117)	Riñón	parejas D_R	<i>C3</i> (rs2230199)	1	100	RC	Sin asociación
Damman et al 2012 (107)	Riñón	parejas D_R	<i>C3</i> (rs2230199)	1	1.265	DP, RC FRI, supervivencia y Progresión del injerto	Polimorfismos en D asociados con DP
Damman et al 2012 (108)	Riñón	parejas D_R	12 polimorfismos funcionales en <i>MBL2</i> , <i>FCN2</i> y <i>MASP2</i>	3	1.271	DP, FRI, RC, supervivencia	Sin asociación
Bresin et al 2013 (104)	Riñón	R	<i>CFH</i> , <i>MCP</i> , <i>C3</i> , <i>CFB</i> y <i>CFI</i> (búsqueda de mutaciones)	5	795	SUH	Presencia de varias mutaciones conjuntas en <i>CFH</i> y/o <i>MCP</i> aumentan el riesgo de SUH
Le Quintrec et al 2013 (118)	Riñón	R	Mutaciones en <i>CFH</i> , <i>CFI</i> , <i>MCP</i> , <i>C3</i> y <i>CFB</i> . <i>CFHR1/CFHR3</i> (rs7542235) y haplotipo en <i>CFH</i> (rs800292, rs1061170, rs3753396 y rs1065489)	7	57	SUH	Mutaciones en <i>CFH</i> , <i>C3</i> o <i>CFB</i> : riesgo alto SUH Mutaciones en <i>CFI</i> y/o <i>MCP</i> y haplotipo <i>CFH</i> : riesgo moderado SUH Sin mutaciones en <i>CFH</i> ni haplotipo: bajo riesgo SUH
Ranghino et al 2013 (105)	Riñón	R	<i>CFI</i> , <i>CFH</i> y <i>MCP</i> (búsqueda de mutaciones)	3	1	SUH	Mutación p.Arg50Pro en <i>CFI</i> no asociada con desarrollo de SUH de forma temprana
Budding et al 2015 (115)	Pulmón	D	<i>CD59</i> (promotor)	1	137	Supervivencia	Polimorfismos en D: disminución supervivencia a largo plazo
Park et al 2016 (109)	Riñón	R	<i>CD46</i> (promotor)	1	334	RC, pérdida del injerto	Polimorfismo rs2796267, en la región promotora, aumenta el riesgo de RC

Tabla 4. Variantes genéticas en los genes del complemento, asociadas con patologías post-trasplante. D: Donante; DP: Disfunción primaria; FRI: Función retardada del injerto; R: Receptor; RC: Rechazo celular; rs: *reference_SNP*; SUH: síndrome urémico hemolítico; VNCs: Variación en el número de copias.

1.3. Papel de las células B en el RMA

Las células B juegan un importante papel en el RMA debido a su función como células presentadoras de antígenos, productoras de anticuerpos y citoquinas. Son el componente principal del brazo humoral en la respuesta inmune adaptativa (38,119). Estudios recientes han establecido que los DSAs, producidos por las células B, son la causa principal del rechazo del injerto tras el TC (57,65,119-124).

En el RMA, los antígenos son presentados a las células T *helper* (Th) por las células presentadoras de antígenos (CPAs), tanto de donante como de receptor, lo que a su vez desencadena la activación y diferenciación de las células B mediante citoquinas y otros factores coestimuladores (38,125).

1.3.1 Diferenciación y activación de las células B

El proceso de diferenciación y activación de las células B, tiene como finalidad su diferenciación en células de memoria y en células plasmáticas, productoras de anticuerpos. Los anticuerpos actúan como elementos centrales de la inmunidad humoral protegiendo al individuo de un gran número de amenazas externas. Por tanto, los defectos en el desarrollo de las células B, en su selección o funciones, pueden tener como consecuencia la aparición de enfermedades autoinmunes, cáncer o inmunodeficiencias; y su activación resulta especialmente importante en los trasplantes y en el RMA (25,38,124,126).

La ontogenia de las células B, se puede dividir en dos fases principales que finalmente darán lugar a la diferenciación de células de memoria y células plasmáticas, productoras de anticuerpos (Figura 9):

A. Fase independiente de antígeno

En humanos, al igual que en todos los mamíferos, las células B se desarrollan en la médula ósea a partir de precursores de células hematopoyéticas. Los primeros estadios en el desarrollo de las células B en la médula ósea, se estructuran principalmente alrededor del reordenamiento génico de los segmentos de las inmunoglobulinas (38,126). El reordenamiento génico de los segmentos VH, DH y JH de la cadena pesada (cadena-H), junto con el reordenamiento de los segmentos génicos VL-JL de la cadena ligera (cadena-L), son los responsables de generar el repertorio de células B que expresan anticuerpos que son capaces de reconocer más de $5 \cdot 10^3$ antígenos diferentes.

Según el proceso de reordenamiento génico de las cadenas H y L, se definen 3 estados:

- El primer estado, se produce en las células pro-B y consiste en el reordenamiento de los segmentos D y J de la cadena-H, seguido de un segundo reordenamiento en el cual se une el segmento V al ya reordenado segmento DJ. Debido a que es un proceso aleatorio, la combinación de DJ en un alelo es distinta a la producida en el otro alelo (38,126).
- El segundo estado, conocido como estado pre-B, se inicia con el reordenamiento funcional de los segmentos génicos de la cadena-H- μ . En humanos, durante el estado de célula pre-B, se producen entre 1 y 2 divisiones celulares y el reordenamiento de segmentos génicos que codifican para las cadenas κ y λ . La expresión de la cadena μ reordenada, la cadena L sustituta (formada en humanos por λ -like y V-preB), y la señal de los componentes transductores Ig- α (CD79a) e Ig- β (CD79b), permite la formación del complejo receptor de antígenos, pre-B (pre-BCR), que se expresa en la superficie celular. Las señales a partir del pre-BCR son críticas para continuar con la diferenciación de las células B (127). El

reordenamiento génico de los locus $Ig\kappa$ o $Ig\lambda$ de la cadena L, provoca la expresión del receptor de células B (*B-cell receptor*, BCR) completo y determina el estado de célula B inmadura (38,127).

- El tercer estado se inicia con la combinación de las cadenas κ , λ y μ , dando lugar a la síntesis de la inmunoglobulina M (IgM), que se expresa en la superficie celular como BCR. La IgD de superficie posee una secuencia VDJ idéntica a la cadena pesada de IgM producida por corte y empalme alternativo del transcrito de ARN de la cadena-H. La célula B (IgM+IgD+) se conoce como célula B *naïve* que puede interactuar con el antígeno. (38,124,126-127).

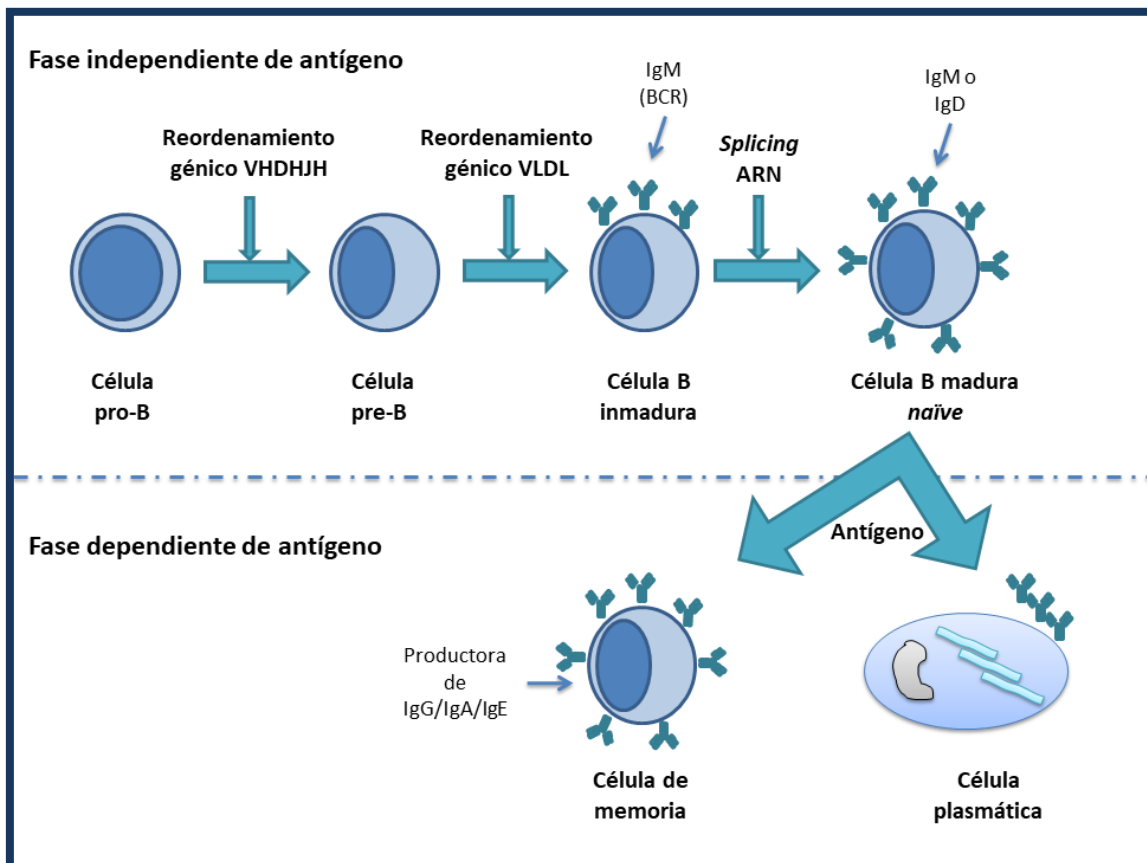


Figura 9. Diferenciación y activación de las células B.

B. Fase dependiente de antígeno

Cuando un determinado antígeno entra en contacto con el BCR, se inicia una cascada de señalización que produce su internalización para ser reconocido y procesado por las moléculas del CMH de tipo II (CMHII) que posteriormente lo presentan a las células T CD4 o células Th, que son necesarias para la activación completa de la célula B (124). Este proceso también requiere de la interacción coestimuladora del complejo CD40L-CD40, lo cual conduce a la sobreexpresión del receptor de superficie para IL-4 e IL-13. La liberación, en grandes cantidades, de estas citosinas por las células Th, impulsa la expansión clonal de la población de células B activadas. (38).

A continuación las células B activadas, experimentan procesos de cambio de clase y rondas de proliferación e hipermutación somática para generar BCRs que presenten una mayor afinidad por el antígeno. Los dos tipos celulares que emergen, como resultado de este proceso, son las células B de memoria y las células plasmáticas productoras de anticuerpos (124).

1.3.2 Regulación de la diferenciación de las células B

Debido a la enorme especificidad de anticuerpos, es necesario que existan diversos puntos de control de los niveles de auto reactividad de las células B durante su desarrollo (Figura 10) (38,126).

- ❖ El desarrollo de las células hematopoyéticas a lo largo del linaje de las células B requiere de la expresión del factor de transcripción E2A, del factor de células B tempranas (*Early B-cell factor*, EBF) y la interleucina 7 (IL7). La ausencia de cualquiera de estos factores impide que las células pro-B progresen al estado de célula pre-B.

- ❖ La expresión del gen *Pax5* que codifica la proteína activadora específica de las células B (*B cell specific activator protein*, BSAP) y activa genes específicos, como *CD79A*, *CD19* y *BLNK*, es necesario para que la célula B pase del estado pre-B al estado de célula B inmadura.
- ❖ Durante el reordenamiento génico de la cadena pesada H en el caso de producirse un reordenamiento “improductivo”, es decir, que los segmentos adyacentes se unan en un marco de lectura incorrecto o de tal modo que se genere un codón de terminación en dirección 3’ a partir del punto de empalme, se produce un segundo reordenamiento V-DJ sobre el locus de la cadena-H hermana. En caso de que este segundo reordenamiento tampoco sea productivo, la célula pre-B es eliminada.
- ❖ En el proceso de formación del receptor pre-BCR, se produce una señalización a través de $Ig\alpha/\beta$, que causa exclusión alélica, por la cual se suprime cualquier reordenamiento posterior de los genes de la cadena-H en la cromátide hermana. Finalmente, una vez formada la molécula IgM de superficie, esta impide una nueva recombinación de genes homólogos mediante exclusión alélica de todos los genes no reordenados de la cadena-L.
- ❖ Las señales iniciadas en el BCR regulan los eventos a nivel transcripcional y post-transcripcional, lo que finalmente determinará si la célula B vive, muere, prolifera o se diferencia.

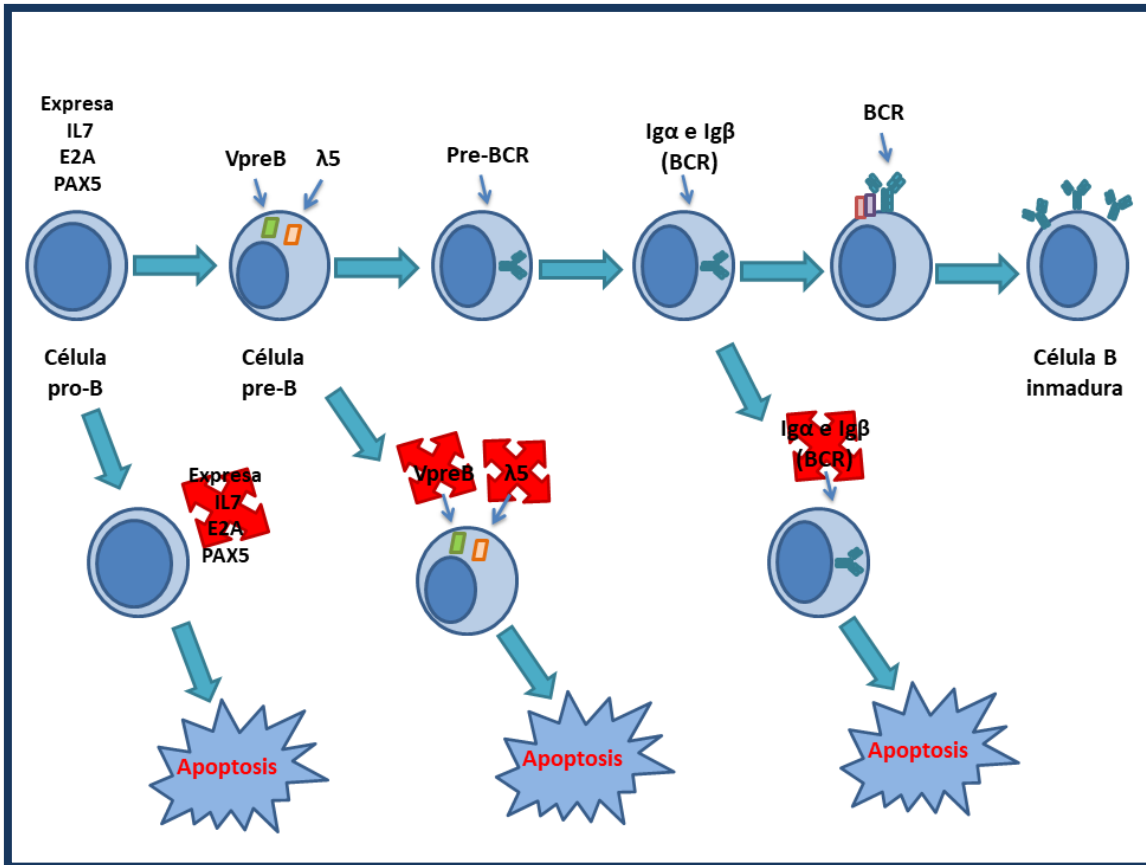


Figura 10. Regulación del proceso de diferenciación de las células B.

1.3.3 Variantes genéticas en las células B

Debido al importante papel de los linfocitos B en la inmunidad adaptativa y, por tanto, en la progresión de diversas enfermedades autoinmunes y post-trasplante, se han realizado diversos estudios sobre el papel que los polimorfismos presentes en genes relacionados con la biología de las células B, podrían tener en enfermedades tales como:

- la artritis reumatoide (128),
- el síndrome Hiper-IgM (129),
- la hepatitis B (130),
- diferentes tipos de inmunodeficiencias (131-132),
- cáncer (133-135).

1.3.3.1 Variantes genéticas de las células B en patologías post-trasplante

Diversos estudios han descrito el papel que juegan las células B en la progresión del rechazo post-trasplante (121,123,125,136-137). A este respecto, se han llevado a cabo al menos 17 estudios, en los últimos 18 años, sobre la relación existente entre la presencia de SNPs en los genes relacionados con la biología de las células B y la aparición de patologías tras el trasplante (Tabla 5). Cabe destacar que en todos estos estudios se encontró algún tipo de asociación entre la presencia de SNPs en los genes analizados y diferentes patologías tales como: la resistencia a esteroides (138), el RC (88,139-147), la supervivencia (139,148-149), el fallo crónico del injerto (150), la enfermedad del injerto contra huésped (EICH) (151) y las infecciones por el virus de la hepatitis B y C (146,152-153). Además, aunque la mayoría de estos estudios fueron llevados a cabo en riñón, 6 de los 17 estudios se realizaron en TC. De ellos, 3 encontraron asociación entre la presencia de polimorfismos y el riesgo de presentar RC (140, 142, 145); en 2 de ellos se señalaba una asociación entre la presencia de polimorfismos en el gen *TGFβ1* y el fallo crónico del injerto y un mayor riesgo de vasculopatía (143,150). Mientras que, en el estudio de Fildes y colaboradores (148) se describió la presencia del polimorfismo rs333, en el gen *CCR5* en donantes y su relación con una menor supervivencia tras el TC. El hecho de que, en todos los casos hubiese SNPs relacionados con la patología estudiada, confirma la importancia de las células B, y de los polimorfismos presentes en los genes relacionados con su biología, en la progresión de los trasplantes.

Autores	Órgano trasplantado	D y R	Genes estudiados (polimorfismos)	Nº. De genes	Nº. De pacientes	Hallazgos clínicos	Conclusiones
Sankaran et al 1999 (138)	Riñón	D y R	<i>TNFα</i> (promotor) e <i>IL10</i> (promotor)	2	115	REs y RS	Polimorfismos en R <i>TNFα</i> y <i>IL10</i> determinantes en REs y RS
Asderakis et al 2001 (139)	Riñón	R	<i>IFN-γ</i> (repetición CA intrón 1) e <i>IL10</i> (5'UTR)	2	88	Supervivencia y RC	<i>IFN-γ</i> con repeticiones CA: más RC Polimorfismo en <i>IL10</i> : Efecto protector
Awad et al 2001 (140)	Corazón pediátrico	D y R	<i>TNFα</i> (promotor), <i>IL10</i> (promotor), <i>IL6</i> (promotor), <i>TGFβ1</i> (rs1800470 y rs1800471) e <i>IFNγ</i> (rs2430561)	5	93 R y 29 D	RC	Polimorfismos en R asociado con RC
Holweg et al 2001 (150)	Corazón	D y R	<i>TGFβ1</i> (rs1800470 y rs1800471)	1	252 R y 213 D	FCI	Polimorfismos en R asociados con FCI
Poole et al 2001 (141)	Riñón	D_R parejas	<i>IL10</i> (promotor) e <i>IL4</i> (promotor)	2	120	RC y función del injerto	Genotipos de D y R en <i>IL4</i> e <i>IL10</i> influencia en RC y función del injerto
Marshall et al 2001 (88)	Riñón	D y R y D_R parejas	<i>IL6</i> (promotor)	1	145 D, 209 R y 126 parejas	RC	Genotipo de D <i>IL6</i> : mayor riesgo de RC
Bijlsma et al 2002 (142)	Corazón	D y R	<i>IL4</i> (Promotor)	1	167	RC	Genotipo de D: menor RC
Densem et al 2004 (143)	Corazón	D y R	<i>TGFβ1</i> (rs18041006 y rs1982073)	1	147 R y 134 D	Vasculopatía y RC	R rs18041006 mayor vasculopatía y RC
Hoffmann et al 2004 (144)	Riñón	D	<i>IL2</i> , <i>IL6</i> , <i>IL10</i> , <i>TNFα</i> , <i>TGFβ</i> , <i>IFNγ</i> , <i>CCR2</i> , <i>CCR5</i> (polimorfismos relacionados con RC)	8	68	RC	Polimorfismos en D: influencia la respuesta del R y el RC
Karabon et al 2005 (151)	Células madre hematopoyéticas	D y R	<i>IL6</i> e <i>IL10</i> (promotor)	2	93 R y 74 D	EICH	Polimorfismos en D <i>IL10</i> & <i>IL6</i> : afecta al riesgo de EICH
Fildes et al 2005 (148)	Corazón	D y R	<i>CCR5</i> (rs333 (<i>CCR5Δ32</i>))	1	178	Supervivencia	Genotipo de D: mayor mortalidad
Girnit et al 2008 (145)	Corazón	R	<i>IL6</i> (rs1800795), <i>IL10</i> (rs1800896, rs1800872 y rs1800871), <i>TNFα</i> (rs1800629), <i>VEGF</i> (rs699947, rs833061 y rs2010963)	4	205	RC	Polimorfismos en <i>VEGF</i> y <i>IL6</i> ; así como ausencia de polimorfismos en <i>IL10</i> : aumenta el riesgo de RC
Pawlik et al 2008 (149)	Riñón	R	<i>TNFα</i> (rs1800629), <i>IL2</i> (rs2069762), <i>IL4</i> (rs2243250) e <i>IL6</i> (rs1800795)	4	197	Supervivencia	Polimorfismos en <i>TNF-α</i> e <i>IL6</i> mejora la supervivencia
Biggins et al 2013 (152)	Hígado	R y D_R parejas	<i>IL28B</i> (rs12979860 y rs8099917) <i>DDX58</i> (rs10813831)	2	440 R y 225 parejas	HCV	Genotipo D aumenta el riesgo de HCV

Tabla 5. Variantes genéticas en las células B, relacionadas con patologías post-trasplante. DCI: Disfunción crónica del injerto; D: Donante; EICH: Enfermedad del injerto contra huésped aguda; FCI: Fallo crónico del injerto; FRI: Función retardada del injerto; HBV: Virus hepatitis B; HCV: Virus hepatitis C; IL: Interleucina; R: Receptor; RC: Rechazo celular; REs: Resistencia a esteroides; RS: Rechazo severo; rs: *reference_SNP*.

Autores	Órgano trasplantado	D y R	Genes estudiados (polimorfismos)	Nº. De genes	Nº. De pacientes	Hallazgos clínicos	Conclusiones
Firpi et al 2013 (153)	Hígado	D_R parejas	<i>IL28B</i> (rs12979860)	1	135	HCV	Polimorfismo en D y R: mayor respuesta al tratamiento
Hejr et al 2013 (146)	Riñón	R	<i>IL17</i> (rs2275913), <i>IL21</i> (rs2055979, rs4833837) e <i>IL23R</i> (rs10889677)	3	220	HBV y RC	Polimorfismos en estos genes se relacionan con HBV y RC
Kwiatkowska et al 2014 (147)	Riñón	R	<i>IL2-IL21</i> (rs6822844)	1	270	FRI, RC, DCI	Polimorfismo no influye en FRI, RC o DCI

Tabla 5 (Continuación). Variantes genéticas en las células B, relacionadas con patologías post-trasplante. DCI: Disfunción crónica del injerto; D: Donante; EICH: Enfermedad del injerto contra huésped aguda; FCI: Fallo crónico del injerto; FRI: Función retardada del injerto; HBV: Virus hepatitis B; HCV: Virus hepatitis C; IL: Interleucina; R: Receptor; RC: Rechazo celular; REs: Resistencia a esteroides; RS: Rechazo severo; rs: *reference_SNP*.

Por tanto, debido al importante papel del complemento y de las células B, en la progresión del RMA, en esta tesis doctoral nos planteamos un nuevo enfoque empleando la NGS, lo cual permitirá estudiar un mayor número de genes. Además, la posibilidad de realizar estudios de expresión nos permitirá estudiar su posible relación con el fenotipo. Esta nueva información puede aportar información diagnóstica y pronóstica sobre el RMA.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral son:

- 1) Identificar variantes genéticas en el receptor y en su donante en la biología de las células B y en la activación de la cascada del complemento que pueden estar implicadas en el desarrollo del RMA.

- 2) Analizar la disparidad de variantes existente entre el genoma del receptor y de su donante con el fin de poder identificar la complementariedad entre el receptor y el donante en la génesis del RMA.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Selección de pacientes

Todas las muestras empleadas en esta tesis doctoral pertenecen a la “Colección de muestras para la investigación de insuficiencia cardiaca avanzada y trasplante cardiaco” del CHUAC, registrada en el Instituto de Salud Carlos III como C_0000419, 2012/348, cuya responsable es la Dra. María G. Crespo Leiro. El estudio fue aprobado por el Comité ético de investigación de Galicia, Referencia: 2014/012 y se realizó en conformidad con la guía ética de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes incluidos firmaron el consentimiento informado para la utilización de muestras biológicas en el estudio.

3.1.1 Receptores de TC

Se seleccionaron 46 pacientes con TC, de forma retrospectiva, en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) entre Junio del 2000 y Noviembre del 2015. De los pacientes incluidos en el estudio, 23 habían presentado algún episodio de RMA. Estos pacientes (casos), fueron pareados con los pacientes control con TC, en función del género, edad (± 5 años) y período de seguimiento post-TC (± 6 meses).

El criterio diagnóstico para definir los casos con RMA fue diferente dependiendo de si el RMA había ocurrido antes o después del año 2013, puesto que en este año la ISHLT formuló el nuevo criterio histopatológico para el RMA (53). Los casos de RMA anteriores al 2013 (n=15) se definieron de acuerdo a la clasificación ISHLT del 2005 (30) según:

- a) disfunción de injerto,
- b) fracción de eyección reducida y/o insuficiencia cardiaca,

c) evidencia de activación del complemento en la BEM (tinción positiva para C4d y/o C3d),

d) respuesta favorable ante el tratamiento para el RMA.

En los casos de RMA, posteriores al 2013 (n=8), se siguieron los criterios establecidos en la clasificación ISHLT 2013 [pRMA1(I+), pRMA1(H+), pRMA2 y pRMA3] (53) con al menos una BEM positiva (pRMA1 o mayor). Los pacientes control, no presentaban ningún signo de RMA (pRMA0) o disfunción del injerto.

3.1.2 Donantes y parejas donante-receptor

Para el estudio de los donantes y de las parejas donante-receptor, se seleccionaron 28 de los receptores con TC, 14 con RMA y 14 controles, para los cuales había disponible muestra de su correspondiente donante. Por lo tanto se incluyeron 56 pacientes para su análisis:

- 14 pacientes con TC y RMA y sus 14 donantes,
- 14 pacientes control con TC y ausencia de RMA y sus 14 donantes.

3.2 Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó:

a) A partir de sangre periférica con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante,

b) A partir de coágulos obtenidos de sangre periférica sin anticoagulante, mediante un proceso de centrifugación a 2.500 g durante 15 minutos tras el cual, se obtiene el suero en la parte superior y el coágulo en la inferior.

Independientemente de la muestra biológica disponible, para la extracción de ADN se empleó el Kit comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen Inc. Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 11).

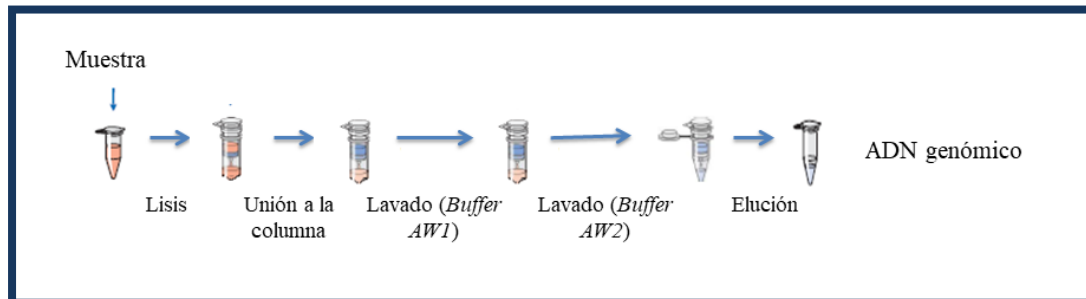


Figura 11. Esquema extracción de ADN con *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen Inc. Hilden, Germany).

Los pasos a seguir con el kit de extracción son 4: preparación de la muestra, lisis, filtrado y elución. Cada procedimiento se detalla a continuación:

A. Preparación de la muestra

- Muestras de sangre total: se añadieron 200 μL de muestra en tubos de 1,5 mL con 25 μL de proteinasa K para digerir las proteínas.
- Muestras de coágulos: se cortó una sección del mismo para disgregarlo mecánicamente en un *Retsch MM200 mixer mill* (Merck KGaA Darmstadt-Alemania) durante 10 minutos con 200 μL de tampón fosfato salino (PBS) y 20 μL de proteinasa K. Posteriormente, se incubó durante 2 horas a 37°C con agitación continua en un agitador a 250 revoluciones por minuto (rpm). Una vez transcurridas las 2 horas, se procedió a utilizar la muestra como si fuese sangre.

B. Lisis celular para la liberación de los ácidos nucleicos

Para llevar a cabo la lisis celular, se añadieron 200 μL de tampón de lisis AL a la muestra y se agitó durante 15 segundos para homogeneizar. A continuación, se incubó la muestra a 56°C durante 10 minutos y se agregaron 200 μL de etanol absoluto (100%) a la muestra para que el ADN precipitase.

C. Filtrado

Se trasvasó cuidadosamente la muestra a la columna *QIAamp Mini spin column* (en un tubo de 2 mL), que contiene una membrana de sílice que retiene los ácidos nucleicos y se centrifugó a 6.000 g durante 1 minuto. A continuación se lavó la columna 2 veces:

- El primer lavado se realizó con 500 μ L de tampón de lavado AW1 y se centrifugó a 6.000 g durante 1 minuto,
- El segundo lavado se realizó con 500 μ L de tampón de lavado AW2 y esta vez se centrifugó a 20.000 g durante 1 minuto. A continuación se volvió a centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto para asegurar que no quedasen restos del tampón de lavado en la columna.

D. Elución

Se traspasó la columna a un tubo limpio de 1,5 mL rotulado y se añadieron 100 μ L de tampón de elución AE. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y a continuación se centrifugó a 6.000 g durante otro minuto para obtener el ADN eluido.

3.3 Cuantificación del ADN

3.3.1 Cuantificación del ADN total

Una vez extraído el ADN, para su cuantificación y medición de su pureza por espectrofotometría con el *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher Massachusetts-USA) se emplearon 2 μ L de muestra.

Para comprobar la pureza, se midió la absorbancia a 260 nm (A_{260}) y a 280 nm (A_{280}) respectivamente. Esto es debido a que los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 260 nm, mientras que las proteínas lo tienen a 280 nm. Viendo la relación entre ambas absorbancias ($A_{260}/280$) se puede estimar si el ADN genómico (ADNg)

extraído está contaminado con restos de proteínas (Figura 12). Para considerar que el ADNg de la muestra se ha extraído con la pureza adecuada, el ratio $A_{260}/280$ debe estar entre 1,8 y 2,0.

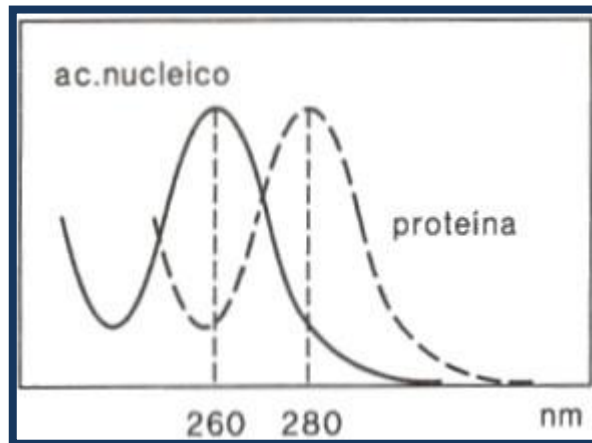


Figura 12. Gráfico absorbancias 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}). La relación entre ambas nos da el grado de pureza del ADN extraído (Cultek S.L.U. 2006).

3.3.2 Cuantificación del ADN de doble cadena

La cuantificación del ADN de doble cadena, se realizó mediante fluorimetría con un *Qubit® 3.0* (Invitrogen-California USA). Esta medida aportó una información más específica que la obtenida con el *Nanodrop 1000* que mide la cantidad de ADN total, es decir, el ADN tanto de cadena simple como de doble hebra. Sin embargo, el *Qubit® 3.0* permite medir la cantidad de ADN de doble cadena que contenían las muestras lo cual resulta clave para la realización de la NGS.

Para llevar a cabo las medidas en el *Qubit® 3.0*, se utilizó, el kit *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit* (Invitrogen-California USA) que permite medir cantidades de ADN con un amplio rango (*Broad Range, BR*) entre 1 y 1.000 ng. Para ello, se siguieron las instrucciones detalladas en la Figura 13.

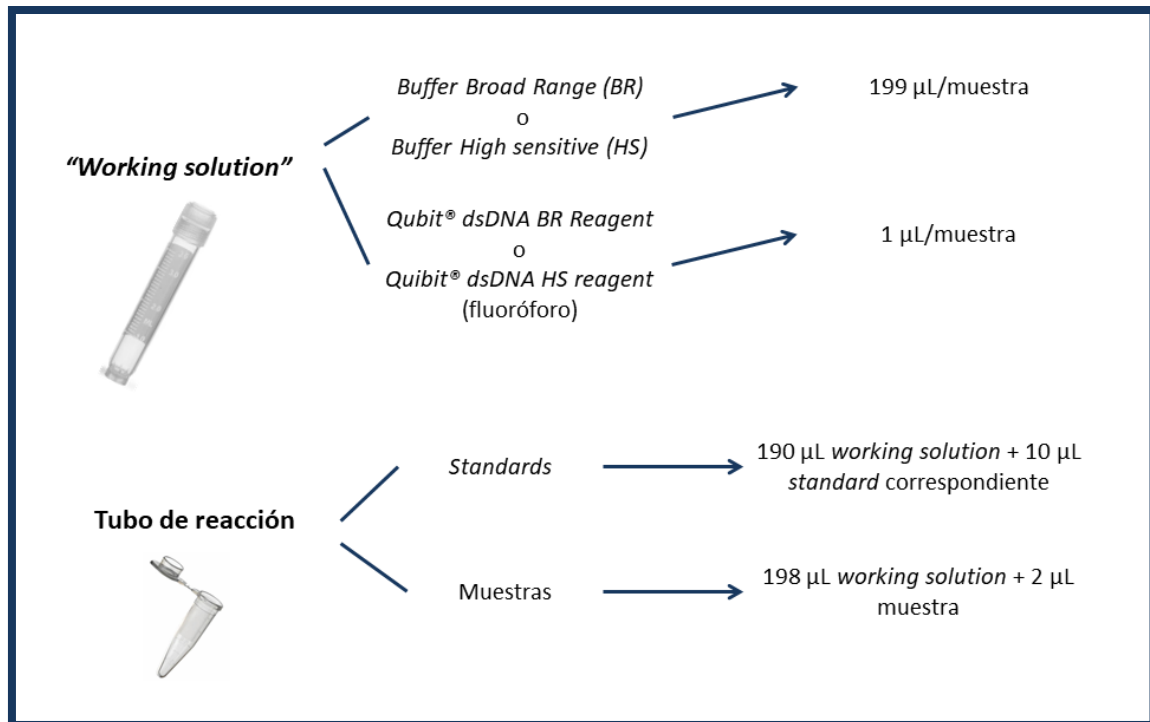


Figura 13. Instrucciones para la preparación de las muestras para su medición en el *Qubit® 3.0*.

Para realizar las medidas en el *Qubit® 3.0*, se emplearon tubos de pared fina de 500 µL (Axygen San Diego-USA). Debido a que cada protocolo de NGS se realizó en *pools* de 12 muestras, las cuantificaciones también se llevaron a cabo en grupos de 12 muestras, incluyendo en cada caso 2 mediciones adicionales para los correspondientes *standards*. A continuación, se prepararon las muestras de la siguiente manera (Figura 13):

- *Working solution* (WS): Se añadieron 199 µL de tampón BR por muestra y 1 µL por muestra del fluoróforo *Qubit® dsDNA BR reagent*. Debido a que en cada protocolo se miden un total de 14 muestras, se añaden 2.786 µL de tampón y 14 µL del fluoróforo.
- Tubos de reacción: En el caso de los *standards*, se añadieron 190 µL de la WS y 10 µL del *standard* correspondiente. Mientras que, para las muestras se añadieron 198 µL de la WS y 2 µL de cada muestra.

Una vez preparadas las muestras, se incubaron 2 minutos en oscuridad para evitar la degradación del fluoróforo y se midieron en el *Qubit® 3.0* indicando que se trataba de ADN de doble hebra y el tipo de ensayo (BR).

1. Primero se midieron ambos *standards* para crear la curva de calibración. El primer *standard* con una concentración de 0 ng/μL y como segundo *standard* se emplea una concentración conocida de ADN a 10 ng/μL,
2. Se indicó la cantidad de ADN añadido de cada muestra y se realizó la medida muestra por muestra.

El *Qubit® 3.0* calcula de forma directa la concentración original de ADN presente en cada una de las 12 muestras. A partir de estos datos se realizó una dilución de la muestra original a 10 ng/μL en un volumen final de 20 μL. Esta dilución se comprobó midiendo las muestras nuevamente en el *Qubit® 3.0*, esta vez empleando el *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen-California USA) que mide cantidades en un rango más sensible (*High sensitive*, HS) entre 0,2 y 100 ng. Para la preparación de las muestras se siguieron las instrucciones detalladas en la Figura 13, pero en este caso se empleó el fluoróforo *Qubit® dsDNA HS reagent*. A continuación, se procedió a su lectura en el *Qubit® 3.0* al igual que en el caso anterior pero indicando, en este caso, que se trataba de una medición HS. A partir de estas medidas, se preparó una dilución de las muestras a 5 ng/μL, ya que para comenzar el proceso de NGS, se necesita una cantidad aproximada de 50 ng de ADNg en un volumen de 10 μL.

3.4 Secuenciación masiva (NGS)

La secuenciación de nueva generación o *Next Generation Sequencing* (NGS) es una técnica que permite obtener millones de secuencias de ADN en poco tiempo y a un precio reducido (154). En esta tesis doctoral empleamos la tecnología de Illumina (San Diego-

USA) para la amplificación de un exoma clínico que incluye 125.396 sondas destinadas a capturar 11.946.514 pares de bases (pb) de 4.813 genes, entre los que se incluyen los 112 genes seleccionados por su importante papel en la vía del complemento y la biología de las células B (Tabla 6). La NGS consiste en una serie de pasos para preparar las librerías de ADN, secuenciarlas y finalmente generar los datos que permitan el análisis de cada muestra y de las variantes presentes en ellas.

	Gen	Posición	Hebra	Isoforma/Tránsito ID
	Genes del sistema del complemento analizados	<i>MASP2</i>	1: 11.086.580 - 11.107.291	NEG
<i>CIQA</i>		1: 22.962.999 - 22.966.102	POS	NM_015991/ENST00000374642
<i>CIQC</i>		1: 22.970.123 - 22.974.604	POS	NM_001114101/ENST00000374639
<i>CIQB</i>		1: 22.979.255 - 22.988.032	POS	NM_000491/ENST00000314933
<i>FCN3</i>		1: 27.695.603 - 27.701.316	NEG	NM_003665/ENST00000270879
<i>C8A</i>		1: 57.320.479 - 57.383.895	POS	NM_000562/ENST00000361249
<i>C8B</i>		1: 57.394.883 - 57.431.814	NEG	NM_000066/ENST00000371237
<i>CRP</i>		1: 159.682.079 - 159.684.380	NEG	NM_000567/ENST00000255030
<i>CFH</i>		1: 196.621.008 - 196.716.635	POS	NM_000186/ENST00000367429
<i>CFHR3</i>		1: 196.743.925 - 196.763.204	POS	NM_021023/ENST00000367425
<i>CFHR1</i>		1: 196.788.875 - 196.801.320	POS	NM_002113/ENST00000320493
<i>CFHR4</i>		1: 196.857.144 - 196.887.844	POS	NM_001201550/ENST00000367416
<i>CFHR2</i>		1: 196.788.898 - 196.928.357	POS	NM_005666/ENST00000367415
<i>CFHR5</i>		1: 196.946.667 - 196.978.805	POS	NM_030787/ENST00000256785
<i>C4BPA</i>		1: 207.277.607 - 207.318.318	POS	NM_000715/ENST00000367070
<i>CD55</i>		1: 207.494.853 - 207.534.312	POS	NM_001114752/ENST00000314754
<i>CR2</i>		1: 207.627.575 - 207.663.241	POS	NM_001006658/ENST00000367057
<i>CRI</i>		1: 207.669.492 - 207.813.993	POS	NM_000651/ENST00000367049
<i>CD46</i>		1: 207.925.402 - 207.968.859	POS	NM_002389/ENST00000358170
<i>COLEC11</i>		2:3.691.541-3.691.739	POS	NM_001255985/ENST00000418971.6
<i>MASP1</i>		3: 186.935.942 - 187.009.811	NEG	NM_001879/ENST00000337774
<i>CFI</i>		4: 110.661.852 - 110.723.336	NEG	NM_000204/ENST00000394634
<i>C9</i>		5: 39284275 - 39364553	NEG	NM_001737/ENST00000263408
<i>C7</i>		5: 40909473 - 41016004	POS	NM_000587/ENST00000313164
<i>C6</i>		5: 41142146 - 41261486	NEG	NM_000065/ENST00000337836
<i>C2</i>		6: 31897785-31945674	POS	NM_000063/ENST00000299367
<i>CFB</i>		6: 31.895.475 - 31.919.826	POS	NM_001710/ENST00000425368
<i>PLG</i>		6: 161.123.270 - 161.174.339	POS	NM_000301/ENST00000308192
<i>CLU</i>		8: 27.454.434 - 27.472.549	NEG	NM_001831/ENST00000316403

Tabla 6. Lista de genes incluidos en el estudio por su papel en el sistema del complemento o en la biología de las células B. NEG: Negativa; POS: Positiva; ID: Identificación.

	Gen	Posición	Hebra	Isoforma/Tránsito ID
	Genes del sistema del complemento analizados	<i>C5</i>	9: 120952335 - 121074925	NEG
<i>FCN2</i>		9: 137.772.654 - 137.779.925	POS	NM_004108/ENST00000291744
<i>IL2RA</i>		10: 6.010.694-6.062.370	NEG	NM_000417/ENST00000379959
<i>MBL2</i>		10: 54.525.140 - 54.531.461	NEG	NM_000242/ENST00000373968
<i>CD59</i>		11: 33.719.807 - 33.757.992	NEG	NM_203330/ENST00000528700
<i>SERPING1</i>		11: 57.364.860 - 57.382.327	POS	NM_000062/ENST00000278407
<i>CIQTNF5</i>		11: 119.209.652 - 119.217.384	NEG	NM_001278431/ENST00000528368
<i>C1S</i>		12: 7.096.351 - 7.178.337	POS	NM_201442/ENST00000328916
<i>C1R</i>		12: 7.187.513 - 7.245.204	NEG	NM_001733/ENST00000542285
<i>A2M</i>		12: 9.220.260 - 9.268.826	NEG	NM_000014/ENST00000318602
<i>CTSG</i>		14: 25.042.728 - 25.045.467	NEG	NM_001911/ENST00000216336
<i>IGHG2</i>		14:106.111.146-106.109.520	NEG	NM-/ENST00000390545
<i>IGHA1</i>		14:106.175.021-106.173.485	NEG	NM-/ENST00000390547
<i>ITGAM</i>		16: 31.271.311 - 31.344.191	POS	NM_001145808/ENST00000544665
<i>VTN</i>		17: 26.694.297 - 26.700.111	NEG	NM_000638/ENST00000226218
<i>CFD</i>		19: 859.453 - 863.570	POS	NM_001928/ENST00000327726
<i>C3</i>		19: 6677835 - 6720682	NEG	NM_000064/ENST00000245907
<i>CALR</i>		19: 13.049.392 - 13.055.304	POS	NM_004343/ENST00000316448
<i>C5AR2</i>		19: 47.835.404 - 47.846.607	POS	NM_001271749/ENST00000595464
<i>ITGB2</i>		21: 46.305.868 - 46.351.905	NEG	NM_000211/ENST00000302347
<i>CFP</i>	X: 47.483.612 - 47.489.705	NEG	NM_002621/ENST00000247153	
<i>VSIG4</i>	X: 66.021.738-66.040.125	NEG	NM_001257403/ENST00000455586	
Genes analizados por su papel en la biología de las células B	Gen	Posición	Hebra	Isoforma/Tránsito ID
	<i>PIK3CD</i>	1: 9.711.790 - 9.789.173	POS	NM_005026 /ENST00000377346
	<i>VCAM1</i>	1:100719640..100739045	POS	NM_001078/ENST00000294728
	<i>IL6R</i>	1: 154.377.669 - 154.441.927	POS	NM_000565/ENST00000368485
	<i>CHRN2</i>	1: 154.540.257 - 154.552.503	POS	NM_000748/ENST00000368476
	<i>FCRL3</i>	1: 157.646.271 - 157.670.648	NEG	NM_052939/ENST00000368184
	<i>FCERIA</i>	1: 159.259.504 - 159.278.015	POS	NM_002001/ENST00000368115
	<i>CD32B</i>	1: 161.551.101 - 161.648.445	POS	NM_004001/ENST00000358671
	<i>FASL</i>	1: 172.628.154 - 172.636.015	POS	NM_000639/ENST00000367721
	<i>IL10</i>	1: 206.940.947 - 206.945.840	NEG	NM_000572/ENST00000423557
	<i>MSH2</i>	2: 47.630.108 - 47.789.451	POS	NM_000251/ENST00000233146
	<i>IGKV</i>	2: 89.247.314-89.246.799	NEG	NM-/ENST00000496168
	<i>ITGA4</i>	2: 182.321.929 - 182.400.915	POS	NM_000885/ENST00000397033
	<i>CASP8</i>	2: 202.098.166 - 202.152.435	POS	NM_001080125/ENST00000358485
	<i>HDAC4</i>	2: 239.969.864 - 240.323.349	NEG	NM_006037/ENST00000345617
	<i>CD38</i>	4: 15.779.898 - 15.851.070	POS	NM_001775/ENST00000226279
<i>NF-κB</i>	4: 102.501.329-102.617.302	POS	NM_003998/ENST00000226574	
<i>IL2</i>	4: 123.372.625 - 123.377.881	NEG	NM_000586/ENST00000226730	

Tabla 6 (Continuación 1). Lista de genes incluidos en el estudio por su papel en el sistema del complemento o en la biología de las células B. NEG: Negativa; POS: Positiva; ID: Identificación.

Gen	Posición	Hebra	Isoforma/Tránsito ID
<i>IL21</i>	4: 123.533.783 - 123.542.225	NEG	NM_021803/ENST00000264497
<i>IL7R</i>	5: 35856875-35879603	POS	NM_002185/ENST00000303115
<i>PIK3R1</i>	5: 67.511.548 - 67.597.650	POS	NM_181523/ENST00000521381
<i>MEF2C</i>	5: 88.013.975 - 88.199.923	NEG	NM_002397/ENST00000504921
<i>IL5</i>	5: 131.877.136 - 131.892.531	NEG	NM_000879/ENST00000231454
<i>IL13</i>	5: 131.991.955 - 131.996.803	POS	NM_002188/ENST00000304506
<i>IL4</i>	5: 132.009.678 - 132.018.369	POS	NM_000589/ENST00000231449
<i>HDAC9</i>	7: 18.126.572 - 19.036.994	POS	NM_178425/ENST00000441542
<i>IL6</i>	7: 22.765.503 - 22.771.622	POS	NM_000600/ENST00000258743
<i>FAM126A</i>	7: 22.980.878 - 23.053.750	NEG	NM_032581/ENST00000432176
<i>IL7</i>	8: 78.675.870 - 78.805.523	NEG	NM_000880/ENST0000026385
<i>CD72</i>	9: 35.609.530 - 35.646.808	NEG	NM_001782/ENST00000259633
<i>PAX5</i>	9: 36.833.272 - 37.034.104	NEG	NM_016734/ENST00000358127
<i>FAM120A</i>	9: 96.214.004 - 96.328.398	POS	NM_014612/ENST00000277165
<i>FAS</i>	10: 90.750.414 - 90.775.543	POS	NM_000043/ENST00000355740
<i>HHEX</i>	10: 94.447.945 - 94.455.404	POS	NM_002729/ENST00000282728
<i>BLNK</i>	10: 97.951.458 - 98.031.345	NEG	NM_013314/ENST00000224337
<i>IKK</i>	10: 101.948.055-101.989.377	NEG	NM_001278/ENST00000370397
<i>CD20</i>	11: 60.223.225 - 60.238.234	POS	NM_152866/ENST00000534668
<i>CLCF1</i>	11: 67.131.639 - 67.141.649	NEG	NM_013246/ENST00000312438
<i>FADD</i>	11: 70.203.163 - 70.207.402	POS	NM_003824/ENST00000301838
<i>ATM</i>	11: 108.093.211 - 108.239.830	POS	NM_000051/ENST00000278616
<i>IL10RA</i>	11: 117.857.063 - 117.872.197	POS	NM_001558/ENST00000227752
<i>AICDA</i>	12: 8.754.762 - 8.765.468	NEG	NM_020661/ENST00000229335
<i>IGHM</i>	14: 106.320.349 - 106.322.324	NEG	NM-/ENST00000390559
<i>ILAR</i>	16: 27.324.989 - 27.376.100	POS	NM_000418/ENST00000395762
<i>CD19</i>	16: 28.943.260 - 28.950.668	POS	NM_001178098/ENST00000538922
<i>CD79B</i>	17: 62.006.100 - 62.009.715	NEG	NM_001039933/ENST00000392795
<i>FCER2</i>	19: 7.753.644 - 7.767.033	NEG	NM_002002/ENST00000346664
<i>CD320</i>	19: 8.367.011 - 8.373.241	NEG	NM_016579/ENST00000301458
<i>CD22</i>	19: 35.810.164 - 35.838.259	POS	NM_001771/ENST00000085219
<i>TGF-β</i>	19: 41.807.492 - 41.859.817	NEG	NM_000660/ENST00000221930
<i>CD79A</i>	19: 42.381.190 - 42.385.440	POS	NM_001783/ENST00000221972
<i>FCGRT</i>	19: 50.010.073 - 50.029.591	POS	NM_001136019/ENST00000221466
<i>FCAR</i>	19: 55.385.704 - 55.401.839	POS	NM_002000/ENST00000355524
<i>ADA</i>	20: 43.248.163 - 43.280.875	NEG	NM_000022/ENST00000372874
<i>CD40</i>	20: 44.746.911 - 44.758.503	POS	NM_001250/ENST00000372285
<i>CHRNA4</i>	20: 61.975.420 - 62.009.754	NEG	NM_000744/ENST00000370263
<i>IL10RB</i>	21: 34.638.663 - 34.669.540	POS	NM_000628/ENST00000290200

Tabla 6 (Continuación 2). Lista de genes incluidos en el estudio por su papel en el sistema del complemento o en la biología de las células B. NEG: Negativa; POS: Positiva; ID: Identificación.

Genes analizados por su papel en la biología de las células B	Gen	Posición	Hebra	Isoforma/Tránsito ID
	<i>VPREB1</i>	22: 22.599.087 - 22.599.928	POS	NM_007128/ENST00000403807
	<i>IGLL1</i>	22: 23.915.312 - 23.922.496	NEG	NM_02007 /ENST00000330377
	<i>MIF</i>	22: 24.236.191 - 24.237.415	POS	NM_002415/ENST00000215754
	<i>IGBP1</i>	X: 69.353.299 - 69.386.175	POS	NM_001551/ENST00000356413
	<i>CD40LG</i>	X: 135.730.352 - 135.742.550	POS	NM_000074/ENST00000370629

Tabla 6 (Continuación 3). Lista de genes incluidos en el estudio por su papel en el sistema del complemento o en la biología de las células B. NEG: Negativa; POS: Positiva; ID: Identificación.

3.4.1 Preparación de librerías

Se define como librería a una colección de clones de secuencias de ADN que debería contener, teóricamente, todas las secuencias existentes en la muestra original de ADN y que se van a amplificar en el exoma clínico.

La preparación de las librerías, se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante para el kit de preparación de muestras *TruSight™ One Sequencing Panel Library Preparation* (Illumina San Diego-USA) que consiste en la preparación de las muestras, la formación del *pool* y su posterior hibridación con sondas específicas con el fin de capturar las regiones de interés (Figura 14).

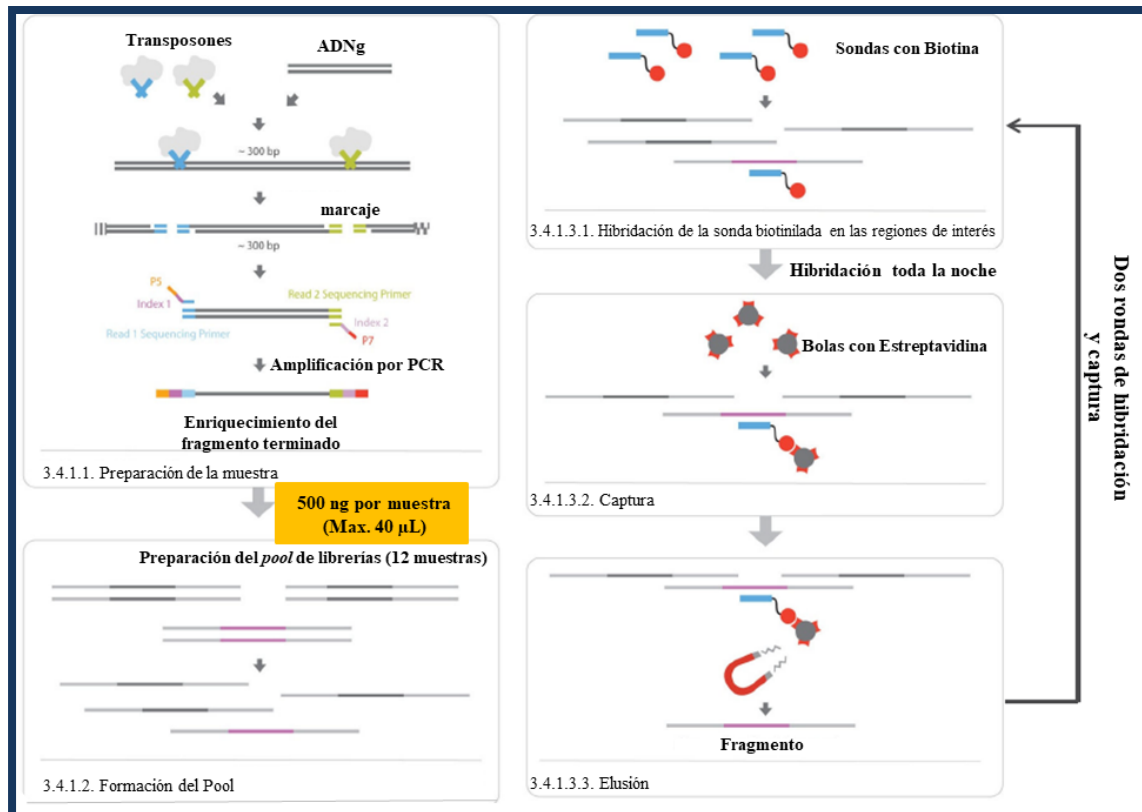


Figura 14. Flujo de trabajo para la preparación de las librerías con el kit *TruSight™ One Sequencing Panel Library Preparation* (Illumina San Diego-USA).

3.4.1.1 Preparación de las muestras

La preparación de las muestras consiste en añadir 50 ng de cada una de las 12 muestras a secuenciar para la fragmentación y marcado del ADNg, su purificación y la primera reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se añaden 10 µL de la dilución 5 ng/µL previamente realizada.

3.4.1.1.1 Fragmentación y marcado del ADN genómico

Durante este proceso se fragmentó y marcó el ADNg empleando los transposones de *Nextera* (Illumina San Diego-USA) que mediante una reacción enzimática fragmentan, de forma simultánea, los 50 ng añadidos de ADNg, generando fragmentos de 300 pb aproximadamente. De forma simultánea, se añade un marcador universal de Illumina en los extremos de las secuencias que actúa como referencia para la unión de los índices y adaptadores que son necesarios para las PCRs posteriores (Figura 15).

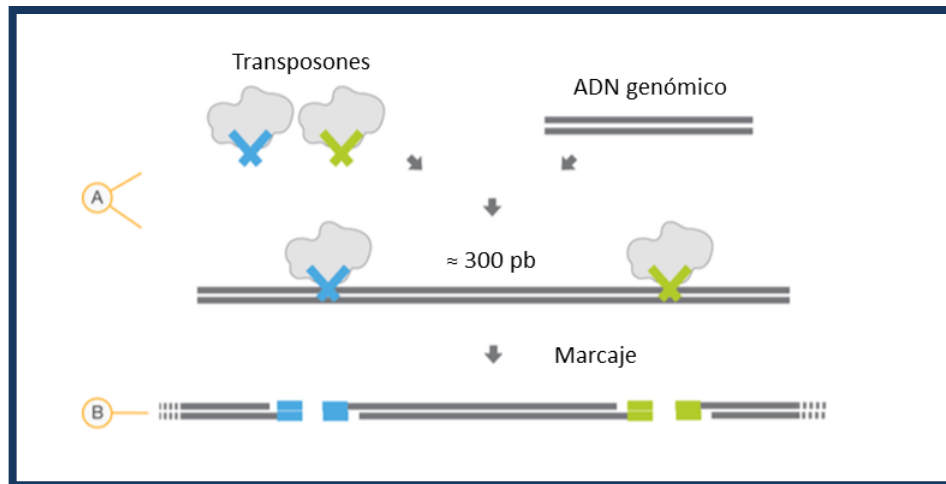


Figura 15. Marcado del ADNg con la transposasa de *Nextera*. **A.** Los transposones se unen al ADNg para fragmentarlo. **B.** Los transposones añaden marcadores para la PCR posterior (Illumina San Diego-USA).

Para llevar a cabo la fragmentación y marcado del ADNg se añadió en un tubo de 200 μL :

- 10 μL de ADNg de la dilución a 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (50 ng de ADNg),
- 25 μL de tampón *Tagment DNA Buffer*,
- 5 μL de *Tagment DNA Enzyme 1*,
- 10 μL de H_2O grado-PCR.

Para que se pueda llevar a cabo la reacción, las muestras se incubaron en un termociclador *Veriti™ Dx Thermal Cycler* (Applied biosystems, California-USA), a 58°C durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 15 μL de tampón *Stop Tagment Buffer* con el fin de detener la reacción.

3.4.1.1.2 Limpieza del ADN marcado

El siguiente paso fue la purificación del ADNg previamente marcado. Este paso es esencial para eliminar toda la transposasa que, de otra forma, podría unirse a los extremos del ADN e interferir en las reacciones posteriores.

Para llevar a cabo este proceso, se utilizaron bolas magnéticas de purificación de muestras (*Sample purification beads, SPB*) que se unen a los fragmentos de ADN marcados siguiendo los siguientes pasos:

- Se agitaron las SPB y se añadieron 65 μL a cada muestra. *Vortex* e incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente,
- Se colocaron los tubos en la placa magnética y se incubaron durante 2 minutos,
- Se descartó el sobrenadante sin arrastrar las SPB,
- Se añadieron 200 μL de etanol (EtOH) al 80% y se incubaron 30 segundos,
- Se repitieron los dos pasos anteriores para completar dos rondas de lavados con EtOH al 80%,
- Se descartó todo el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente al menos 10 minutos,
- Una vez seco, se quitaron los tubos de la placa y se añadieron 22,5 μL de tampón de resuspensión a cada tubo, sin tocar las SPB. *Vortex* durante 1 minuto para homogeneizar e incubación 2 minutos,
- Se colocaron nuevamente en la placa y se incubaron otros 2 minutos,
- Se transfirieron 20 μL de sobrenadante a tubos limpios y rotulados.

3.4.1.1.3 Primera PCR

El siguiente proceso fue la amplificación del ADN marcado y purificado mediante una PCR. En este paso, es esencial añadir de forma correcta los índices o *index* que actuarán como etiqueta de identificación para cada una de las 12 muestras que conforman el *pool*. El kit *TruSight™ One Sequencing Panel Library Preparation* (Illumina San Diego-USA) cuenta con 12 índices 1 (i7xx) y con 8 índices 2 (i5xx) lo cual permite crear una combinación única, de ambos índices para cada muestra. En cada protocolo de preparación de librerías, realizado en esta tesis doctoral, se han empleado los 12 índices 1

(i701-i712), en combinación con un único índice 2 (i50x). Además, cada índice añade también una serie de adaptadores comunes (P5 y P7) que son complementarios a la secuencia de oligonucleótidos presentes en la célula de flujo del secuenciador y a los cuales se unirán durante la secuenciación.

Para la realización de la PCR, se añadieron:

- 20 μ L de *Nextera Library Amplification Mix*,
- 5 μ L del índice 2 seleccionado,
- 5 μ L del índice 1 correspondiente.

Un vez realizada la mezcla de PCR, esta se llevó a cabo en un termociclador *Veriti™ Dx Thermal Cycler* (Applied biosystems, California-USA) mediante un programa de 10 ciclos que se muestra en la Figura 16.

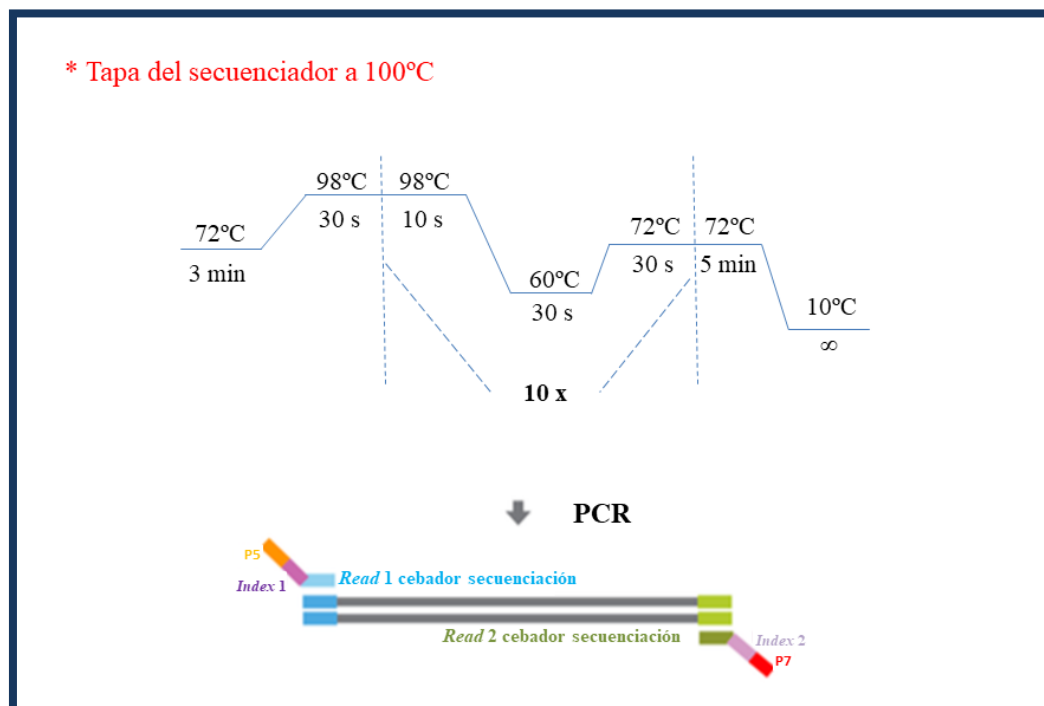


Figura 16. Protocolo primera PCR. Unión de índices y adaptadores (Illumina San Diego-USA).

3.4.1.1.4 Purificación de la PCR

Empleando nuevamente las SPB se purificó el ADN de la librería amplificada y se eliminaron los productos no deseados como restos de nucleótidos y cebadores. En el proceso de purificación se siguieron los mismos pasos que en el apartado 3.4.1.1.2 con la salvedad de que en este caso se añadieron 90 μL de SPB por muestra y 27,5 μL de tampón de resuspensión para recoger 25 μL finales de cada librería en un tubo nuevo.

3.4.1.1.5 Cuantificación de las librerías

En este paso se cuantificaron las librerías en el *Qubit*® 3.0 con el kit *Qubit*™ *dsDNA BR Assay* (Invitrogen-California USA) siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.3.2. Este paso es esencial para conseguir un enriquecimiento uniforme y evitar una representación mayor de alguna de las muestras.

3.4.1.2 Formación del *pool*

Se añadieron 500 ng de cada una de las 12 librerías de ADN para formar el *pool* que debe estar a un volumen final de 40 μL . En los casos en los que el volumen era mayor de 40 μL se concentró el mismo utilizando para ello una unidad de filtro de centrifuga *Amicon Ultra-0.5* (0,5 mL, 30 kDa) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Merck Millipore, Massachusetts-Estados Unidos):

- Se añadieron todos los volúmenes necesarios para obtener 500 ng de cada muestra en un tubo de 0,5 mL,
- Se transfirió todo el volumen a concentrar a la columna (máximo 500 μL),
- Se centrifugó a 14.000 g durante 5-10 min según el volumen de partida. El volumen final en el interior de la columna debía ser inferior a 40 μL ,
- Se invirtió la columna y en el mismo tubo se centrifugó a 1.000 g 2 minutos,

- En un tubo de 0,2 mL se recuperó el volumen eluido de la columna,
- Se añadió el volumen necesario de tampón de resuspensión para obtener un volumen final de 40 µL.

Por lo tanto, a partir de este punto, se trabaja con un único tubo que contiene el *pool* formado por la misma cantidad de ADN de cada una de las 12 librerías.

3.4.1.3 Hibridación, captura y purificación

Tras formar el *pool*, se llevaron a cabo dos rondas de hibridación con sondas específicas de las regiones de interés, su captura y la purificación de las mismas para asegurar el máximo enriquecimiento de las librerías.

3.4.1.3.1 Primera hibridación

Se hibridaron las librerías de ADN, que conforman el *pool*, con sondas de captura en regiones objetivo de interés. Para ello, se añadieron 50 µL del tampón de hibridación y 10 µL de oligos *TruSight One* en un tubo de 0,2 mL que contenía el *pool* de librerías. A continuación, se incubó en el termociclador *Veriti™ Dx Thermal Cycler* (Applied biosystems, California-USA) con el siguiente protocolo:

- Se fijó la temperatura de la tapa a 100°C,
- 95°C durante 10 minutos,
- 18 incubaciones de 1 minuto cada una, que comienzan a 94°C y, a continuación, disminuyen 2°C por incubación,
- 58°C ∞.

El tiempo de hibridación de al menos 90 minutos a 58°C, garantizó que las regiones objetivo se uniesen con las sondas de captura completamente.

3.4.1.3.2 Primera captura

Se emplearon 250 μL de bolas marcadas con estreptavidina (*Streptavidin magnetic beads*, SMB) para capturar las sondas, marcadas con biotina e hibridadas en las regiones de interés. A continuación, se incubó la muestra durante 25 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se incubó 2 veces consecutivas a 50°C, durante 30 minutos en el termociclador *Veriti™ Dx Thermal Cycler* (Applied biosystems, California-USA) con el fin de eliminar las uniones inespecíficas a las SMB.

Tras las rondas de incubación se procede a la elución de la captura:

- Se retiró la muestra del secuenciador y se incubó en la placa imantada durante 2 minutos, tras los cuales se eliminó el sobrenadante,
- Se añadieron 23,5 μL de la pre-mix (*Enrichment elution buffer + HP3*) previamente preparada. *Vortex* 2 minutos. Este proceso rompe la unión de las librerías a la sonda de captura,
- Se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se colocó en la placa imantada durante otros 2 minutos,
- Se transfirieron 21 μL del sobrenadante a un tubo de 0,2 mL, limpio y rotulado,
- Rápidamente, se añadieron 4 μL de la solución *Elute Target Buffer 2* que detiene la reacción de la pre-mix. *Vortex* 30 segundos.

A continuación, se llevó a cabo una segunda ronda de hibridación, igual a la explicada en el paso 3.4.1.3.1 que se dejó toda la noche, seguido de una segunda captura con SMB para garantizar el máximo enriquecimiento de las librerías.

3.4.1.3.3 Lavado de muestras de captura

Tras la segunda captura, se purificaron las muestras mediante el uso de 45 μL de SPB, de forma análoga a la descrita en el paso 3.4.1.1.2. En este paso, al igual que en el 3.4.1.1.4, se añadieron 27,5 μL de tampón de resuspensión para recoger 25 μL finales del *pool* en un tubo nuevo.

3.4.1.4 Segunda amplificación por PCR

Se realizó una segunda PCR de 10 ciclos con el fin de amplificar la biblioteca capturada, siguiendo el protocolo descrito en la Figura 17.

Para la realización de la PCR, se añadieron:

- 5 μL de *PCR Primers Cocktail (PPC)*,
- 20 μL de *Enrichment Amplification Mix*.

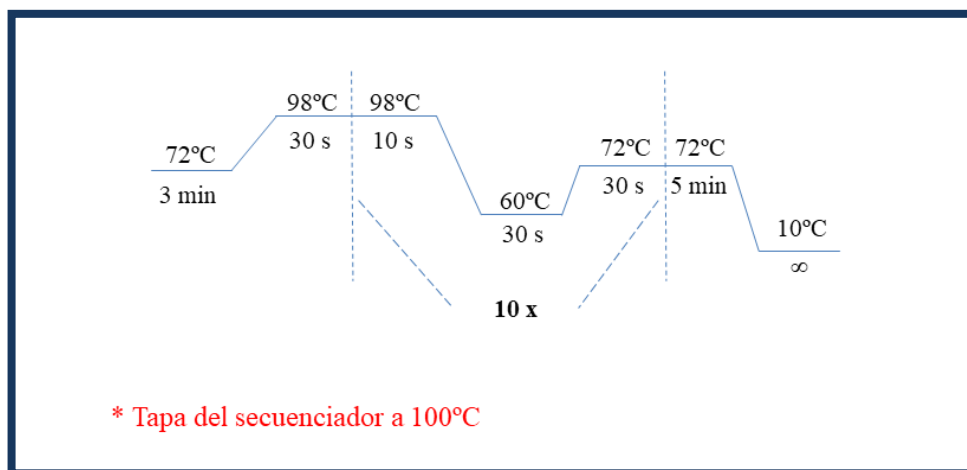


Figura 17. Protocolo segunda PCR.

3.4.1.5 Purificación de la PCR

Tras esta segunda PCR, se emplearon las SPB para la purificación, tal y como se describe en el apartado 3.4.1.1.2, con la salvedad de que en este caso se añadieron 32,5 μL de tampón de resuspensión y se recuperó el *pool* a un volumen final de 30 μL .

3.4.1.6 Cuantificación del *pool*

El *pool* se midió en el *Qubit*® 3.0 con el kit *Qubit*™ *dsDNA BR Assay* (Invitrogen-California USA) siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.3.2 para conocer su concentración final en ng/μL. Una vez se obtuvo dicha concentración, se realizaron los cálculos para conocer la molaridad del *pool* y poder realizar una dilución de 4 nM, con tampón de resuspensión, que es la necesaria para cargar en el secuenciador *NextSeq*® 500 (Illumina, San Diego-USA). La secuenciación se llevó a cabo en el secuenciador *NextSeq*® 500 del Hospital la Paz (Madrid-España).

Para los cálculos de la molaridad se empleó la siguiente fórmula suponiendo un tamaño de biblioteca de 650 pb:

$$\frac{\left(\text{Concentración de la librería en } \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right)}{\left(660 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) * 650} * 10^6 = \text{Concentración en nM}$$

3.4.2 Secuenciación por síntesis de Illumina

La secuenciación de Illumina es de tipo *paired end*, que es aquella en la que se obtienen dos lecturas o *reads* de cada fragmento, una por cada extremo (Figura 18). Además, las lecturas generadas, quedan marcadas de manera que se puede identificar aquellas que provienen del mismo fragmento de ADN. Otra ventaja de la secuenciación de tipo *paired end*, es que las lecturas tienen aproximadamente el mismo tamaño, lo cual resulta de utilidad para el alineamiento posterior de las secuencias con el genoma de referencia.

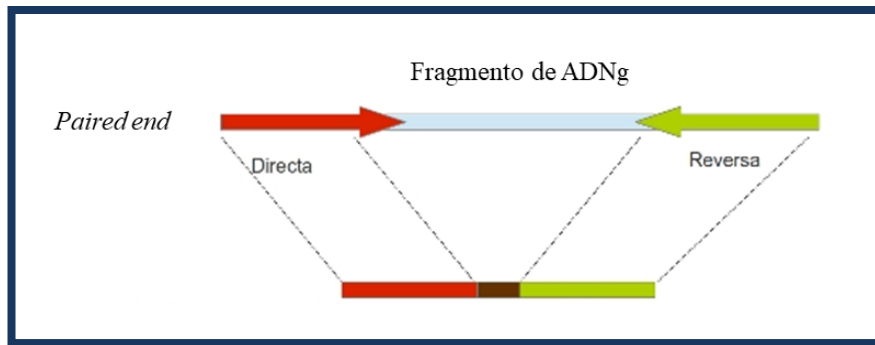


Figura 18. Secuenciación de tipo *paired end*.

La secuenciación *paired end*, se realizó en el secuenciador *NextSeq® 500* de Illumina según las instrucciones del fabricante (Illumina, San Diego-USA). Para llevar a cabo la amplificación de las librerías, éstas se inmovilizaron en los carriles de la celda de flujo, que es un sustrato elaborado con cristal en el que se generan los *clusters* para llevar a cabo los ciclos de desnaturalización, anillamiento, extensión y lavado. La celda de flujo empleada en el secuenciador *NexSeq® 500*, consta de 4 carriles y la adquisición de imágenes se realiza de dos en dos (Figura 19):

- Las imágenes de los carriles 1 y 3 (par de carriles A) se adquieren al mismo tiempo,
- Las imágenes de los carriles 2 y 4 (par de carriles B) se adquieren tras la adquisición de las imágenes del par de carriles A.

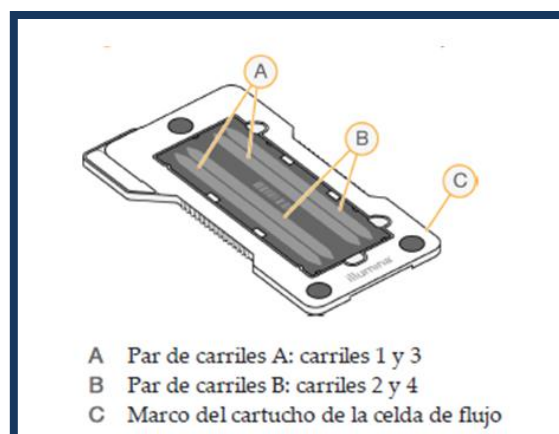


Figura 19. Celda de flujo *NextSeq® 500* (155).

Estas celdas de flujo contienen en su superficie, una serie de oligonucleótidos complementarios a la secuencia de los adaptadores P5 y P7 que fueron añadidos a las

secuencias de ADN, durante la preparación de las librerías (sección 3.4.1.1.3). La unión de las librerías a la celda de flujo, por puentes de hidrógeno, permite su amplificación mediante PCR de tipo puente. Durante la PCR, en la fase de extensión, la cadena de ADN, unida a la celda de flujo, actúa como molde para la polimerasa creando una cadena complementaria que permanece unida a la celda, mientras que la cadena original es lavada. Al agregar los nucleótidos y enzimas, los extremos libres de las cadenas de ADN, se unen a la superficie de la celda a través de los adaptadores complementarios, creando estructuras de tipo puente. En este punto se realiza otra extensión de forma que, durante la desnaturalización, se obtienen dos cadenas de ADN separadas. Este proceso es repetido generando millones de *clusters* de cadenas del mismo fragmento (Figura 20) (155-156). El ciclo finaliza con el lavado de las cadenas *reverse* (Rv) para obtener un solo grupo de cadenas de ADN *forward* (Fw), iguales en cada *cluster* y a las cuales se les bloquea el extremo 3'-OH libre para evitar las uniones inespecíficas.

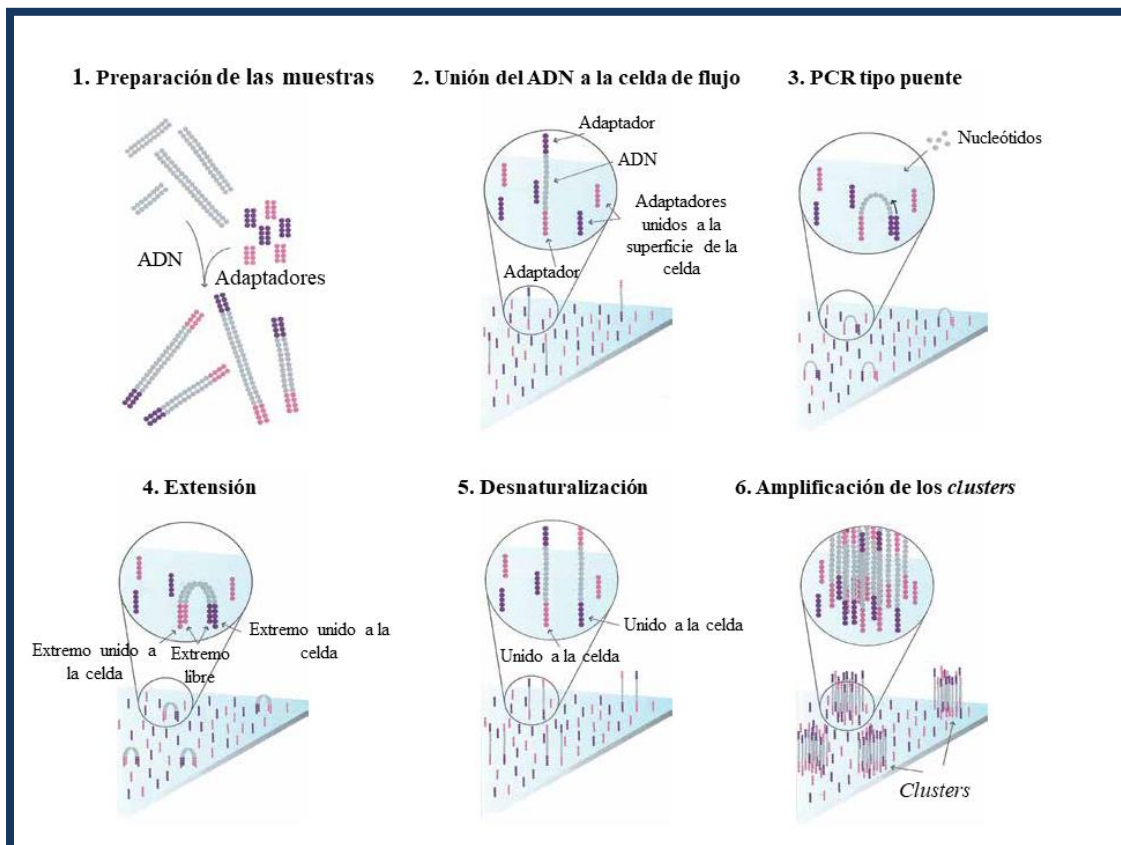


Figura 20. Proceso de amplificación de los *clusters* en fase sólida (Modificado de 157).

Durante la secuenciación por síntesis, para asegurar que los nucleótidos son incorporados de uno en uno, se añaden 4 desoxinucleósido trifosfato (dNTP)-[Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) y Timina (T)], marcados con fluorescencia en su extremo 3'-OH, que actúan como terminadores reversibles durante la secuenciación en paralelo de los millones de *clusters* generados, empleando para ello una polimerasa con el centro activo modificado (158). La etiqueta de los nucleótidos funciona como terminador de la polimerización, por lo que después de que cada dNTP es incorporado, se lleva a cabo un proceso de lavado del resto de los nucleótidos no incorporados y se captura la imagen mediante la excitación de los fluoróforos por 2 tipos de láseres y bandas de filtro, verde y rojo. El láser verde identifica los nucleótidos G y T, mientras que el rojo identifica los nucleótidos A y C. Por su parte, las bandas de filtro permiten distinguir a su vez, entre G/T y A/C dependiendo de la imagen que llega a la cámara (Figura 21).

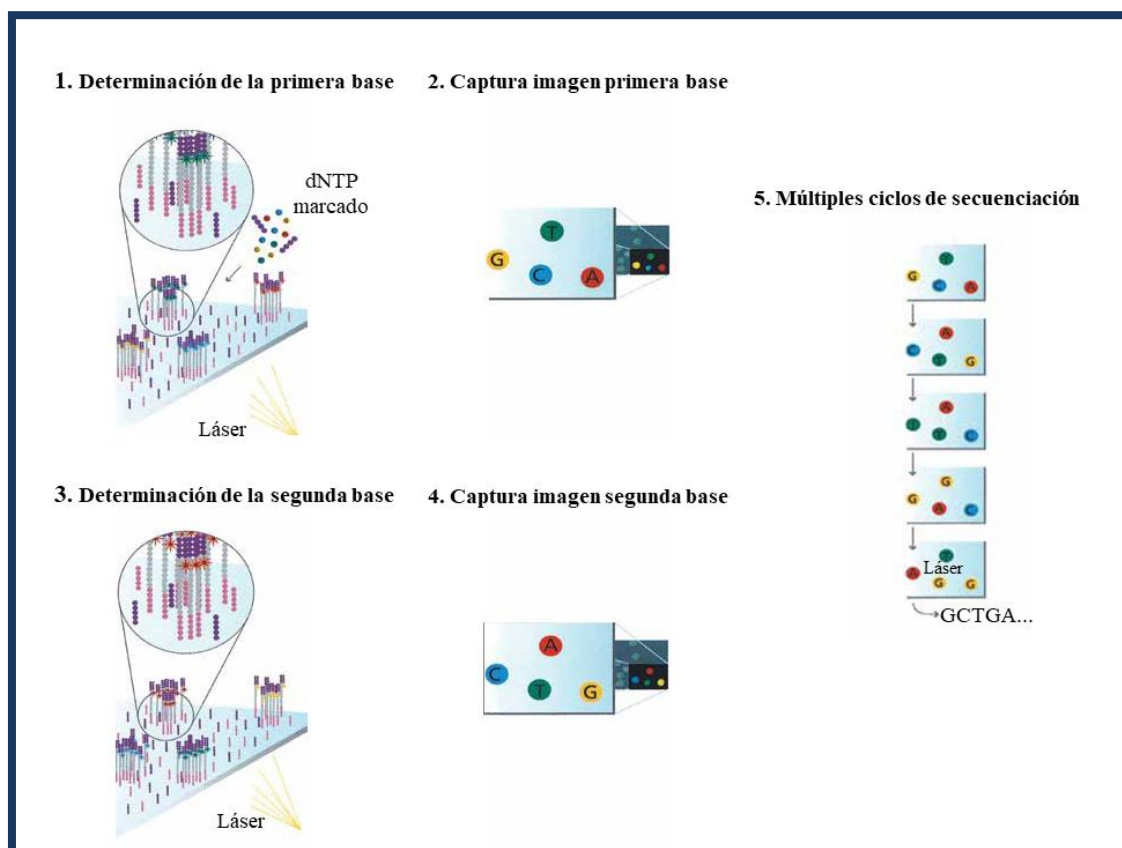


Figura 21. Secuenciación por síntesis Illumina (Modificado de 157).

El secuenciador *NextSeq*® 500 de Illumina, se basa en la secuenciación de dos canales, es decir, que se requieren solo 2 imágenes para la detección de los 4 nucleótidos (156). Así, los *clusters* con señales rojas y verdes se interpretan como C y T respectivamente, mientras que los vistos como amarillos (aparecen en las imágenes rojas y verdes) se marcan como A. Por su parte, los *clusters* sin señal son interpretados como G. En los casos en los que los *clusters* empiezan con una G, esta se detecta en ciclos posteriores, tras la detección de las bases A, C y T respectivamente (Figura 22).

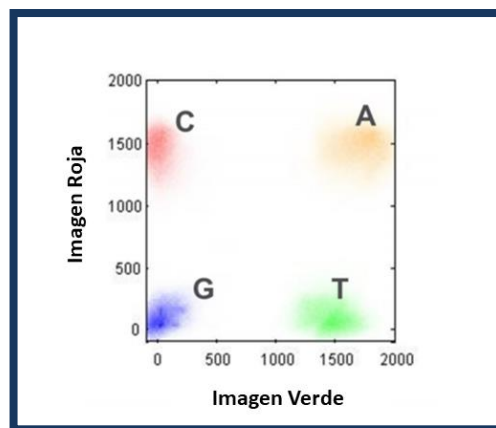


Figura 22. Imágenes secuenciación 2 canales. Las bases A están presentes en ambos canales (*clusters* amarillos), bases C en rojo, T en verde y las G en ninguno (Modificado de 159).

Tras finalizar la secuenciación de los fragmentos *forward* se libera el extremo 3'-OH lo que permite que la secuencia vuelva a unirse a la celda de flujo, formando un puente que permite la extensión del fragmento mediante PCR de tipo puente. Después del proceso de desnaturalización de la doble hebra formada, se bloquea nuevamente el extremo 3'-OH para evitar uniones inespecíficas y se lavan los fragmentos *forward*, repitiéndose todo el proceso de secuenciación por síntesis, para los fragmentos *reverse* (160).

Las cadenas idénticas que forman un determinado *cluster*, son leídas de forma simultánea por lo que en un carril se secuencian millones de *clusters* en paralelo que a la cámara no le resulta posible captar al mismo tiempo. Debido a esto, las imágenes de cada carril se

adquieren en áreas de adquisición de imágenes pequeñas denominadas placas, que definen el campo de visión de la cámara (Figura 23). El *NextSeq® 500* utiliza seis cámaras para efectuar la adquisición de imágenes de la celda de flujo. Cabe destacar que el número de ciclos necesarios para secuenciar un fragmento, determina la longitud de la lectura, mientras que la longitud de onda, junto con la magnitud de la señal fluorescente, emitida al incorporarse un nucleótido a la cadena, determina la llamada de base o *base calling*, es decir, qué nucleótido ha sido incorporado (159).

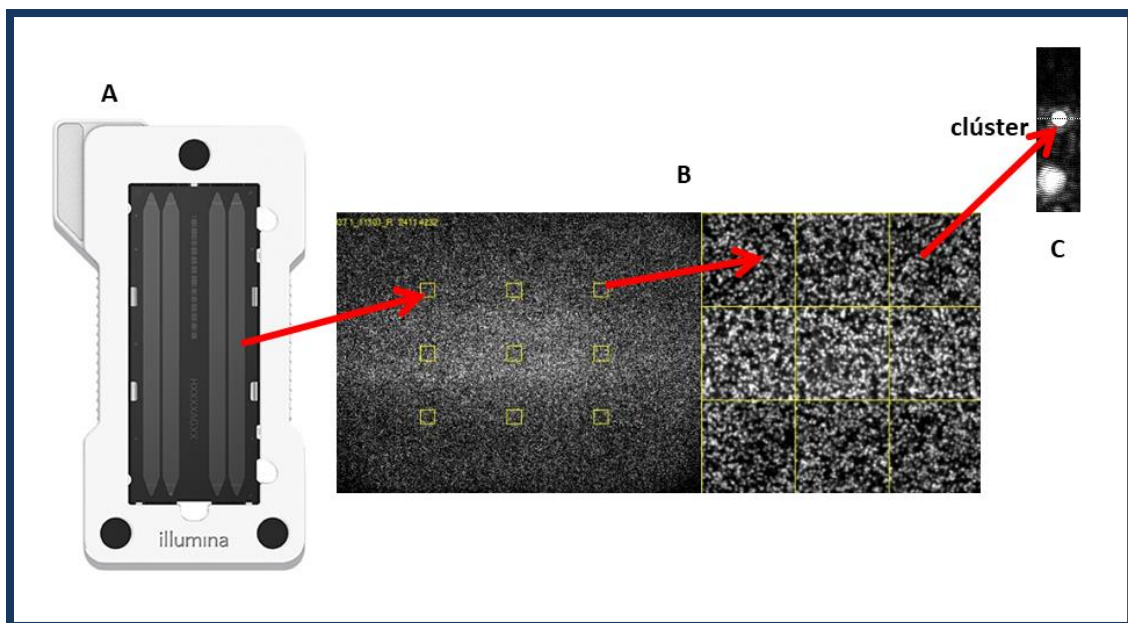


Figura 23. Imagen de placa durante la secuenciación. **A.** Figura celda de flujo *NextSeq® 500* con 4 carriles; **B.** Placa y zoom de la placa con miles de *clusters*; **C.** Zoom de *cluster* formado por amplificación clonal de una molécula de ADN.

3.4.3 Análisis bioinformático

Una de las principales dificultades de la NGS es el análisis bioinformático de los millones de secuencias cortas obtenidas tras la secuenciación. El análisis de datos de NGS es complejo ya que incluye numerosas etapas y es dependiente de multitud de programas y bases de datos, involucrando enormes cantidades de datos heterogéneos. Durante el análisis, se generan diferentes archivos de datos que permitirán el posterior análisis de las secuencias (Figura 24).

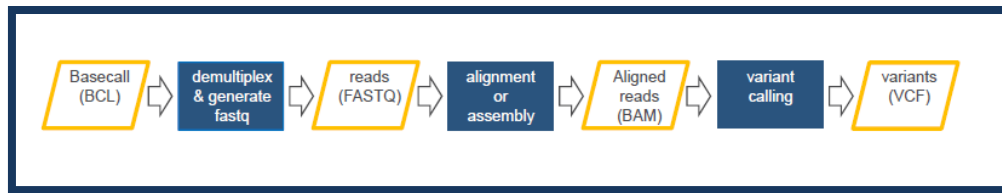


Figura 24. Pasos para la generación de archivos de análisis (Illumina San Diego-USA).

El primer paso consiste en un análisis de la calidad de las secuencias generadas, para ello se utilizan los datos del secuenciador en los cuales se le asigna un valor de calidad a cada nucleótido incorporado a la secuencia. Este valor refleja una probabilidad estimada de error. Los archivos que contienen las secuencias y los valores de calidad asociados a los nucleótidos, son demultiplexados y transformados, mediante el *software* de conversión *bcl2fastq* para crear el formato estándar FASTQ (160). Al cargar los ficheros FASTQ, de una determinada carrera, en el programa *Illumina Sequencing Analysis Viewer 1.10.2* (SAV) nos permite visualizar las métricas de calidad generadas por el secuenciador.

Analizar los datos de calidad que da el secuenciador es importante para valorar la calidad de la carrera o *run*. Se considera que una carrera tiene una calidad buena cuando más del 70% de las secuencias presentan una puntuación Phred de calidad (*Phred Quality Score*) con una puntuación de 30 (Q30), es decir, que la probabilidad de que un determinado nucleótido este asignado erróneamente durante la llamada de base es de 1 entre 1.000 (0,001) (161-162).

Una vez que se ha analizado la calidad de las secuencias obtenidas durante la carrera, se lleva a cabo el alineamiento o mapeo y ensamblado de las secuencias mediante el *software* alineador de secuencias cortas, *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA) (Illumina San Diego-USA), que proporciona las posiciones probables para una determinada secuencia, en el genoma humano de referencia (GRCh37, hg19) con la característica añadida de que con su algoritmo, *swy mem* puede alinear tanto lecturas cortas como las muy largas

(Figura 25). El alineamiento de las secuencias genera archivos llamados *Binary Alignment/Map* (BAM) que permiten su visualización (163-164).

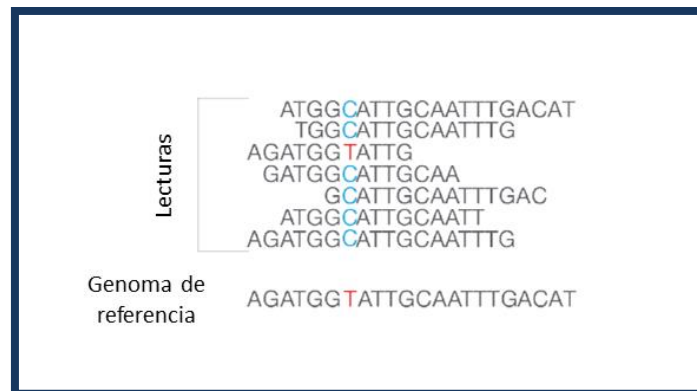


Figura 25. Alineamiento de las secuencias con el genoma humano (hg19) (160).

Para asegurar un correcto alineamiento y subsanar los posibles errores que hayan tenido lugar durante la secuenciación, se emplea la redundancia de fragmentos que significa que los fragmentos son solapantes y que cada base es secuenciada más de una vez. Con esto se consigue una mayor fiabilidad de la secuencia a la hora de alinearla. Al número de veces que se secuencia una determinada base se le llama profundidad o *coverage* (165).

Finalmente, una vez alineadas las secuencias con el genoma de referencia, se identifican las discrepancias existentes entre dichas secuencias y la referencia en un proceso de llamado de variantes o *variant calling* que genera un archivo con formato estandarizado, *variant call format* (VCF), que almacena los tipos más frecuentes de variación de secuencia, incluidos SNP, inserciones y deleciones, variantes estructurales, entre otros, junto con anotaciones que pueden resultar de interés a la hora de interpretar dichas variantes (166).

3.5 Visualización de las secuencias

Una vez obtenidos los archivos de la secuenciación, estos fueron almacenados en la plataforma *DNAnexus* (California-USA) que proporciona una plataforma de análisis y

gestión de datos basada en la nube para datos de secuencias de ADN y que permite acceder a ellos desde cualquier ordenador, solo con los datos de usuario.

La plataforma *DNAexus*, permite descargar los ficheros BAM y VCF correspondientes a cada una de las muestras secuenciadas. Estos ficheros pueden cargarse para su visualización en el *software* gratuito *Integrative Genomics Viewer* (IGV) que es un programa JAVA desarrollado por el Broad Institute para la exploración interactiva de datos genómicos (Figura 26) (167). La visualización en IGV, de las variantes detectadas por el *software*, permitió la confirmación visual de las mismas.

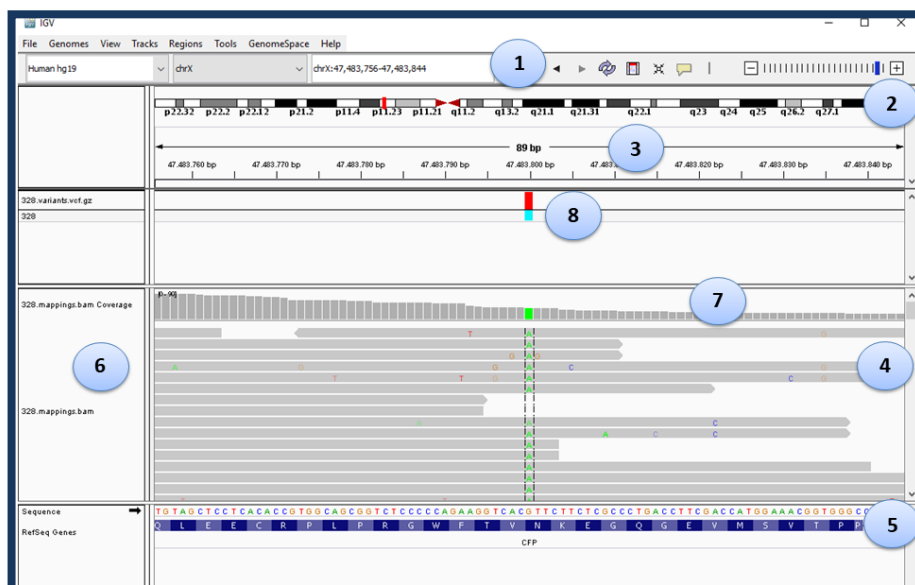


Figura 26. Visualización de los ficheros BAM y VCF con IGV. **1.** Barra de herramientas; **2.** Vista del cromosoma; **3.** Guía de posición; **4.** Lecturas; **5.** Gen; **6.** Nombre de los ficheros cargados; **7.** Cobertura del gen seleccionado; **8.** Variante detectada.

Para considerar una variante detectada por NGS como válida, debe cumplir una serie de características:

- Tener asignada una puntuación de calidad de al menos 250,
- El número de lecturas en la posición de la variante sea igual o superior a 15,
- Si se trata de una variante en heterocigosis, esta debe estar presente en al menos el 40% de las lecturas realizadas para esa posición.

3.6 Sensibilidad, exactitud y especificidad de la NGS

Empleando el método de secuenciación directa de Sanger como patrón de oro (*Gold standard*) se secuenciaron 24 amplicones, pertenecientes a 14 de genes del sistema del complemento y 10 de genes relacionados con las células B, en 40 muestras pertenecientes a 23 pacientes que contenían, al menos, una variante detectada en la NGS (Tabla 7). Con ello se evaluó la sensibilidad, especificidad y exactitud de la técnica para la detección de variantes empleando las siguientes fórmulas:

- Sensibilidad:

$$\frac{VP}{VP + FN}$$

- Especificidad:

$$\frac{VN}{VN + FP}$$

- Exactitud:

$$\frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN}$$

Dónde:

- ✓ VP: verdaderos positivos. Se detectó la variante mediante Sanger y NGS,
- ✓ VN: verdaderos negativos. No se detectó la variante mediante Sanger ni NGS,
- ✓ FP: falsos positivos. Se detectó la variante por NGS pero no por Sanger,
- ✓ FN: falsos negativos. Se detectó la variante mediante Sanger pero no en NGS,

El diseño de los cebadores o *primers* para la secuenciación por el método de Sanger, para los 24 amplicones seleccionados, se realizó con el programa informático *Primer3Plus* (168), empleando como secuencias de referencia las publicadas en la base de datos *GenBank* (GenBank-GRCh37.p9) (169) (Tabla 7) y fijando la longitud de los cebadores

en torno a 20 pb y la cantidad de GC entre un 50-60% para cada par de cebadores. La síntesis de los cebadores fue llevada a cabo por *Invitrogen* (Life Technologies California-USA).

Gen	Secuencia de referencia (GenBank-GRCh37.p9)	Fragmento	Secuencia del primer (5'→3')	Tamaño del amplicón (nt)	Muestras por amplicón
CFHR2	NC_000001.11 (196943752..196959328)	CFHR2Ex3_Fw	tgcagttgtactttttcttgc	270	1
		CFHR2Ex3_Rv	aacagcatctgagagaacaaca		
CR2	NC_000001.11 (207454300..207489895)	CR2Ex5_Fw	tcttcagcacaactgcctaa	274	1
		CR2Ex5_Rv	ggatgctttggtgaagcac		
		CR2Ex16_Fw	aaggccaaaatatgactgtgc	277	1
		CR2Ex16_Rv	ctccgtagccagttacaagc		
CFB	NC_000006.12 (31945944..31952084)	CFBEx10_Fw	cttgaccctcatccttct	244	1
		CFBEx10_Rv	caggggaacctgaggagagt		
PLG	NC_000006.12 (160702193..160754054)	PLGEx15_Fw	ggcttctgtacaatggagca	223	1
		PLGEx15_Rv	ggaaaggaggaaaggaggaa		
A2M	NC_000012.12 (9067708..9115962)	A2MEx3_Fw	caacagcaaatagggaggga	291	1
		A2MEx3_Rv	ggaacatccaggggaagaag		
ITGAM	NC_000016.10 (31259967..31332892)	ITGAMEx8_Fw	ggcaggagaatcacttgagc	395	1
		ITGAMEx8_Rv	ttgcaaattgaaggaggat		
		ITGAMEx20+21_Fw	tgtctgcgtctgttctgc	495	2
		ITGAMEx20+21_Rv	tcccaagaaatcaagagaa		
IGHA1	NC_000014.9 (105707168..105708664)	IGHA1Ex3_Fw	agcagagggctctctcatc	497	8
		IGHA1Ex3_Rv	gggggagcatggagttatt		
C8A	NC_000001.11 (56854770..56918221)	C8AEx10_Fw	ctgtgaggatccaagtggt	483	1
		C8AEx10_Rv	tggctaggagactccaaaa		
CR1	NC_000001.11 (207496128..207641765)	CR1Ex9_Fw	tcagcaaccaatcatagca	370	2
		CR1Ex9_Rv	atatggaggcctgggtag		
C3	NC_000019.10 (6677835..6720682)	C3Ex14_Fw	ctcccaggctgactcttt	242	4
		C3Ex14_Rv	ctccgctctctcagca		
MASP1	NC_000003.12 (187216085..187292220)	MASP1Ex14_Fw	ctgccttcacgtcttctc	398	1
		MASP1Ex14_Rv	caagctttctgggttcaaa		
MBL2	NC_000010.11 (52764977..52772845)	MBL2Ex1_Fw	cagctagagccagggatg	500	1
		MBL2Ex1_Rv	tcacaaactgctgttggaat		
CALR	NC_000019.10 (12938600..12944490)	CALREx9_Fw	atgaggcatagctgaggag	470	1
		CALREx9_Rv	aacccaaatccaccccaaat		
CD38	NC_000004.12 (15778265..15853243)	CD38Ex6_Fw	aggctctagccagtgccttt	325	1
		CD38Ex6_Rv	tgtgggattcatgcacatt		

Tabla 7. Amplicones seleccionados para el cálculo de la sensibilidad, precisión y exactitud de la NGS. Fw: *forward*; Rv: *reverse*; nt: nucleótidos.

Gen	Secuencia de referencia (GenBank-GRCh37.p9)	Fragmento	Secuencia del primer (5'→3')	Tamaño del amplicón (nt)	Muestras por amplicón
MEF2C	NC_000005.10 (88718241..88904105)	MEF2CEx5_Fw	tggaaaaataagggtctctg	398	1
		MEF2CEx5_Rv	ggatggttaagccatgaagga		
ITGA4	NC_000002.12 (181456892..181538928)	ITGA4Ex11_Fw	ttcgaagtgcattcttgt	234	1
		ITGA4Ex11_Rv	aagtccacataaacctggaa		
ATM	NC_000011.10 (108222484..108369102)	ATMEx43_Fw	caccacaccagctgatatt	586	1
		ATMEx43_Rv	gcctaggtgcattaactgctt		
IGLL1	NC_000022.11 (23573125..23580548)	IGLL1Ex1_Fw	gaccagggcaccactctcta	388	1
		IGLL1Ex1_Rv	cctccagggattaaccttcc		
FCER2	NC_000019.10 (7688757..7702755)	FCER2Ex11_Fw	gagaaggagggtgcagac	400	2
		FCER2Ex11_Rv	tcagccacaagaggcttita	499	4
		FCER2Ex9+10_Fw	gccaagcacttcatt		
		FCER2Ex9+10_Rv	tccacggtattccatctcc		
IL4R	NC_000016.10 (27313668..27364778)	IL4REx4_Fw	ctcaggctgctcctgtgtct	240	1
		IL4REx4_Rv	ctggaccagctcactcttg		
IL6R	NC_000001.11 (154405193..154469450)	IL6REx2_Fw	tgtcttctccctcctccaga	373	1
		IL6REx2_Rv	caaggaaatggtggagttt		

Tabla 7 (Continuación). Amplicones seleccionados para el cálculo de la sensibilidad, precisión y exactitud de la NGS. Fw: *forward*; Rv: *reverse*; nt: nucleótidos.

Una vez obtenidos los cebadores, se llevaron a cabo reacciones de PCR, mediante el protocolo reflejado en la Figura 27, para amplificar las secuencias seleccionadas en un termociclador *Veriti™ Dx Thermal Cycler* (Applied Biosystem, California-USA). Las PCR se realizaron a partir de una concentración de 20 ng/μL de ADN molde con la Taq polimerasa *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen-California USA). En todas las pruebas se incluyó un control negativo (CN) para descartar la presencia de contaminaciones en la PCR.

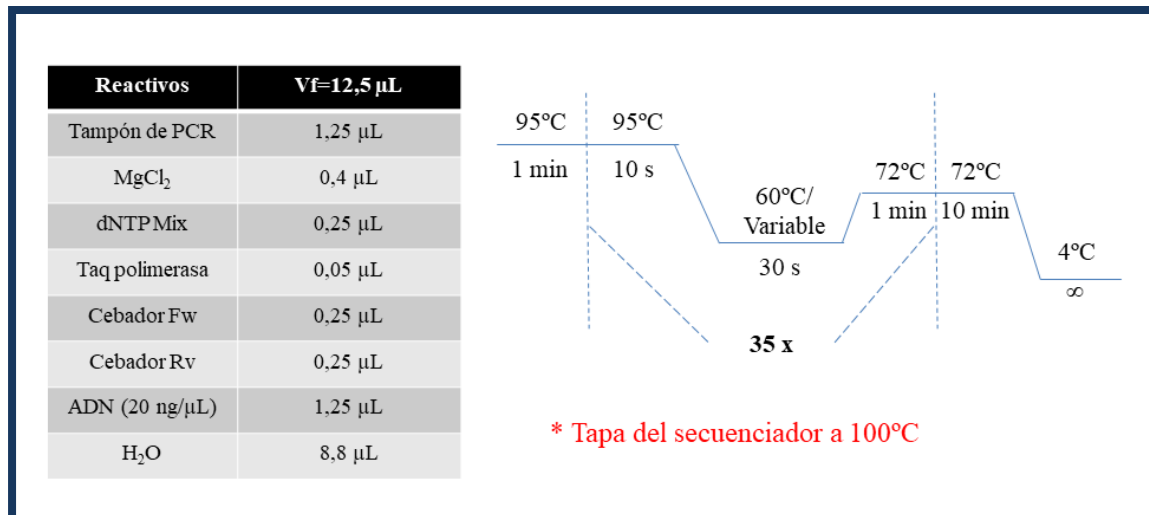


Figura 27. Mezcla de reacción y protocolo de PCR para amplificación de las secuencias. Fw: *forward*; Rv: *reverse*; Vf: volumen final.

Tras la reacción de PCR y con el fin de comprobar que la reacción de amplificación se había llevado a cabo correctamente, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2%, utilizando como marcador de peso molecular, *HyperLadder IV* (Bioline, Londres-UK), que tiene un rango de 100 a 1.000 pb como referencia. El gel se tiñó con *SYBR Green* (4 µL) y la visualización de los resultados se efectuó mediante la exposición de los geles a luz ultravioleta en un transiluminador, captando la imagen resultante mediante el programa informático *Image Reader LAS-3000* (Fujifilm, Tokio-Japón). A continuación, los fragmentos resultantes fueron purificados mediante su tratamiento con el kit *illustra™ ExoProStar™ 1-Step* (Life Science Lutterworth-Reino Unido) que consiste en mezclar 0,6 µL de *ExoProStar 1-Step* con 1,5 µL de la reacción de PCR. La mezcla de reacción resultante se incubó en el termociclador a 37°C durante 15 minutos, seguida de otra incubación a 80°C durante otros 15 minutos para inactivar las enzimas.

Para la reacción de secuenciación, en la cual se obtuvieron las secuencias *forward* y *reverse* de cada fragmento, se empleó el kit *BigDye® Terminator V3 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem, California-USA). La mezcla de reacción y las condiciones de

PCR se hicieron siguiendo los protocolos indicados por el fabricante tal y como se muestra en la Figura 28.

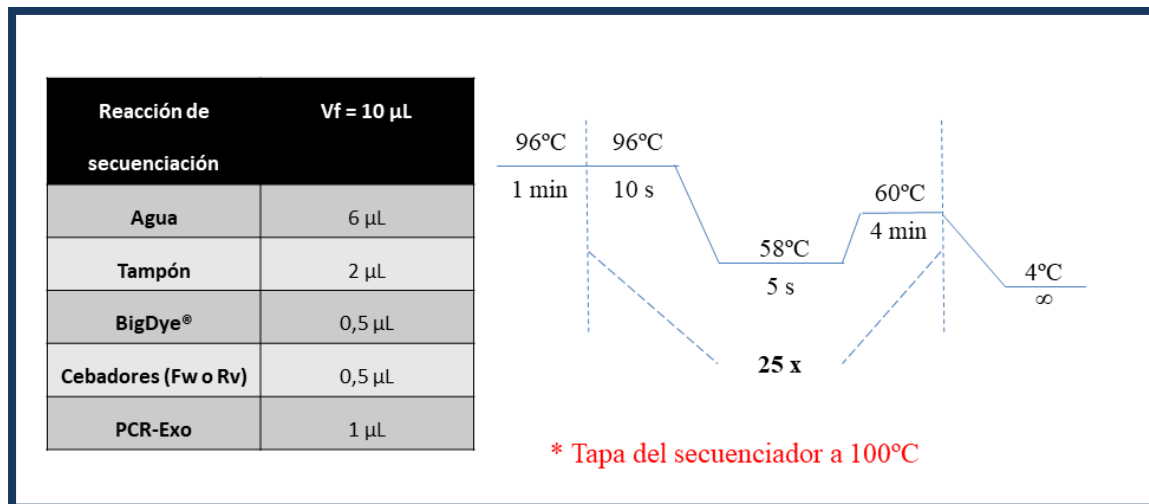


Figura 28. Mezcla de reacción de secuenciación de ADN y protocolo de PCR. Fw: *forward*; PCR-Exo: PCR purificada con *ExoProStar 1-Step*; Rv: *reverse*; Vf: volumen final.

El producto de la reacción de secuenciación, se purificó empleando el kit *Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit* (Millipore Darmstadt-Alemania) mediante un sistema de vacío para eliminar sales contaminantes y restos de tintes terminadores que hayan quedado como residuos en las reacciones de secuenciación de ADN. La electroforesis capilar se realizó en un secuenciador automático *Abi Prism® 3730* (Applied Biosystems, California-USA) de 48 capilares.

Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el programa informático *Variant Reporter* (Applied Biosystem, California-USA), que permite visualizar los electroferogramas obtenidos mediante la electroforesis capilar. Para el análisis, se compararon las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia de la base de datos *Genbank* (GenBank-GRCh37.p9) (169) con el fin de detectar la presencia de variantes, lo cual permitió el cálculo de los parámetros de sensibilidad, exactitud y precisión de la NGS (Figura 29).

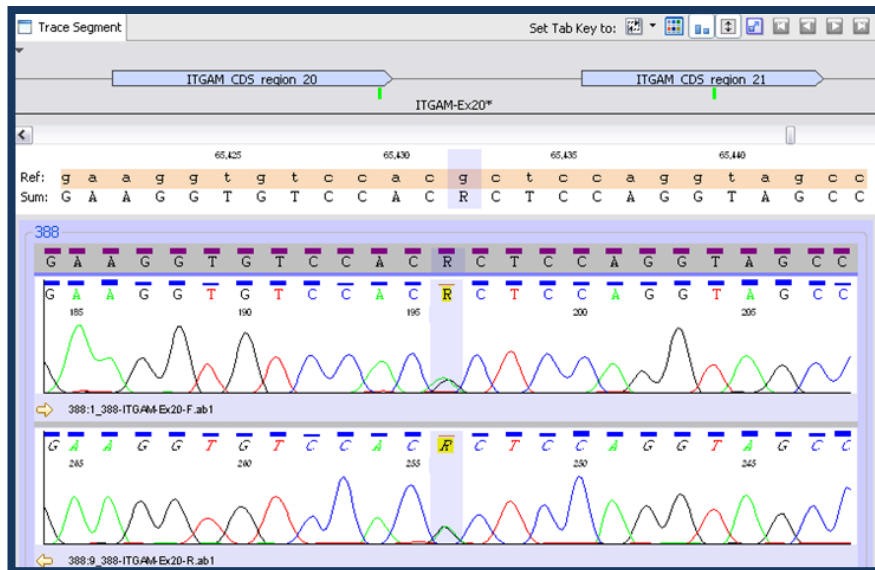


Figura 29. Análisis de las secuencias por el método de Sanger.

3.7 Asociación de variantes con el RMA

3.7.1 Asociación de polimorfismos presentes en receptores y donantes, con el RMA

Una vez identificados todos los SNPs presentes en los receptores y en los donantes, se procedió a analizar si existía alguna asociación entre la presencia de estos SNPs, en el grupo estudiado (receptor o donante), y el RMA. Para ello el primer paso fue crear una base de datos en Excel (Figura 30) en la que se incluyeron los siguientes datos:

- Las muestras analizadas (receptor o donante),
- El grupo al que pertenecía cada muestra (RMA o control),
- La referencia de identificación del SNP (rs) a analizar, señalando en cada caso si la muestra correspondiente, tenía la variante o el alelo salvaje. En los casos en que no se pudo determinar con claridad si la muestra tenía o no la variante, se identificó con las siglas ND (No Disponible).

K13				
	A	B	C	D
1	Muestra	Grupo	rs12072216	rs55867570
2	R1	RMA	C/C	T/T
3	R2	RMA	C/C	C/C
4	R3	RMA	C/C	C/C
5	R4	RMA	C/C	C/C
6	R5	RMA	C/C	C/C
7	R6	RMA	C/C	C/C
8	R7	RMA	C/C	C/C
9	R8	RMA	C/C	C/C
10	R9	RMA	C/C	C/C
11	R10	RMA	C/C	C/C
12	R11	RMA	C/C	T/C
13	R12	RMA	C/C	C/C
14	R13	RMA	C/C	T/C
15	R14	RMA	C/C	C/C
16	R15	RMA	C/C	T/C
17	R16	RMA	C/C	C/C
18	R17	RMA	C/C	C/C
19	R18	RMA	C/C	T/C
20	R19	RMA	C/C	T/C
21	R20	RMA	C/C	C/C
22	R21	RMA	C/C	C/C
23	R22	RMA	C/C	T/C
24	R23	RMA	C/C	T/C
25	R24	Control	C/C	C/C
26	R25	Control	C/C	C/C
27	R26	Control	C/C	C/C
28	R27	Control	C/C	C/C
29	R28	Control	C/C	C/C
30	R29	Control	C/A	C/C
31	R30	Control	C/C	C/C
32	R31	Control	C/G	C/C
33	R32	Control	C/C	T/C
34	R33	Control	C/C	T/C
35	R34	Control	C/C	T/C
36	R35	Control	C/C	C/C
37	R36	Control	C/C	C/C
38	R37	Control	C/C	C/C
39	R38	Control	C/C	C/C
40	R39	Control	C/C	C/C
41	R40	Control	C/C	C/C
42	R41	Control	C/C	T/T
43	R42	Control	C/C	C/C
44	R43	Control	C/C	C/C
45	R44	Control	C/C	C/C
46	R45	Control	C/C	C/C
47	R46	Control	C/C	C/C

K22				
	A	B	C	D
1	Muestras	Grupo	rs13984876	rs11121484
2	D1	RMA	T/T	C/T
3	D2	RMA	T/T	C/T
4	D3	RMA	T/T	T/T
5	D4	RMA	C/T	C/T
6	D5	RMA	T/T	T/T
7	D6	RMA	T/T	T/T
8	D7	RMA	T/T	C/T
9	D8	RMA	T/T	C/T
10	D9	RMA	T/T	T/T
11	D10	RMA	T/T	T/T
12	D11	RMA	T/T	T/T
13	D12	RMA	T/T	T/T
14	D13	RMA	T/T	T/T
15	D14	RMA	T/T	T/T
16	D15	Control	C/T	T/T
17	D16	Control	T/T	T/T
18	D17	Control	T/T	T/T
19	D18	Control	T/T	T/T
20	D19	Control	T/T	T/T
21	D20	Control	T/T	T/T
22	D21	Control	T/T	T/T
23	D22	Control	T/T	T/T
24	D23	Control	T/T	T/T
25	D24	Control	T/T	T/T
26	D25	Control	C/T	T/T
27	D26	Control	C/T	T/T
28	D27	Control	C/T	T/T
29	D28	Control	T/T	T/T

Figura 30. Base de datos para análisis de polimorfismos con *SNPStats*. **A.** Base de datos para asociación entre los SNPs presentes en receptores y el RMA; **B.** Base de datos para asociación entre los SNPs presentes en donantes y el RMA.

Una vez creada la base de datos, fue analizada con el programa informático *SNPStats* que es un *software* diseñado para el análisis de asociación genético-epidemiológico (170).

Una vez el *software* ha reconocido la base de datos, se debe indicar:

- Variable categórica: Muestra,
- Variable respuesta: RMA o Control,
- SNP a analizar: En esta tesis doctoral, se llevó a cabo un análisis para cada SNP detectado.

Una vez incluidos los datos, el análisis realizado con *SNPStats* incluyó:

- Frecuencias alélicas y fenotípicas,
- Asociación del genotipo con la respuesta, en este caso RMA o Control, mediante regresión lineal o logística con análisis de modelos de herencia: codominante, dominante, recesivo, sobredominante y aditivo.

En los casos en los que se encontró una asociación significativa entre un SNP y la respuesta, para cualquiera de los modelos de análisis utilizados con *SNPStats*, el análisis de asociación se repitió con el *software R* (171). Para el análisis genético se empleó el paquete “SNPassoc” que permite realizar análisis de asociación basados en los mismos modelos de herencia empleados por *SNPStats*.

Para el análisis de asociación se emplearon los comandos *myData* y *asociation* para el análisis de los modelos de herencia (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y aditivo).

#En primer lugar se crea una función con los datos para el análisis.

```
NGSB<-read.table("NGSB_R.txt",header=T)
```

#En segundo lugar se creó un objeto de clase *setupSNP*. *colSNPs* especifica en qué columnas se encuentra la información referida a los SNPs.

```
myData<-setupSNP(data=NGSB,colSNPs=3:30,sep="")
```

#En tercer lugar realizamos el análisis de asociación para cada uno de los SNPs

```
association(casco~snp10001, data=myData)
```

#Finalmente se obtiene una tabla de resultados análoga a la obtenida con *SNPStats* (Figura 31).

```

> association(casco~snp(snp10001,sep=""), data=SNPs)

SNP: snp10001, sep = "" adjusted by:
      0   %   1   %   OR lower upper p-value   AIC
Codominant
T/T      24 51.1  68 61.8 1.00                0.1323 193.6
C/T      21 44.7  32 29.1 0.54  0.26  1.11
C/C       2  4.3  10  9.1 1.76  0.36  8.64
Dominant
T/T      24 51.1  68 61.8 1.00                0.2118 194.1
C/T-C/C  23 48.9  42 38.2 0.64  0.32  1.28
Recessive
T/T-C/T  45 95.7 100 90.9 1.00                0.2715 194.4
C/C       2  4.3  10  9.1 2.25  0.47 10.69
Overdominant
T/T      26 55.3  78 70.9 1.00                0.0613 192.1
T/T-C/C  21 44.7  32 29.1 0.51  0.25  1.03
log-Additive
0,1,2    47 29.9 110 70.1 0.87  0.51  1.47  0.5945 195.4

```

Figura 31. Estudios de asociación con el paquete “SNPassoc” de R.

3.7.2 Asociación de la presencia de haplotipos con el RMA

En el caso de que en un mismo gen hubiese varios SNPs, se realizaron análisis para determinar si el conjunto de SNPs se heredaban de forma conjunta, es decir, si conformaban un haplotipo. Para ello, se realizó un análisis con *SNPStats* que incluía:

- Estimación de la frecuencia haplotípica,
- Análisis de asociación entre los haplotipos y la respuesta.

En los casos en los que se obtuvo una asociación significativa entre un haplotipo y el RMA con *SNPStats*, los análisis se repitieron empleando el programa *THESIAS 3.1* que permite estimar simultáneamente las frecuencias de los haplotipos y su efecto en el fenotipo de interés (172) mediante el análisis de:

- Estimación de la frecuencia haplotípica,
- Análisis de asociación entre los haplotipos y la respuesta.

3.7.3 Asociación de polimorfismos presentes en parejas donante-receptor y el RMA

Tras la identificación de los polimorfismos presentes en las parejas donante-receptor, se analizó si la media de las discrepancias era estadísticamente significativa entre el grupo de parejas con RMA y el grupo control, empleando para ello el *software* de *R* para realizar la prueba U de Mann-Whitney, empleando los siguientes comandos:

```
# Para llevar a cabo la prueba U de Mann-Whitney, se empleó el comando wilcox.test.
```

```
Con_RMA<-c(cantidad total de discrepancias en cada pareja donante-receptor con RMA)
```

```
control<-c(cantidad total de discrepancias en cada pareja donante-receptor control)
```

```
wilcox.test(Con_RNA,control)
```

A continuación, empleando el programa *EPIDAT 3.0*, se comparó la frecuencia de los SNPs encontrados en las parejas donante-receptor, teniendo en cuenta solo aquellos que presentaban una frecuencia del alelo minoritario (*Minor allele frequency*, MAF) superior al 7%, es decir, que la variante estuviese presente en al menos 5 de los 56 pacientes estudiados. Los análisis se llevaron a cabo mediante tablas de contingencia empleando el test χ^2 , estableciendo 4 grupos en las parejas donante-receptor con RMA y control:

- 1.) D+/R+,
- 2.) D+/R-,
- 3.) D-/R+,
- 4.) D-/R-.

En estos grupos + hace referencia a la presencia de la variante, mientras que - hace referencia al alelo de referencia.

En los casos en que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, se llevó a cabo otro análisis en *EPIDAT 3.0* diferenciando únicamente si en las

parejas donante-receptor se encontraba el polimorfismo o no y si existía alguna relación entre esto y el RMA:

- 1.) D-/R-,
- 2.) D+/R+ o D+/R- o D-/R+.

En estos grupos + hace referencia a la presencia de la variante, mientras que - hace referencia al alelo de referencia. Los análisis se llevaron a cabo mediante tablas de contingencia empleando el test exacto de Fisher para establecer comparaciones entre ambos grupos.

3.8 Consulta de información en bases de datos de las variantes detectadas

Se realizaron búsquedas de información, sobre las variantes encontradas, en las principales bases de datos:

A. Consulta de MAF

Las MAF de los SNPs detectados en la NGS, fueron consultadas en las bases de datos *Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP) y *The Exome Aggregation Consortium* (ExAC),

B. Consulta de dominios

Se empleó la base de datos *Uniprot*, que proporciona intervalos de residuos, generalmente aceptados, correspondientes a cada región de dominio y subregión especializada.

C. Consulta asociación a patología

Se comprobó la base de datos *ClinVar* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) (173) para buscar información sobre el efecto de las variantes *missense* detectadas.

3.9 Herramientas *in silico*

Se llevaron a cabo estudios *in silico* con el fin de visualizar y predecir el efecto potencial de las variantes asociadas con el RMA.

3.9.1 Visualización de las variantes en modelos 3D

La localización topológica de las variantes *missense* se realizó utilizando la base de datos *Swissprot* (<http://ca.expasy.org/uniprot/>) con la ayuda de la información obtenida de la base de datos de *Uniprot*.

El programa *Swiss-Pdb Viewer* (v.4.10) (174) se empleó para generar los modelos de la estructura de la proteína, reemplazando el aminoácido nativo por la variante. Los archivos .pbd (1HUP-MBL, 1IAR-IL4R α), con las informaciones estructurales de la proteína, provenientes del *Protein data Bank* (PDB), se guardaron para generar el modelo.

3.9.2 Predictores de efecto para la sustitución aminoacídica

Se emplearon 5 predictores para estimar la patogenicidad de la variante en la expresión proteica:

- 1) *Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)* (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html) (175),
- 2) *Polymorphism Phenotyping (Polyphen-2)* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (176),
- 3) *Predictor of human Deleterious Single Nucleotide Polymorphisms (PhDSNP)* (<http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html>) (177),
- 4) *SNAP2* (<https://www.rostlab.org/services/snap/>) (178),
- 5) *MutationTaster* (<http://www.mutationtaster.org>) (179).

3.9.3 Predictores del efecto de la variante en el *splicing*

Para evaluar el posible efecto de las variantes sinónimas en las regiones cercanas al *splicing* (± 6 pb), así como la modificación del sitio de *splicing*, se emplearon 5 predictores informáticos:

- 1) *GeneSplicer* (<http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/>) (180),
- 2) *NetGene2* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) (181),
- 3) *ESEfinder 3.0* (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>) (182),
- 4) *Splice Site Prediction (SSP)* (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) (183),
- 5) *Human Splicing Finder Splice site analysis (HSF)* (<http://www.umd.be/HSF/>) (184).

3.10 Estudios de expresión

Para los estudios de expresión de proteínas, llevados a cabo en los receptores, se empleó el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA), que permite cuantificar la cantidad de proteína presente en la muestra empleada mediante una reacción, generalmente colorimétrica, que puede ser medida mediante espectrofotometría. En esta tesis doctoral, se han analizado sueros pre-TC para evitar el efecto que el tratamiento inmunosupresor, suministrado a los pacientes tras el TC, pudiese influir en la expresión proteica.

3.10.1 Estudio de expresión para la proteína MBL

Para evaluar si la variante identificada en el gen *MBL2* podía alterar la expresión de la proteína MBL, se utilizaron muestras de suero pre-TC de 9 receptores:

- 5 muestras de receptores que desarrollaron RMA y que tenían el alelo de referencia en la posición genómica c.161G,
- 4 muestras de receptores control con la variante c.161G>A.

Se midieron los niveles de expresión de MBL, siguiendo las instrucciones del kit comercial MBL, *Human, ELISA kit HK323-01* de la compañía Hycult® biotech (Uden, Netherlands) que tiene un rango de medida para esta proteína entre 0,41 y 100 ng/mL. En la Figura 32 se puede ver un esquema general del flujo de trabajo.

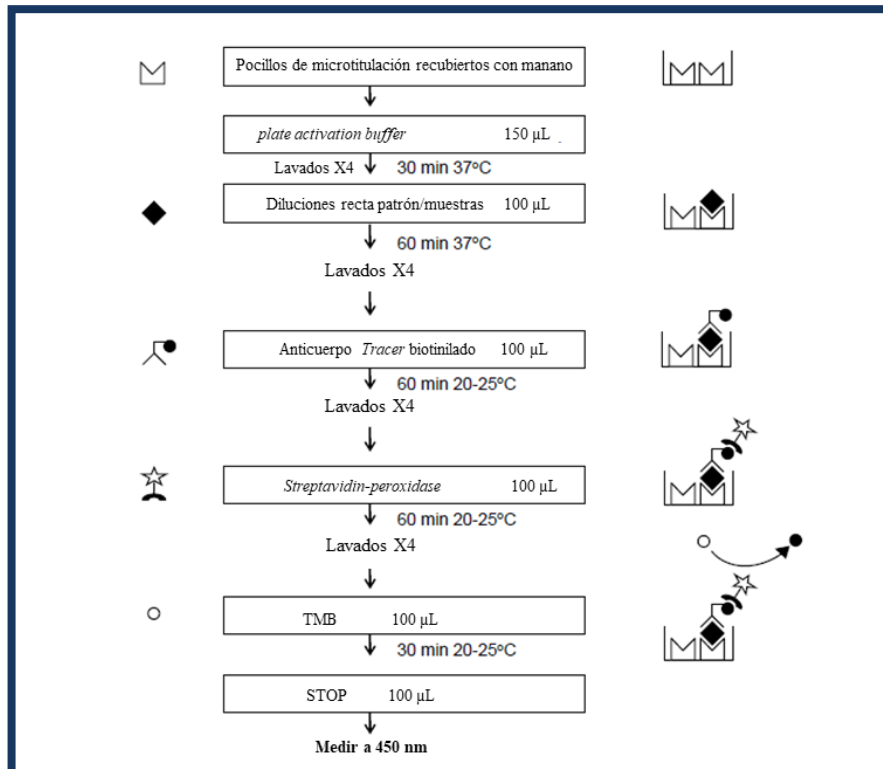


Figura 32. Esquema realización ELISA para proteína MBL (Hycult® biotech, Uden-Netherlands).

Brevemente el protocolo seguido fue:

1. Se colocaron las tiras de pocillos para las 9 muestras y los *standards* en el soporte,
2. Las muestras de suero se diluyeron 1:10 con tampón *MBL-binding buffer* y todas las mediciones se realizaron por duplicado,
3. El *standard* 1 liofilizado, se reconstituyó siguiendo las instrucciones del fabricante, añadiendo 1 mL de tampón *MBL-binding buffer*. A partir del *standard* 1, se prepararon 6 diluciones seriadas que conformaron la recta patrón junto con un blanco conformado únicamente por 225 µL de tampón (Figura 33),

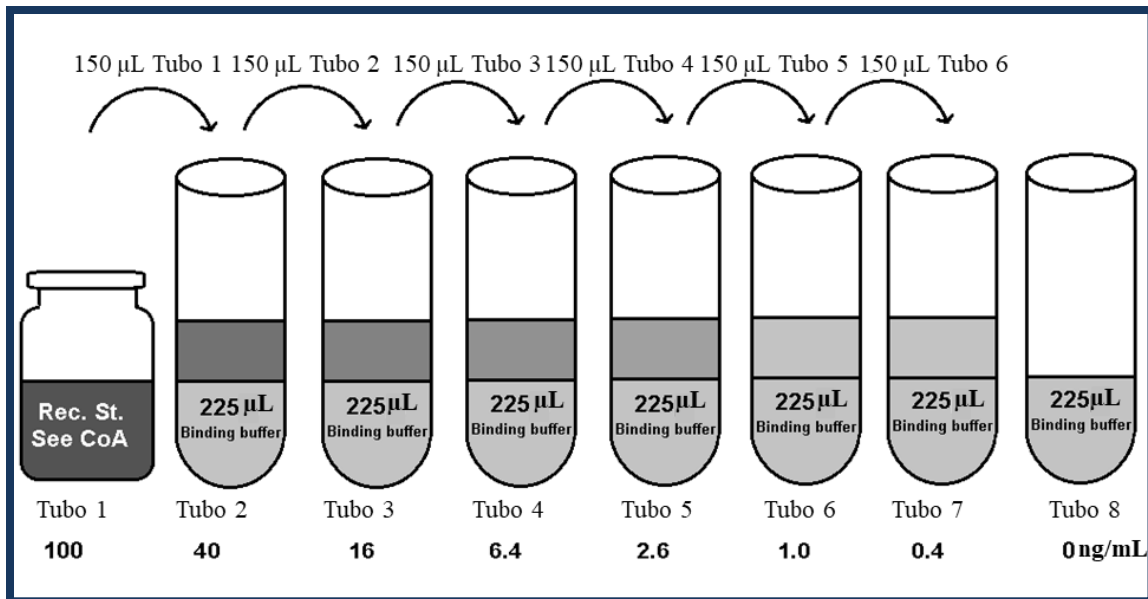


Figura 33. Recta patrón ELISA MBL (Hycult® biotech, Uden-Netherlands).

4. Se transfirieron 150 µL del tampón *plate activation buffer* previamente diluido, intentando no tocar las paredes de los pocillos,
5. Se cubrieron los pocillos con un *film* adhesivo sin dejar burbujas,
6. Se incubó a 37°C durante 30 minutos,
7. Se lavaron los pocillos 4 veces con solución de lavado :
 - a. Se quitó el *film* adhesivo,
 - b. Se vació el contenido de los pocillos invirtiendo la placa y se secó sobre papel de celulosa,
 - c. Se añadieron a cada pocillo 200 µL de solución de lavado, incubación 20 segundos y se vació la placa por inversión,
 - d. Se repitieron los pasos 7b y 7c tres veces más,
 - e. Se vació la placa y se secaron los pocillos con papel de celulosa.
8. Se transfirieron 100 µL de los *standards* que conforman la recta patrón y las muestras, por duplicado, a los correspondientes pocillos de la placa,
9. Se cubrieron los pocillos con un *film* adhesivo sin dejar burbujas,
10. Se incubó a 37°C durante 1 hora,

11. Se repitieron los lavados tal y como se describen en el paso 7,
12. Se añadieron 100 μ L de la solución *Tracer* previamente diluida, se cubrieron los pocillos con el *film* adhesivo y se incubó 1 hora a temperatura ambiente,
13. Se repitieron los lavados tal y como se describen en el paso 7,
14. Se añadieron 100 μ L de *streptavidin-peroxidase* previamente diluida, se cubrieron los pocillos con el *film* adhesivo y se incubó 1 hora a temperatura ambiente,
15. Se repitieron los lavados tal y como se describen en el paso 7,
16. Se añadieron 100 μ L de sustrato TMB y se incubó hasta un máximo de 30 minutos, en oscuridad y agitación. En este paso fue muy importante controlar la reacción colorimétrica para detener la reacción antes del punto de saturación,
17. Se detuvo la reacción añadiendo 100 μ L de la solución de STOP y se agitó brevemente para mezclar homogéneamente,
18. Finalmente se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro.

3.10.2 Estudio de expresión para la proteína properdina

En el caso de la proteína properdina, para evaluar si la expresión se veía alterada por la presencia de la variante c.1284C>T, se emplearon muestras de 16 receptores:

- 5 muestras de receptores con RMA y la variante c.1284C>T,
- 11 muestras de receptores control con la base de referencia (c.1284C).

El estudio se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el kit comercial *Properdin, Human, ELISA kit HK334-01* de la compañía Hycult® biotech (Uden, Netherlands). En este caso, el rango de medida del kit era de 0,3 a 20 ng/mL. En la Figura 34 se puede ver un esquema general del flujo de trabajo.

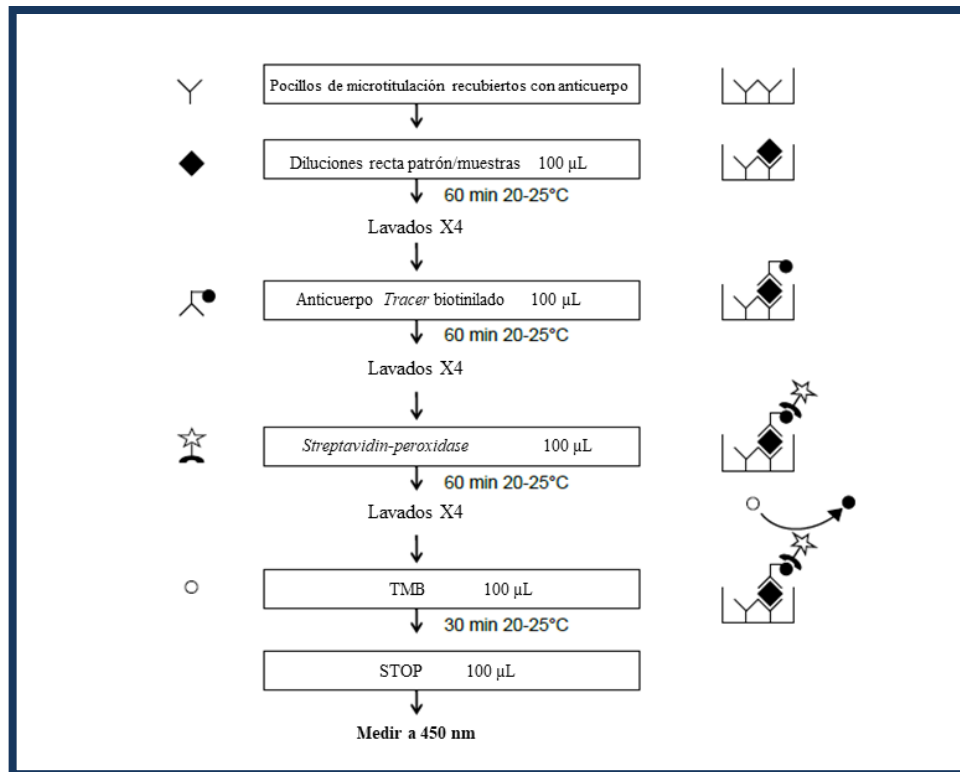


Figura 34. Esquema realización ELISA para proteína properdina (Hycult® biotech, Uden-Netherlands).

Brevemente el protocolo seguido fue:

1. Se colocaron las tiras de pocillos para las 16 muestras y los *standards* en el soporte,
2. Las muestras de suero fueron diluidas 1:2.000 con el tampón de dilución y todas se hicieron por triplicado,
3. El *standard* 1 liofilizado, se reconstituyó siguiendo las instrucciones del fabricante, añadiendo 1 mL de tampón *dilution buffer*. A partir del *standard* 1, se prepararon 6 diluciones seriadas que conformaron la recta patrón, junto con un blanco conformado únicamente por 225 µL de tampón (Figura 35),

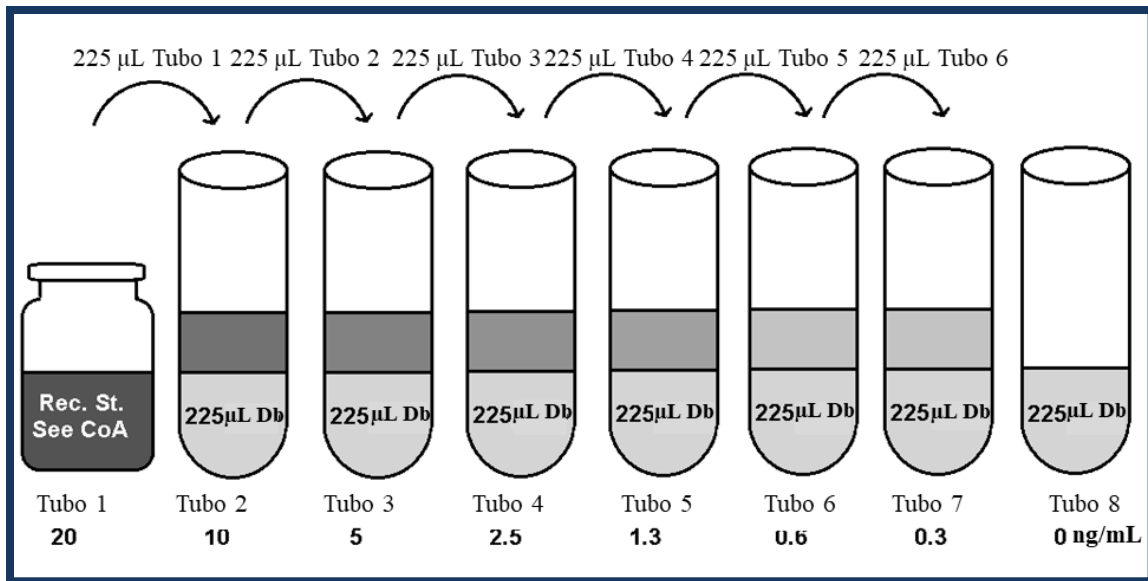


Figura 35. Recta patrón ELISA properdina (Hycult® biotech Uden-Netherlands).

4. Se transfirieron 100 µL de los *standards* que conforman la recta patrón y las muestras por triplicado a los correspondientes pocillos de la placa,
5. Se cubrieron los pocillos con un *film* adhesivo sin dejar burbujas,
6. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente,
7. Se lavaron los pocillos 4 veces con solución de lavado :
 - a. Se quitó el *film* adhesivo,
 - b. Se vació el contenido de los pocillos invirtiendo la placa y se secó sobre papel de celulosa,
 - c. Se añadieron a cada pocillo 200 µL de solución de lavado, incubación 20 segundos y se vació la placa por inversión,
 - d. Se repitieron los pasos 7b y 7c tres veces más,
 - e. Se vació la placa y se secaron los pocillos con papel de celulosa.
8. Se añadieron 100 µL de la solución *Tracer* previamente diluida, se cubrieron los pocillos con el *film* adhesivo y se incubó 1 hora a temperatura ambiente,
9. Se repitieron los lavados tal y como se describen en el paso 7,

10. Se añadieron 100 μ L de *streptavidin-peroxidase* previamente diluida, se cubrieron los pocillos con el *film* adhesivo y se incubó 1 hora a temperatura ambiente,
11. Se repitieron los lavados tal y como se describen en el paso 7,
12. Se añadieron 100 μ L de sustrato TMB y se incubó hasta un máximo de 30 minutos, en oscuridad y agitación. En este paso fue muy importante controlar la reacción colorimétrica para detener la reacción antes del punto de saturación,
13. Se detuvo la reacción añadiendo 100 μ L de la solución de STOP y se agitó brevemente para mezclar homogéneamente,
14. Finalmente se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro.

3.10.3 Estudio de expresión para la proteína integrina α 4

Los niveles de expresión de integrina α 4 fueron medidos empleando el kit comercial *ITGA4, Human, ELISA Kit* (OKEH01078) de Aviva Systems Biology (San Diego, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon sueros pre-TC de 16 receptores:

- 8 pacientes control con el haplotipo de referencia GAC-ITGA4,
- 8 pacientes con RMA y el haplotipo AGT-ITGA4.

El rango de medida del kit comercial era de 0,156 a 10 ng/mL. En la Figura 36 se muestra un esquema general del flujo de trabajo que se detalla a continuación.

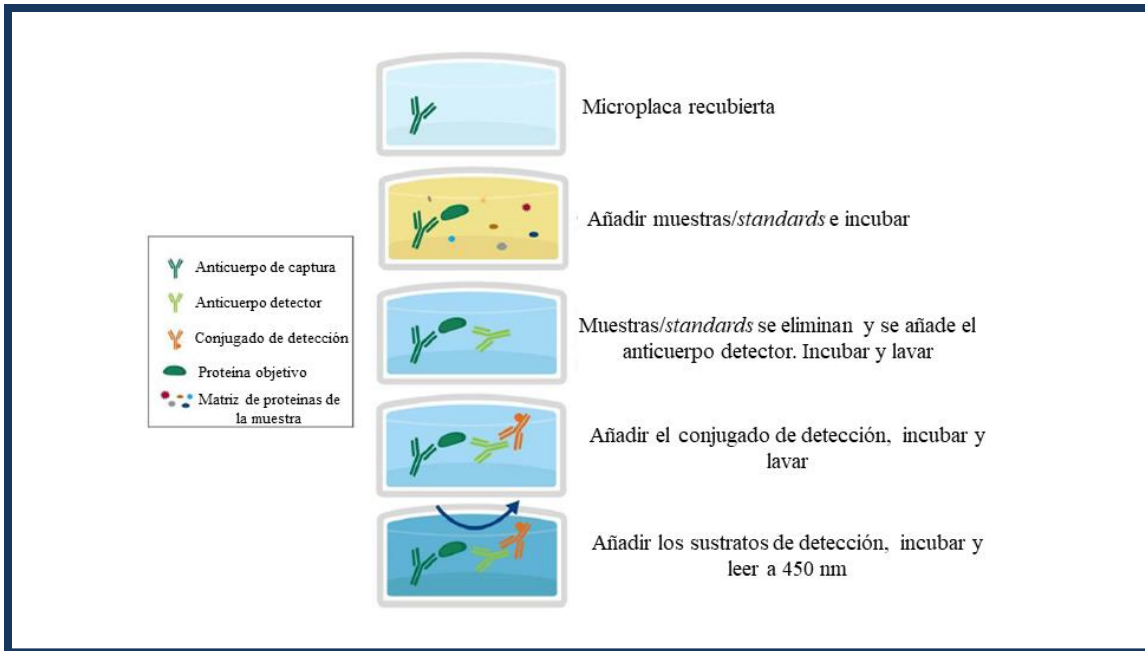


Figura 36. Esquema realización ELISA para proteína integrina $\alpha 4$ (Aviva Systems Biology, San Diego-USA).

Brevemente el protocolo seguido fue:

1. Las muestras de suero fueron medidas por duplicado sin ninguna dilución,
2. El *standard* 1 liofilizado, se reconstituyó siguiendo las instrucciones del fabricante, añadiendo 1 mL de tampón *Sample Diluent*. A partir del *standard* 1, se prepararon 6 diluciones seriadas que conformaron la recta patrón, más un tubo con 600 μL de tampón que se empleó como blanco (Figura 37),

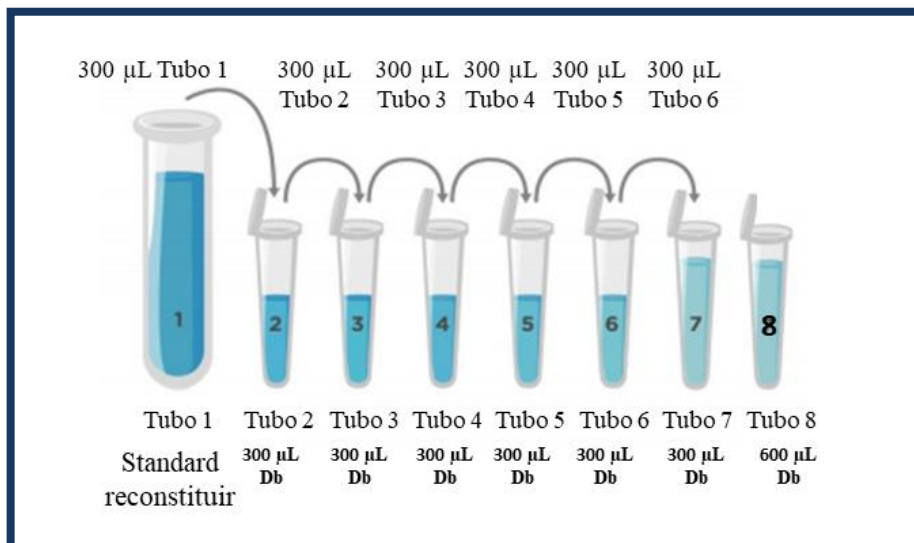


Figura 37. Recta patrón ELISA ITGA4 (Aviva Systems Biology, San Diego-USA).

3. Se transfirieron 100 μL de los *standards* que conforman la recta patrón y las muestras por duplicado a los correspondientes pocillos de la placa,
4. Se cubrieron los pocillos con un *film* adhesivo sin dejar burbujas,
5. Se incubó durante 2 horas a 37°C,
6. Se vació la placa invirtiéndola y se secó sobre una capa gruesa de papel de celulosa,
7. Se añadieron 100 μL de *1x Biotinylated ITGA4 Detector Antibody* a cada pocillo, se cubrieron los pocillos con el *film* adhesivo y se incubó 1 hora a 37°C,
8. Se realizaron 3 rondas de lavado con *1x Wash Buffer*:
 - a. Se añadieron 300 μL de *1x Wash Buffer* a cada pocillo,
 - b. Se incubó 1 minuto a temperatura ambiente,
 - c. Se vació la placa y se secó con papel de celulosa,
 - d. Se repitieron los pasos 8b y 8c dos veces más,
 - e. Se vació la placa y se secó con papel de celulosa.
9. Se añadieron 100 μL de *1x Avidin-HRP Conjugate* a cada pocillo, se cubrieron los pocillos con el *film* adhesivo y se incubó 1 hora a 37°C,
10. Se repitieron los lavados 5 veces con *1x Wash Buffer* tal y como se describe en el paso 8,
11. Se añadieron 90 μL de sustrato TMB y se incubó hasta un máximo de 30 minutos, en oscuridad y agitación. En este paso fue muy importante controlar la reacción colorimétrica para detener la reacción antes del punto de saturación,
12. Se detuvo la reacción añadiendo 50 μL de la solución de STOP y se agitó brevemente para mezclar homogéneamente,
13. Finalmente se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro.

3.11 Análisis estadístico

Las variables continuas como la edad y el tiempo de seguimiento post-trasplante, se expresaron como la media \pm desviación estándar (d.e.), mientras que las variables discretas se mostraron como porcentajes.

A. Análisis de asociación de polimorfismos con el RMA, en receptores y donantes

En los análisis de asociación, realizados con *SNPStats* y *R*, la asociación entre los SNPs se estimó mediante razón de probabilidad u *odds ratio* (OR), intervalos de confianza (IC) del 95%, criterios de información Akaike (AIC), criterios de información bayesianos (BIC) y el p-valor establecido en 0,05. En los casos en los que se encontró asociación significativa entre el SNP y el RMA, tanto con *R* como con *SNPStats*:

- En el caso de los receptores en el cual las muestras estaban pareadas, se realizó el test de McNemar en *R* para estudiar las diferencias entre las frecuencias alélicas y fenotípicas existentes entre los pacientes con RMA y su correspondiente control:

Para llevar a cabo el test de McNemar en *R*, se empleó el comando *mcnemar.test*.

Se construyó la matriz x con los datos del SNP estudiado en los 46 receptores. Cada entrada de la matriz representa una pareja (RMA-control). Los símbolos + y - hacen referencia a los pacientes que portan la variante y los que no.

		Control		
		+	-	Total
RMA	+	Número de parejas en la que el SNP está presente en ambos (y1)	Número de parejas en las que el SNP está presente en el RMA pero no en el control (y2)	Total de la fila
	-	Número de parejas en las que el SNP está presente en el control pero no en el RMA (y3)	Número de parejas en las que el SNP está ausente en ambos (y4)	Total de la fila
Total		Total de la columna	Total de la columna	Total de la fila/columna

```
x<-matrix(c(y1,y2,y3,y4),filas n°, columnas n°)
```

```
mcnemar.test(x)
```

- En el caso de los donantes, al no tratarse de muestras pareadas, se llevó a cabo en *R* el test exacto de Fisher para estudiar las diferencias entre las frecuencias alélicas y fenotípicas:

```
# Para llevar a cabo el test exacto de Fisher en R, se empleó el comando fisher.test.
```

```
Casco<-c(rep("RMA",n° de pacientes con RMA),rep("Control",n° de pacientes control))
```

```
SNP<-c(rep("genotipo1",n° pacientes con RMA y el genotipo 1),rep("genotipo2",n° de
pacientes con RMA y el genotipo 2),rep("genotipo1", n° de pacientes control y el
genotipo 1),rep("genotipo2", n° de pacientes control y el genotipo 2))
```

```
.Table_est<-table(Casco,SNP)
```

```
.Table_est
```

```
fisher.test(.Table_est)
```

B. Análisis de asociación de polimorfismos con el RMA, en las parejas donante-receptor

Por otra parte, para identificar genotipos asociados con el riesgo de RMA en las parejas donante-receptor, en los genes relacionados con la vía del complemento y la biología de las células B, se realizó el test exacto de Fisher con el *software EPIDAT 3.0*. Se fijó un $p\text{-valor} \leq 0,05$. Además se analizó el número de discrepancias totales existentes entre ambos grupos (parejas con RMA vs parejas control) mediante la prueba U de Mann-Whitney para valores no distribuidos normalmente, utilizando el *software R*, tal y como se describió en el apartado 3.7.3.

C. Análisis estadísticos para los estudios de expresión proteica

Para el análisis de niveles séricos obtenidos en los experimentos de expresión proteica, los valores se expresaron como mediana y primer y tercer cuartil (Q1-Q3). Para evaluar la importancia de las diferencias en los niveles séricos de proteína, la prueba U de Mann-Whitney para valores no distribuidos normalmente se realizó utilizando el *software R*, empleando los siguientes comandos:

Para llevar a cabo el test exacto de Fisher en *R*, se empleó el comando *wilcox.test*.

```
Con_SNP<-c(valores obtenidos en el ELISA para los pacientes con el SNP)
```

```
Sin_SNP<-c(valores obtenidos en el ELISA para los pacientes sin el SNP)
```

```
wilcox.test(Con_SNP,Sin_SNP)
```

Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

4.1 Características clínicas

4.1.1 Características clínicas de los pacientes seleccionados

Las características demográficas, incluyendo las principales características clínicas y los datos del régimen inmunosupresor, de los 46 receptores seleccionados se recogen en la Tabla 8. La proporción de varones en la muestra es del 86,96% y la media de edad de los receptores, en el momento del TC era de $50,11 \pm 15,97$ años. El tiempo de seguimiento medio post-TC fue de $7,28 \pm 3,58$ años, siendo la patología de base más frecuente en estos pacientes la cardiopatía isquémica (39,13%).

El tratamiento inmunosupresor más común fue con esteroides (100%) y micofenolato de mofetilo (91,30%); mientras que el tratamiento frente al RMA más empleado fue la plasmaféresis (65,22%) y el rituximab (65,22%). Los datos de las pruebas serológicas para citomegalovirus reflejan que el 58,70% de los receptores y sus correspondientes donantes, son positivos para la presencia de anticuerpos contra el virus CMV.

Usando la clasificación histopatológica para los pacientes con RMA posterior al 2013 (n=8) (53): 4 de los pacientes fueron clasificados como pRMA1(I+) y 4 como pRMA2 y el tiempo medio transcurrido desde el TC hasta el RMA fue de $3,52 \pm 0,64$ años.

Variable	Total (n=46 pacientes)	RMA (n=23 pacientes)	Control (n=23 pacientes)
Edad±d.e. (años)	50,11±15,97	50,21±16,45	50,01±15,85
Hombres	86,96% (40)	86,96% (20)	86,96% (20)
Mujeres	13,04% (6)	13,04% (3)	13,04% (3)
<u>Enfermedad de base</u>			
Cardiopatía dilatada	34,78% (16)	26,09% (6)	43,48% (10)
Cardiopatía isquémica	39,13% (18)	52,17% (12)	26,09% (6)
Cardiopatía valvular	10,86% (5)	8,70% (2)	13,04% (3)
Otras	15,22% (7)	13,04% (3)	17,39% (4)
<u>Tiempo desde el TC (años)</u>			
<2 años	10,42% (5)	17,39% (4)	4,35% (1)
2-5 años	23,91% (11)	30,43% (7)	17,39% (4)
≥6 años	65,22% (30)	52,17% (12)	78,26% (18)
Tiempo transcurrido hasta el diagnóstico de RMA (años)		3,52±0,64	
<u>Citomegalovirus % (No.)</u>			
Donante y Receptor +	58,70% (27)	56,52% (13)	60,87% (14)
Donante y Receptor -	2,17% (1)	0	4,35% (1)
Donante +/Receptor -	23,91% (11)	30,43% (7)	17,39% (4)
Donante - / Receptor +	13,04% (6)	13,04% (3)	13,04% (3)
Sin datos	2,17% (1)	0	4,35% (1)
<u>Inmunosupresión</u>			
Ciclosporina	75,00% (36)	75,00% (18)	75,00% (18)
Esteroides	100% (46)	100% (23)	100% (23)
Micofenolato de mofetilo	91,30% (42)	86,95% (20)	95,65% (22)
Tacrolimus	56,52% (26)	65,22% (15)	47,38% (11)
Everolimus	32,61% (15)	26,09% (6)	39,13% (9)
Basiliximab	89,13% (41)	82,60% (19)	95,65% (22)
Daclizumab	4,35% (2)	4,35% (1)	4,35% (1)
OKT3	6,52% (3)	12,50% (3)	0
Plasmaféresis	32,61% (15)	65,22% (15)	0
Rituximab	32,61% (15)	65,22% (15)	0

Tabla 8. Datos demográficos de los receptores seleccionados.

4.1.2 Características clínicas de los donantes y de las parejas donante-receptor

Las características demográficas de las parejas de donantes y receptores seleccionados (n=56), así como las principales características clínicas, se muestran en la Tabla 9. La proporción de varones en la muestra es del 78,60% en los receptores y de 67,86% en los donantes y la enfermedad de base más común en ambos grupos de receptores, con RMA y control, fue la cardiopatía isquémica presente en un 42,90% y un 35,70%, respectivamente. La media de edad de los receptores con RMA, en el momento del TC de 45,70±4,90 años y la de sus correspondientes donantes de 46,50±3,20 años. Por su parte, la media de edad de los pacientes control, en el momento del TC era de 45,30±4,70 años; mientras que la de sus donantes era de 36,30±2,90 años.

El tiempo de seguimiento medio post-TC era de $7,28 \pm 3,58$ años y el tratamiento inmunosupresor más común consistió en el uso de esteroides (100%) y de basiliximab (92,60%) en todos los receptores y de plasmaféresis y rituximab (51,10%) en aquellos que presentaron RMA.

En este caso, se emplearon 28 receptores de los cuales había disponible muestras biológicas de sus correspondientes donantes. Usando la clasificación histopatológica para los pacientes con RMA posterior al 2013 (n=7) (53): 4 de los pacientes fueron clasificados como pRMA1(I+) y 3 como pRMA2 y el tiempo medio transcurrido desde el TC hasta el RMA fue de $2,40 \pm 0,60$ años.

Variable	RMA		Control	
	Receptores (n=14)	Donantes (n=14)	Receptores (n=14)	Donantes (n=14)
Edad \pm d.e. (años)	45,70 \pm 4,90	46,50 \pm 3,20	45,30 \pm 4,70	36,30 \pm 2,90
Hombres	78,60% (11)	64,30% (9)	78,60% (11)	71,40% (10)
Mujeres	21,40% (3)	35,70% (5)	21,40% (3)	28,60% (4)
<u>Enfermedad de base</u>				
Cardiopatía dilatada	21,40% (3)		28,60% (4)	
Cardiopatía isquémica	42,90% (6)		35,70% (5)	
Cardiopatía valvular	7,10% (1)		7,10% (1)	
Otras	28,60% (4)		28,60% (4)	
<u>Tiempo desde el TC (años)</u>				
<2 años	28,60% (4)		7,10% (1)	
2-5 años	28,60% (4)		14,30% (2)	
\geq 6 años	42,90% (6)		78,60% (11)	
Tiempo transcurrido hasta el diagnóstico de RMA (años)	2,40 \pm 0,60			
<u>Citomegalovirus % (No.)</u>				
Donante y Receptor +	64,30% (9)		64,30% (9)	
Donante y Receptor -	0		0	
Donante +/Receptor -	21,40% (3)		28,60% (4)	
Donante - / Receptor +	14,30% (2)		7,10% (1)	
<u>Inmunosupresión</u>				
Ciclosporina	57,10% (8)		28,60% (4)	
Esteroides	100% (14)		100% (14)	
Micofenolato de mofetilo	85,70% (12)		92,90% (13)	
Tacrolimus	78,60% (11)		50,00% (7)	
Everolimus	35,70% (5)		42,90% (6)	
Basiliximab	92,60% (13)		92,60% (13)	
Daclizumab	0		7,10% (1)	
Timoglobulina	7,10% (1)		0	
Plasmaféresis	51,10% (8)		0	
Rituximab	51,10% (8)		0	

Tabla 9. Datos demográficos de las parejas donante-receptor seleccionadas.

4.2 Calidad de las secuencias

4.2.1 Puntuación de Phred de calidad (Q30)

En esta tesis doctoral, se secuenciaron un total de 7 *pools*, 12 muestras por *pool*, que contenían las 74 muestras analizadas en esta tesis doctoral. La precisión de las llamadas de base, es decir, el procedimiento por el cual se asigna una determinada base de forma correcta durante la secuenciación en la plataforma *NextSeq® 500* (Illumina San Diego-USA), reflejó una puntuación de calidad $Q > 30$, lo que significa que la probabilidad de una llamada de base incorrecta es de 1 en 1000 lecturas, con una precisión de llamada de base del 99,9%. El valor Q30 para cada uno de los 7 *pools* realizados en esta tesis doctoral se muestra en la Tabla 10, siendo el valor medio para todos los *pools* de $79,30 \pm 2,05\%$.

Nº de <i>pool</i>	Puntuación Q30 (%)
<i>pool 1</i>	77,10%
<i>Pool 2</i>	79,20%
<i>Pool 3</i>	75,00%
<i>Pool 4</i>	90,30%
<i>Pool 5</i>	81,50%
<i>Pool 6</i>	77,70%
<i>Pool 7</i>	74,30%

Tabla 10. Puntuación Q30 para los 7 *pools* secuenciados.

4.2.2 Sensibilidad, exactitud y especificidad de la NGS

Para estudiar la sensibilidad, exactitud y especificidad de la NGS, se seleccionaron 14 genes del sistema del complemento y 10 genes relacionados con las células B, que contenían al menos una variante detectada en la NGS y se secuenciaron 24 amplicones (Tabla 7) por el método de Sanger. Tras la secuenciación, se visualizaron 12.518 bases,

de las cuales 12.463 eran VN, 52 VP y 3 FN lo que indicó una sensibilidad del 94%, una exactitud del 99,9% y una especificidad del 100% para la NGS.

Tras analizar los FN detectados por el método de Sanger, se observó que todos aparecían en el gen *IGHA1*, en la posición chr14:106.173.808. Sin embargo, al visualizar esa posición con el programa *IGV*, se observó que sí se había detectado la variante mediante NGS pero, debido a que la posición estaba poco cubierta, dicha variante no cumplía con los requisitos de calidad para ser considerada como tal.

4.3 Variantes presentes en receptores con TC y su asociación con el

RMA

En esta tesis doctoral se seleccionaron 46 receptores con TC, 23 de ellos presentaron RMA y 23 pacientes control trasplantados y con ausencia de RMA en el período de seguimiento post-TC. En estos 46 pacientes, se analizaron 112 genes, 51 de la vía del complemento y 61 de la biología de las células B, debido a la relevante implicación de estas vías en el RMA (Tabla 6).

4.3.1 Polimorfismos presentes en los genes del complemento y su relación con el

RMA

Tras analizar todas las regiones codificantes y ± 10 pb de las zonas intrónicas adyacentes para los 51 genes relacionados con el sistema del complemento, se detectaron 319 SNPs en los genes seleccionados (Figura 38, Anexo 1). En los 51 genes analizados, se obtuvo una profundidad de $72,66 \pm 2,42$ lecturas, es decir, que cada base se secuenció una media de 72,66 veces en cada gen, siendo el gen *MBL2* el que presenta una profundidad mayor ($122,46 \pm 3,46$ lecturas) y el gen *CIQTNF5* el que presenta una menor profundidad ($38,49 \pm 7,97$ lecturas) (Figura 39).

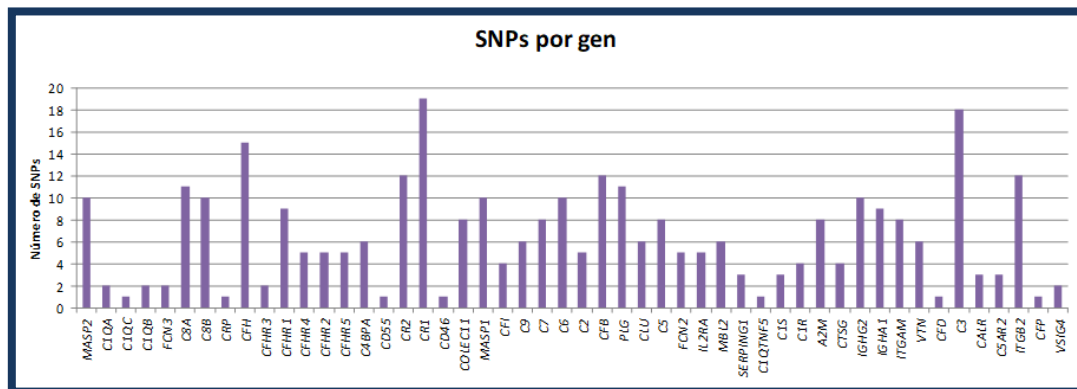


Figura 38. Distribución de los SNPs detectados en los genes del complemento.

A continuación, se realizó un análisis de asociación entre los SNPs detectados en los genes del complemento y el RMA. En el primer análisis realizado con el *software* *SNPStats*, se encontró asociación entre la presencia de 8 SNPs (rs1048118-*CFP*, rs1800450-*MBL2*, rs11627594-*IGHG2*, rs1407-*IGHA1*, rs1130656-*PLG*, rs1450656-*C7*, rs17611-*C5* y rs25681-*C5*) y el RMA con al menos 1 de los modelos de herencia empleados por el *software* (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y aditivo).

Se procedió entonces a realizar un segundo análisis con el paquete “SNPassoc” de *R* para estos 8 SNPs. Tras dicho análisis se encontró la misma asociación significativa entre los 8 SNPs y el RMA. Sin embargo, al realizar el test de McNemar para muestras pareadas, solo 2 SNPs mantuvieron la significación con el RMA:

- 1) la variante *missense* p.Gly54Asp en el gen *MBL2* (rs1800450),
- 2) la variante sinónima p.Asn428(p=) en el gen *CFP* (rs1048118).

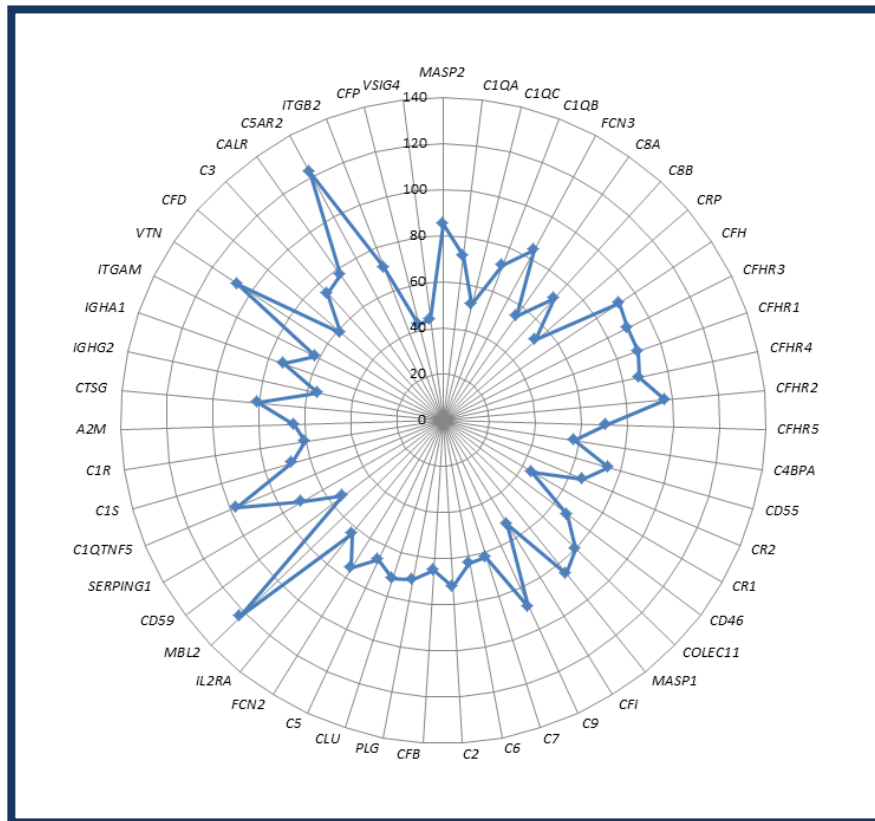


Figura 39. Profundidad media de los 51 genes seleccionados por su papel en la vía del complemento.

4.3.1.1 Polimorfismo p.Gly54Asp-*MBL2* en el RMA

El polimorfismo p.Gly54Asp presente en el gen *MBL2*, es una sustitución, en el nucleótido c.161, de una G por una A que produce una sustitución en el aminoácido 54, de una glicina por ácido aspártico (Figura 40).

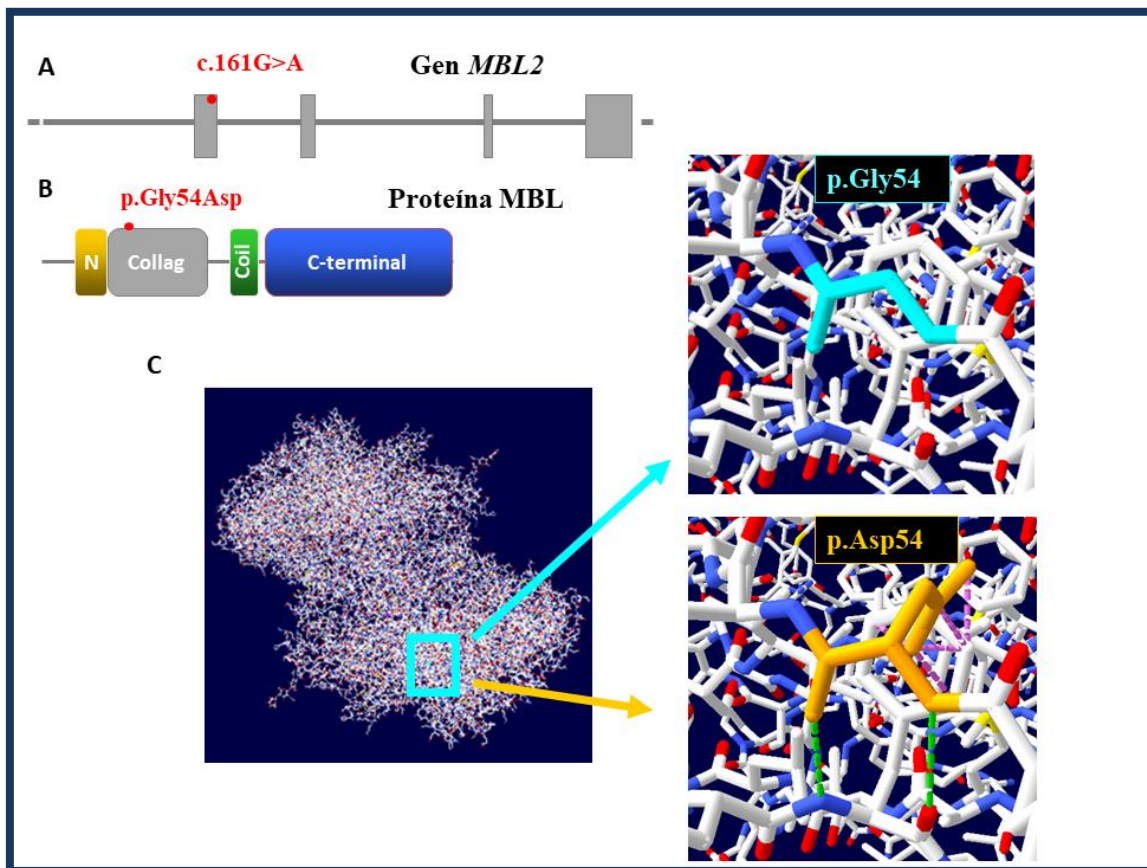


Figura 40. Tránsito del gen *MBL2*, dominios y estructura de MBL. **A.** Esquema del gen *MBL2* indicando la posición relativa del SNP p.Gly54Asp (c.161G>A); **B.** Representación de los dominios proteicos de MBL indicando la posición del SNP p.Gly54Asp. El dominio *N-terminal Cysteines-rich* (aminoácidos 21 - 41) (N), dominio *Collagen-like* (42-99) (Collag), estructura *coiled coil* (aminoácidos 112 - 130) (Coil) y el extremo *cytoplasmic tail* (aminoácidos 134 - 245) (C-terminal); **C.** Estructura cristalográfica de la proteína MBL (PDB ID: 5JPM) indicando el cambio en el aminoácido p.Gly54 (azul) a p.Asp54 (amarillo). Las líneas verdes discontinuas, indican los nuevos enlaces químicos formados.

4.3.1.1.1 Bases de datos, análisis de asociación y pruebas *in silico*

La MAF descrita en la base de datos *dbSNP*, para el alelo A, es de entre 0,1220 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,1389 (ExAC). Sin embargo, en nuestra población de estudio, la presencia del alelo A era significativamente más frecuente en los pacientes control, según reflejaron los modelos codominante, dominante, sobredominante y aditivo; así como el test de McNemar (Tabla 11). Además, en la base de datos *ClinVar* esta variante está descrita como patogénica, asociada al déficit de la proteína MBL. A continuación, con el fin de comprobar el efecto del SNP p.Gly54Asp en la proteína

rs1800450 <i>MBL2</i> p.Gly54Asp	Modelo	Genotipo	Control	RMA	OR (95% IC)	p-valor	AIC	BIC
SNPstats	Codominante	G/G	13 (56,5%)	21 (91,3%)	1,00	0,017	61,7	67,2
		G/A	9 (39,1%)	2 (8,7%)	0,14 (0,03-0,74)			
		A/A	1 (4,3%)	0 (0%)	0,00 (0,00-ND)			
	Dominante	G/G	13 (56,5%)	21 (91,3%)	1,00	0,0055	60	63,7
		G/A- A/A	10 (43,5%)	2 (8,7%)	0,12 (0,02-0,66)			
	Recesivo	G/G- G/A	22 (95,7%)	23 (100%)	1,00	0,24	66,4	70
		A/A	1 (4,3%)	0 (0%)	0,00 (0,00-ND)			
	Sobredominante	G/G- A/A	14 (60,9%)	21 (91,3%)	1,00	0,013	61,5	65,2
		G/A	9 (39,1%)	2 (8,7%)	0,15 (0,03-0,79)			
	Aditivo	---	---	---	---	0,13 (0,03-0,68)	0,0046	59,7
R (F(x) association)	Codominante	G/G	13 (56,5%)	21 (91,3%)	1,00	0,0165	61,7	
		G/A	9 (39,1%)	2 (8,7%)	0,14 (0,03-0,74)			
		A/A	1 (4,3%)	0 (0%)	0,00			
	Dominante	G/G	13 (56,5%)	21 (91,3%)	1,00	0,0054	60	
		G/A- A/A	10 (43,5%)	2 (8,7%)	0,12 (0,02-0,66)			
	Recesivo	G/G- G/A	22 (95,7%)	23 (100%)	1,00	1	66,4	
		A/A	1 (4,3%)	0 (0%)	0,00			
	Sobredominante	G/G- A/A	14 (60,9%)	21 (91,3%)	1,00	0,0126	61,5	
		G/A	9 (39,1%)	2 (8,7%)	0,15 (0,03-0,79)			
	Aditivo	---	---	---	---	0,13 (0,03-0,68)	0,0165	
Test McNemar	Chi al cuadrado es igual a 4,9 con 1 grado de libertad					0,02686		

Tabla 11. Análisis de asociación para el SNP p.Gly54Asp en el gen *MBL2*. AIC: criterios de información Akaike; BIC: criterios de información bayesianos; IC: Intervalo de confianza; ND: No disponible; OR: Odds ratio.

MBL, se realizaron análisis *in silico* con 5 predictores y 4 de ellos indicaron que esta variante podría tener un impacto en la función de la proteína (Tabla 12).

Programa <i>in silico</i>	Predicción
<i>Polyphen</i>	Probablemente dañino (0,998)
<i>SIFT</i>	Deletéreo (0)
<i>PhD-SNP</i>	Enfermedad (2)
<i>MutationTaster</i>	Polimorfismo (0.0001)
<i>SNAP2</i>	Efecto (95%)

Tabla 12. Análisis *in silico* para el SNP p.Gly54Asp. En rojo se muestran las predicciones que reflejan un impacto en la proteína MBL.

4.3.1.1.2 Estudio de expresión para la proteína MBL

Puesto que los análisis *in silico* reflejaron que la variante p.Gly54Asp podría tener un efecto deletéreo sobre la proteína, se realizó un estudio de expresión para comprobar si la variante p.Gly54Asp podía influir en los niveles de expresión de MBL en suero. La mediana de los niveles de MBL en el suero pre-TC de 4 pacientes control con la variante p.Gly54Asp fue de 6,24 ng/mL ([Q1-Q3] 5,14-6,86 ng/mL) que era significativamente menor que la obtenida en suero pre-TC de 5 pacientes con RMA en los que no estaba presente la variante (207,50 ng/mL ([Q1-Q3] 84,82-290,90 ng/mL). Además al realizar el test U de Mann-Whitney para muestras independientes, se obtuvo un p-valor menor de 0,01 lo cual confirmó que los pacientes control que portaban la variante p.Gly54Asp, presentaban niveles más bajos de la proteína MBL (Figura 41).

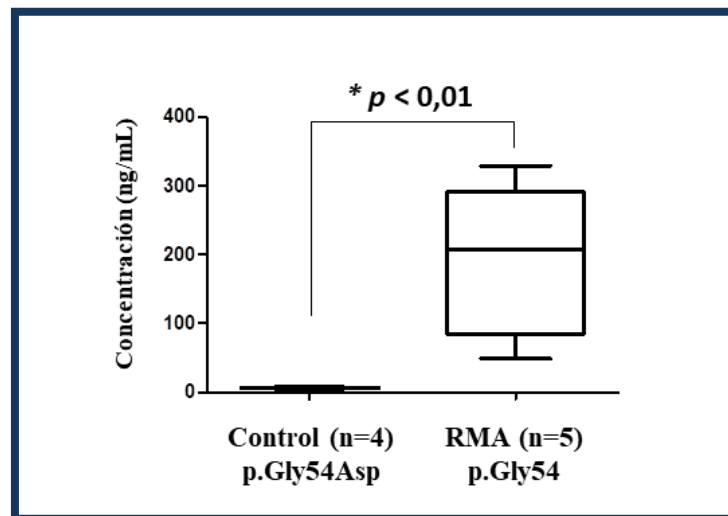


Figura 41. Concentraciones de la proteína MBL en suero según el genotipo *MBL2* para 4 pacientes control con la variante p.Gly54Asp y 5 pacientes con RMA con la referencia p.Gly54.

4.3.1.2 Polimorfismo p.Asn428(p=)-CFP en el RMA

El segundo SNP significativamente asociado con el RMA, se encontró en el gen *CFP* que codifica para la proteína properdina. En este caso, la variante consiste en un cambio, en el nucleótido c.1284, de una C por una T que no modifica el aminoácido asparagina 428 (p.Asn428(p=), Figura 42).

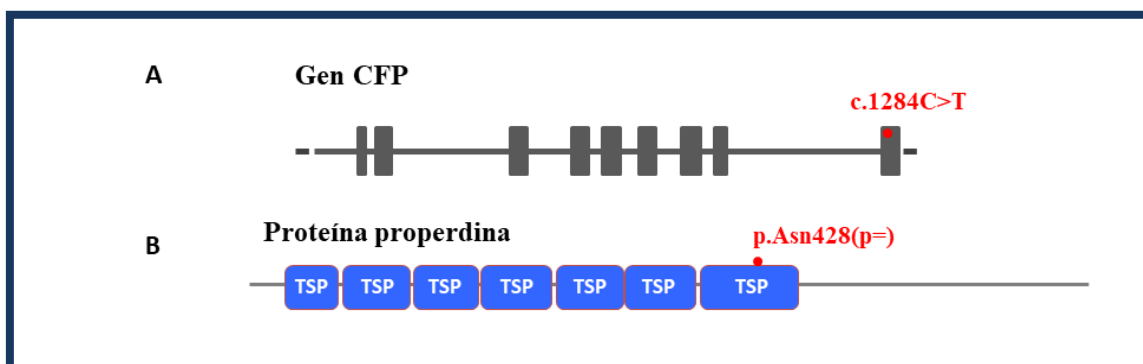


Figura 42. Tránsito del gen *CFP* y dominios de la proteína properdina. **A.** Esquema del gen *CFP*, mostrando la posición relativa del polimorfismo p.Asn428(p=) (c.1284C>T); **B.** Representación de los dominios de properdina, mostrando la posición relativa de la variante sinónima p.Asn428(p=).

4.3.1.2.1 Bases de datos, análisis de asociación y pruebas *in silico*

La MAF descrita en la base de datos dbSNP, para el alelo T, es de entre 0,2069 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,2287 (ExAC). Sin embargo, en nuestra población de estudio, la presencia de este alelo era significativamente más frecuente en los pacientes con RMA que en los pacientes control, según reflejaron los modelos codominante, dominante, recesivo y aditivo; así como el test de McNemar (Tabla 13).

A continuación, se realizaron análisis *in silico* para comprobar si la variante podía tener algún efecto en el *splicing* y se observó, que aunque la variante p.Asn428(p=) se encontraba alejada de la zona de *splicing* (+40 pb), el predictor HSF indicaba que podría afectar a los potenciadores de *splicing* exónico (*exonic splicing enhancers*, ESEs) y por tanto podría alterar la conformación final de la proteína (Tabla 14).

rs1048118 <i>CFP</i> p.Asn428(p=)	Modelo	Genotipo	Control	RMA	OR (95% IC)	p-valor	AIC	BIC
SNPstats	Codominante	C/C	21 (91,3%)	12 (52,2%)	1,00	0,0065	59,7	65,2
		C/T	0 (0%)	2 (8,7%)	ND (0,00-ND)			
		T/T	2 (8,7%)	9 (39,1%)	7,88 (1,46-42,61)			
	Dominante	C/C	21 (91,3%)	12 (52,2%)	1,00	0,0022	58,4	62,1
		C/T-T/T	2 (8,7%)	11 (47,8%)	9,62 (1,82-50,89)			
	Recesivo	C/C-C/T	21 (91,3%)	14 (60,9%)	1,00	0,013	61,5	65,2
		T/T	2 (8,7%)	9 (39,1%)	6,75 (1,26-36,03)			
	Sobredominante	C/C-T/T	23 (100%)	21 (91,3%)	1,00	0,091	64,9	68,6
		C/T	0 (0%)	2 (8,7%)	ND (0,00-ND)			
	Aditivo	---	---	---	3,08 (1,28-7,43)	0,0041	59,5	63,2
R (F(x) association)	Codominante	C/C	21 (91,3%)	12 (52,2%)	1,00	0,0088	59,7	
		C/T	0 (0%)	2 (8,7%)	0,00			
		T/T	2 (8,7%)	9 (39,1%)	7,88 (1,46-42,61)			
	Dominante	C/C	21 (91,3%)	12 (52,2%)	1,00	0,0022	58,4	
		C/T-T/T	2 (8,7%)	11 (47,8%)	9,62 (1,82-50,89)			
	Recesivo	C/C-C/T	21 (91,3%)	14 (60,9%)	1,00	0,0126	61,5	
		T/T	2 (8,7%)	9 (39,1%)	6,75 (1,26-36,03)			
	Sobredominante	C/C-T/T	23 (100%)	21 (91,3%)	1,00	0,4889	64,9	
		C/T	0 (0%)	2 (8,7%)	0,00			
	Aditivo	---	---	---	3,08 (1,28-7,43)	0,0089	59,5	
Test McNemar	Chi al cuadrado es igual a 5,8 con 1 grado de libertad					0,01586		

Tabla 13. Análisis de asociación para el SNP p.Asn428(p=) en el gen *CFP*. AIC: criterios de información Akaike; BIC: criterios de información bayesianos; IC: Intervalo de confianza; ND: No disponible; OR: Odds ratio.

* RESCUE ESE hexamers					
VARIANTE	MOTIVO DE REFERENCIA		MOTIVO MUTANTE		VARIACIÓN
p.Asn428(p=) <i>CFP</i>				AGAATG	New site
* Predicciones de PESE Octamers de Zhang & Chasin					
VARIANTE	MOTIVO DE REFERENCIA		MOTIVO MUTANTE		VARIACIÓN
	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	
p.Asn428(p=) <i>CFP</i>		AGAAGAAC (73,34)		AGAAGAAT (51,30)	-30.06 %
* Motivos ESE de HSF					
VARIANTE	MOTIVO DE REFERENCIA		MOTIVO MUTANTE		VARIACIÓN
	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	
p.Asn428(p=) <i>CFP</i>	9G8	CGTGAC (63,56)	9G8	TGTGAC (61,14)	-3,8%

Tabla 14. Análisis *in silico* para la variante p.Asn428(p=). En verde se muestra la creación del nuevo sitio de unión para la maquinaria de *splicing*.

4.3.1.2.2 Estudio de expresión para la proteína properdina

A continuación, se llevó a cabo un estudio de expresión para comprobar si el SNP p.Asn428(p=) podía alterar los niveles de properdina en el suero. La mediana de los niveles de properdina en suero pre-TC en 5 pacientes con RMA y la variante p.Asn428(p=) (c.1284C>T) fue de 14,65 µg/mL ([Q1-Q3] 11,95-36,38 µg/mL), mientras que, la obtenida en suero pre-TC de 11 pacientes control en los que no estaba presente la variante fue de 10,77 µg/mL ([Q1-Q3] 5,85-13,86 µg/mL). Además, al realizar el test U de Mann-Whitney para muestras independientes, se obtuvo un p-valor menor de 0,05 lo cual confirmó que los pacientes con RMA que portaban la variante p.Asn428(p=), presentaban niveles más altos de la proteína properdina (Figura 43).

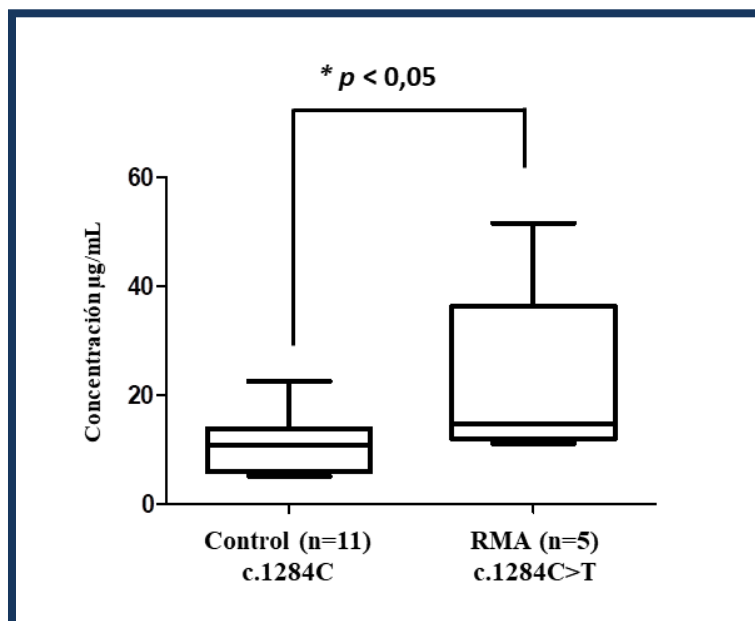


Figura 43. Concentración de properdina en suero según el genotipo *CFP* para 11 pacientes control con la referencia y 5 pacientes con RMA con la variante p.As428(p=).

4.3.2 Polimorfismos presentes en los genes implicados en la biología de las células B y su relación con el RMA

Tras analizar todas las regiones codificantes y ± 10 pb de las zonas intrónicas adyacentes, para los 61 genes implicados en la biología de las células B, se detectaron 285 SNPs en los genes seleccionados (Figura 44, Anexo 2). Además, se calculó la profundidad que presentaban los 61 genes analizados y se obtuvo un valor de $80,60 \pm 2,60$ lecturas, es decir, que cada base se secuenció una media de 80,60 veces en cada gen, siendo el gen *IGHM* el que presenta una profundidad mayor ($248,45 \pm 7,27$ lecturas) y el gen *CD32B* el que presenta una menor profundidad ($31,15 \pm 1,56$ lecturas) (Figura 45).

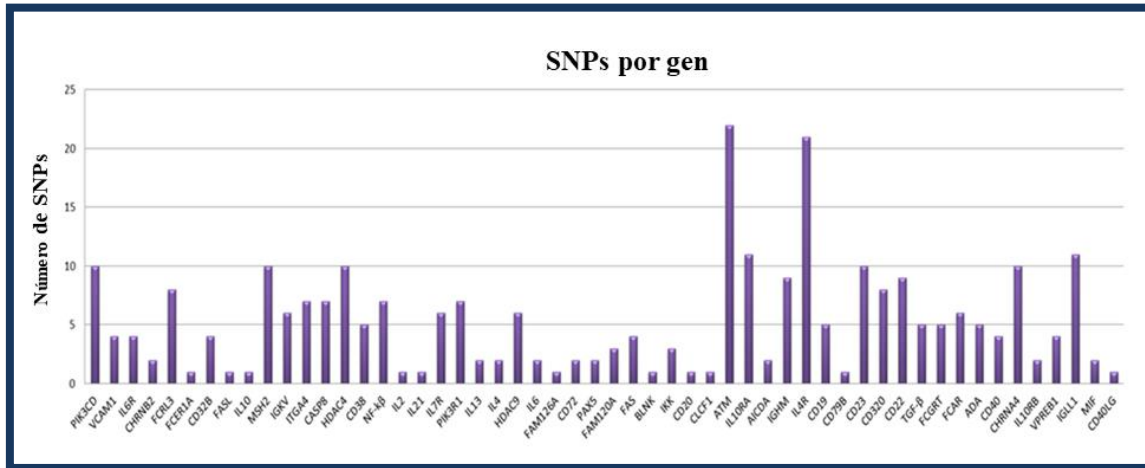


Figura 44. Distribución de los SNPs detectados en los genes implicados en la biología de las células B.

A continuación, se realizó un análisis de la asociación entre los SNPs detectados y el RMA. En el primer análisis realizado con el *software* *SNPStats*, se encontró asociación entre la presencia de 12 SNPs (rs1178127-*HDAC9*, rs2389998-*HDAC9*, rs2028373-*AICDA*, rs1143674-*ITGA4*, rs1143676-*ITGA4*, rs7562325-*ITGA4*, rs2228138-*FCER2*, rs4996973-*FCER2*, rs28364072-*FCER2*, rs244076-*ADA*, rs2273506-*CHRNA4* y rs9619852-*VPREB1*) y el RMA con al menos 1 de los modelos de herencia empleados por el *software* (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y aditivo). Se realizó un segundo análisis con el paquete “*SNPassoc*” de *R* para estos 12 SNPs y se encontró la misma asociación significativa entre los 12 SNPs y el RMA. Sin embargo, al realizar el test de McNemar para muestras pareadas, solo 3 SNPs, en el gen *ITGA4* mantuvieron la significación con el RMA:

- 1) la variante sinónima p.Thr615(p=) (rs1143674),
- 2) la variante *missense* p.Gln878Arg (rs1143676),

3) la variante sinónima p.His961(p=) (rs7562325).

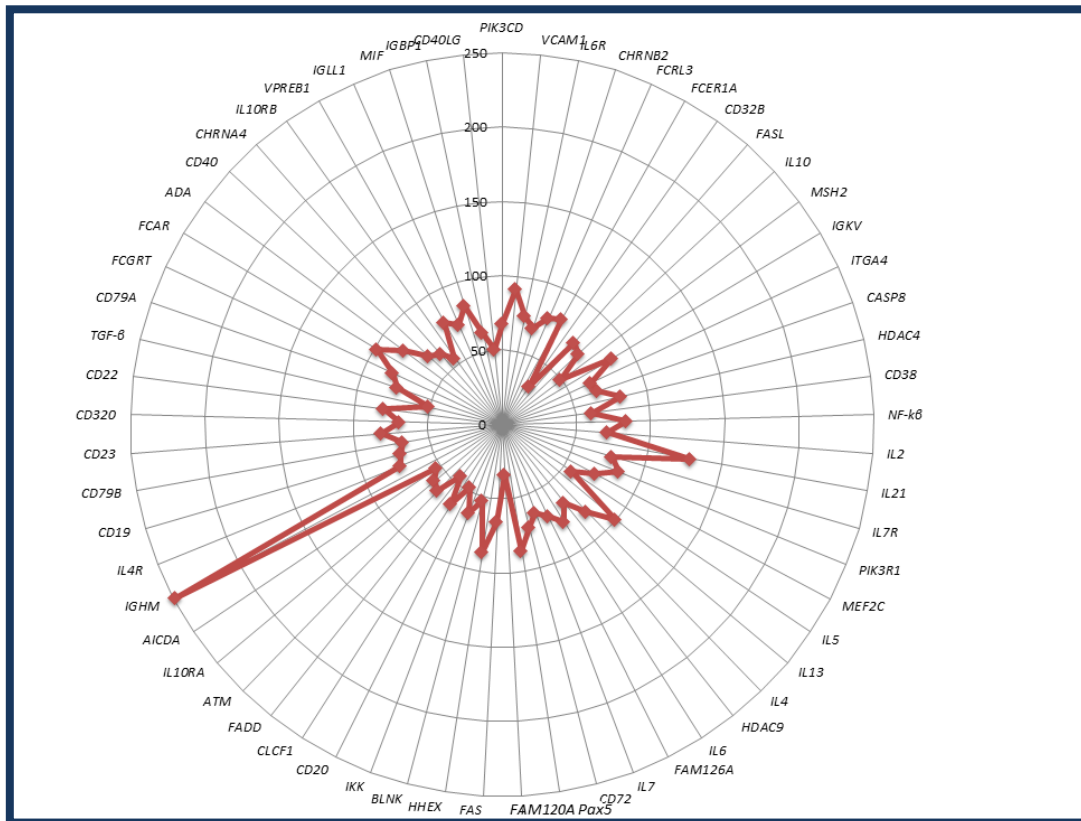


Figura 45. Profundidad media de los 61 genes seleccionados por su papel en la biología de las células B.

4.3.2.1 Polimorfismos (p.Thr615(p=), p.Gln878Arg y p.His961(p=))-*ITGA4* en el RMA

Los 3 SNPs significativamente asociados con el RMA, se encontraron en el gen *ITGA4* que codifica para la proteína integrina $\alpha 4$. En este caso, se trata de 2 variantes sinónimas y una variante *missense* (Figura 46):

- 1) la variante sinónima p.Thr615(p=), se produce un cambio en el nucleótido c.1845 de G a A que no modifica el aminoácido treonina 615 (rs1143674)
- 2) la variante sinónima p.His961(p=), en la cual se produce un cambio, en el nucleótido c.2883, de una C por una T sin modificar el aminoácido histidina 961 (rs7562325).

3) la variante *missense* p.Gln878Arg, con un cambio en el nucleótido c.2633 de un A por una G, que produce una sustitución en el aminoácido 878 de glutamina por arginina (rs1143676).

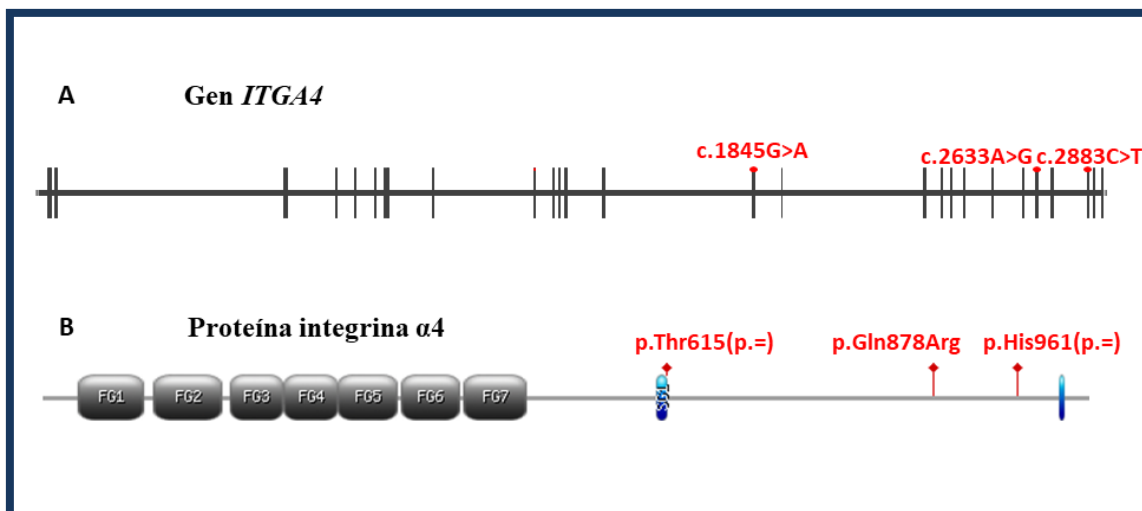


Figura 46. Estructura del gen *ITGA4* y de la proteína integrina $\alpha 4$. **A.** Estructura del gen *ITGA4*. En rojo se indica la posición relativa de los 3 polimorfismos detectados; **B.** Representación esquemática de las repeticiones y motivos de la proteína integrina $\alpha 4$. En rojo se indica la posición relativa de los 3 polimorfismos detectados.

4.3.2.1.1 Bases de datos, análisis de asociación y pruebas *in silico*

Las MAFs descritas en la base de datos dbSNP para los 3 SNPs eran:

- 1) entre 0,3385 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,3813 (ExAC) para el SNP p.Thr615(p=),
- 2) entre 0,2095 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,2633 (ExAC) para el SNP p.Gln878Arg,
- 3) entre 0,3431 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,3737 (ExAC) para el SNP p.His961(p=).

Sin embargo, en nuestra población de estudio la presencia de los 3 SNPs era significativamente más frecuente en los pacientes con RMA. De hecho, los análisis de asociación, realizados con *SNPStats* y *R* para los 3 SNPs, indicaron que eran significativamente más frecuentes en los pacientes con RMA que en los controles según reflejaron los modelos codominante, dominante, recesivo y aditivo; así como el test de McNemar (Tabla 15).

SNP		Modelo	Genotipo	Control	RMA	OR (95% IC)	p-valor	AIC	BIC
rs1143674, <i>ITGA4</i> , Thr615(p=)	SNPstats	Codominante	G/G	14 (60,9%)	4 (17,4%)	1,0	0,003	58,0	63,5
			G/A	8 (34,8%)	12 (52,2 %)	5,2 (1,3-21,9)			
			A/A	1 (4,3%)	7 (30,4%)	24,5 (2,3-262,5)			
		Dominante	G/G	14 (60,9%)	4 (17,4%)	1,0	0,002	58,2	61,9
			G/A-A/A	9 (39,1%)	19 (82,6%)	7,4 (1,9-28,9)			
		Recesivo	G/G-G/A	22 (95,7%)	16 (69,6%)	1,0	0,01	61,8	65,4
			A/A	1 (4,3%)	7 (30,4%)	9,6 (1,1-86,2)			
	Sobredominante	G/G-A/A	15 (65,2%)	11 (47,8%)	1,0	0,2	66,3	70,0	
		G/A	8 (34,8%)	12 (52,2%)	2,0 (0,6-6,7)				
	Aditivo	---	---	---	5,1 (1,7-14,7)	6e-04	56,0	59,7	
	R (F(x) association)	Codominante	G/G	14 (60,9%)	4 (17,4%)	1,0	0,003	58,0	
			G/A	8 (34,8%)	12 (52,2 %)	5,2 (1,3-21,9)			
			A/A	1 (4,3%)	7 (30,4%)	24,5 (2,3-262,5)			
		Dominante	G/G	14 (60,9%)	4 (17,4%)	1,0	0,002	58,2	
			G/A-A/A	9 (39,1%)	19 (82,6%)	7,4 (1,9-28,9)			
		Recesivo	G/G-G/A	22 (95,7%)	16 (69,6%)	1,0	0,01	61,0	
			A/A	1 (4,3%)	7 (30,4%)	9,6 (1,1-86,2)			
Sobredominante	G/G-A/A	15 (65,2%)	11 (47,8%)	1,0	0,2	66,0			
	G/A	8 (34,8%)	12 (52,2 %)	2,0 (0,6-6,7)					
Aditivo	---	---	---	5,06 (1,74-14,70)	6,10e-04	56,0			
Test McNemar		Chi al cuadrado es igual a 5,79 con 1 grado de libertad					0,02		
rs1143676, <i>ITGA4</i> , p.Gln878Arg	SNPstats	Codominante	A/A	17 (81,0%)	7 (30,4%)	1,0	0,001	53,5	58,9
			A/G	4 (19,1%)	13 (56,5%)	7,9 (1,9-32,8)			
			G/G	0 (0%)	3 (13,0%)	ND (0,0-ND)			
		Dominante	A/A	17 (81,0%)	7 (30,4%)	1,0	6e-04	53,0	56,6
			A/G-G/G	4 (19,1%)	16 (69,6%)	9,7 (2,4-39,6)			
		Recesivo	A/A-A/G	21 (100%)	20 (87,0%)	1,0	0,04	60,8	64,4
			G/G	0 (0%)	3 (13,0%)	ND (0,0-ND)			
		Sobredominante	A/A-G/G	17 (81,0%)	10 (43,5%)	1,0	0,009	58,1	61,3
			A/G	4 (19,1%)	13 (56,5%)	5,5 (1,4-21,7)			
		Aditivo	---	---	---	8,6 (2,2-33,3)	3e-04	51,7	55,3

Tabla 15. Análisis de asociación para los SNP p.Thr615(p=), p.Gln878Arg y p.His961(p=) en el gen *ITGA4*. AIC: criterios de información Akaike; BIC: criterios de información bayesianos; IC: Intervalo de confianza; ND: No disponible; OR: Odds ratio.

SNP		Modelo	Genotipo	Control	RMA	OR (95% IC)	p-valor	AIC	BIC		
rs1143676, <i>ITGA4</i> , p.Gln878Arg	R (F(x) association)	Codominante	A/A	17 (81,0%)	7 (30,4%)	1,0	0,001	53,5			
			A/G	4 (19,0%)	13 (56,5%)	7,9 (1,9-32,8)					
			G/G	0 (0%)	3 (13,0%)	0,0					
		Dominante	A/A	17 (81,0%)	7 (30,4%)	1,0	5,6e-04	53,0			
			A/G-G/G	4 (19,0%)	16 (69,6%)	9,7 (2,4-39,6)					
		Recesivo	A/A-A/G	21 (100%)	20 (87,0%)	1,0	0,2	60,8			
			G/G	0 (0%)	3 (13,0%)	0,0					
		Sobredominante	A/A-G/G	17 (81,0%)	10 (43,5%)	1,0	0,009	58,1			
			A/G	4 (19,0%)	13 (56,5%)	5,5 (1,4-21,7)					
		Aditivo	---	---	---	8,6 (2,2-33,3)	0,001	51,7			
Test McNemar		Chi al cuadrado es igual a 5,26 con 1 grado de libertad					0,02				
rs7562325, <i>ITGA4</i> , His961(p=)	SNPstats	Codominante	C/C	14 (60,9%)	4 (17,4%)	1,0	0,006	59,6	65,1		
			C/T	7 (30,4%)	12 (52,2%)	6,0 (1,4-25,6)					
			T/T	2 (8,7%)	7 (30,4%)	12,2 (1,8-84,0)					
		Dominante	C/C	14 (60,9%)	4 (17,4%)	1,0	0,002	58,2	61,9		
			C/T-T/T	9 (39,1%)	19 (82,6%)	7,4 (1,9-28,9)					
		Recesivo	C/C-C/T	21 (91,3%)	16 (69,6%)	1,0	0,06	64,1	67,8		
			T/T	2 (8,7%)	7 (30,4%)	4,6 (0,8-25,2)					
		Sobredominante	C/C-T/T	16 (69,6%)	11 (47,8%)	1,0	0,1	65,5	69,2		
			C/T	7 (30,4%)	12 (52,2%)	2,5 (0,7-8,3)					
		Aditivo	---	---	---	3,9 (1,5-10,5)	0,002	58,2	61,9		
		SNPstats	R (F(x) association)	Codominante	C/C	14 (60,9%)	4 (17,4%)	1,0	0,006	59,6	
					C/T	7 (30,4%)	12 (52,2%)	6,0 (1,4-25,6)			
					T/T	2 (8,7%)	7 (30,4%)	12,2 (1,8-84,0)			
				Dominante	C/C	14 (60,9%)	4 (17,4%)	1,0	0,002	58,2	
C/T-T/T	9 (39,1%)				19 (82,6%)	7,4 (1,9-28,9)					
Recesivo	C/C-C/T			21 (91,3%)	16 (69,6%)	1,0	0,06	64,1			
	T/T			2 (8,7%)	7 (30,4%)	4,6 (0,8-25,2)					
Sobredominante	C/C-T/T			16 (69,6%)	11 (47,8%)	1,0	0,1	65,5			
	C/T			7 (30,4%)	12 (52,2%)	2,5 (0,7-8,3)					
Aditivo	---			---	---	3,9 (1,5-10,4)	0,002	58,2			
Test McNemar				Chi al cuadrado es igual a 9,39 con 1 grado de libertad					0,002		

Tabla 15 (Continuación). Análisis de asociación para los SNP p.Thr615(p=), p.Gln878Arg y p.His961(p=) en el gen *ITGA4*. AIC: criterios de información Akaike; BIC: criterios de información bayesianos; IC: Intervalo de confianza; ND: No disponible; OR: Odds ratio.

Dado que los 3 SNPs se encuentran en el mismo gen, se realizó un análisis de haplotipo para comprobar si se heredaban de forma conjunta. Se consideraron 4 posibles haplotipos para el análisis con los *softwares* *SNPStats* y *THESIAS 3.1*:

- 1) Haplotipo salvaje o de referencia c.1845G-c.2633A-c.2883C (haplotipo GAC),
- 2) c.1845A-c.2633G-c.2883T (haplotipo AGT), que indica la presencia de los 3 SNPs,
- 3) c.1845A-c.2633A-c.2883T (haplotipo AAT), con la presencia de las dos variantes sinónimas, una en c.1845G>A y la otra en c.2883C>T,
- 4) c.1845G-c.2633A-c.2883C (haplotipo GAC), con dos variantes, una en c.2633A>G y otra en c.2883C>T.

Tras los análisis, se encontraron diferencias significativas entre los diferentes haplotipos y los pacientes con RMA y control, para el haplotipo AGT (c.1845A-c.2633G-c.2883T) tanto con *SNPStats* ($p=0,005$) como con *THESIAS 3.1* ($p=0,0003$) (Tabla 16). Además, el haplotipo AGT era significativamente más frecuente en los casos (41,3%) que en los controles (12,4%), lo cual sugería una asociación entre el haplotipo AGT y el RMA, con un OR de 11,0 (95% IC=2,3-53,6) en *SNPStats* y OR 7,3 (95% IC=2,5-21,3) en *THESIAS 3.1*.

Asociación del haplotipo <i>ITGA4</i> con la respuesta (n=46, análisis crudo)									
PROGRAMA		rs1143674	rs1143676	rs7562325	Total Frec.	Control Frec.	RMA Frec.	OR (95% IC)	p-valor
SNPStats	1	G	A	C	0,6	0,8	0,4	1,0	---
	2	A	G	T	0,3	0,1	0,4	11,0 (2,3-53,6)	0,005
	3	A	A	T	0,2	0,1	0,1	2,5 (0,2-9,4)	0,1
	4	G	A	T	0,01	0,02	ND	1,0	---

Tabla 16. Análisis de haplotipos con *SNPStats* y *THESIAS 3.1*. IC: Intervalo de confianza; Frec: Frecuencia; ND: no disponible; OR: Odds ratio.

Asociación del haplotipo <i>ITGA4</i> con la respuesta (n=46, análisis crudo)									
PROGRAMA		rs1143674	rs1143676	rs7562325	Total Frec.	Control Frec.	RMA Frec.	OR (95% IC)	p-valor
THESIAS 3.1	1	G	A	C	0,6	0,8	0,4	1,0	---
	2	A	G	T	0,3	0,1	0,4	7,3 (2,5-21,3)	0,0003
	3	A	A	T	0,2	0,09	0,1	2,1 (0,7-6,5)	0,2
	4	G	A	T	0,01	0,02	0,0000	1,0	---

Tabla 16 (Continuación). Análisis de haplotipos con *SNPStats* y *THESIAS 3.1*. IC: Intervalo de confianza; Frec: Frecuencia; ND: no disponible; OR: Odds ratio.

En esta tesis doctoral, a pesar de que estas 3 variantes asociadas con la presencia de RMA y relacionadas con la biología de las células B eran polimorfismos previamente conocidos, se emplearon diferentes herramientas *in silico* para predecir su posible impacto en la función proteica (Tablas 17-19).

1) Variante *missense* p.Gln878Arg (rs1143676)

El SNP p.Gln878Arg-*ITGA4* no parece alterar la función de la proteína tal y como se ve en la Tabla 18, ya que solo 1 de los 5 predictores refleja que podría tener un impacto en la integrina $\alpha 4$.

Programa <i>in silico</i>	Predicción
<i>Polyphen</i>	Benigna (0,04)
<i>SIFT</i>	Tolerada (0,61)
<i>PhD-SNP</i>	Neutral
<i>MutationTaster</i>	Polimorfismo (1)
<i>SNAP2</i>	Efecto (63%)

Tabla 17. Análisis *in silico* para el SNP p.Gln878Arg. En rojo se muestra la predicción que refleja un impacto en la proteína integrina $\alpha 4$.

2) Variantes sinónimas p.Thr615(p=) (rs1143674) y p.His961(p=) (rs7562325)

En el caso de las variantes sinónimas p.Thr615(p=) y p.His961(p=), que se encontraban cerca de la zona de *splicing* (± 6 pb), para evaluar el posible impacto, se empleó el

criterio de Houdayer et al (185) que plantea que, un descenso de al menos el 20% en la puntuación de las predicciones debe considerarse como un posible efecto sobre el proceso de *splicing*. En este caso solo la variante p.His961(p=)-*ITGA4* puede considerarse que tiene un posible efecto en el *splicing*, tal y como predicen 3 de las 5 herramientas empleadas para el análisis (Tabla 18).

GEN	Grupo más frecuente	SNP	Efecto	Exón	SSP	HSF	ESEfinder	GENESCAN	NetGene2
<i>ITGA4</i>	RMA	p.Thr615(p=)	sinónima	16	Nuevo sitio de <i>splicing</i> (0,9)	43,2 vs 72,2 (+67%)	6,8 vs 7,3 (+16%)	7,2 vs 13,1 (+81,5%)	Nuevo sitio de <i>splicing</i> (0,8)
	RMA	p.His961(p=)	sinónima	26	0,8 vs 0,6 (-30,1%)	86,6 vs 86,8 (+0,2)	7,3 vs 8,2 (+12,4%)	5,0 vs 4,0 (-20%)	0,6 vs 0,3 (-51,6%)

Tabla 18. Análisis *in silico* para las variantes sinónimas en el gen *ITGA4*. En rojo se muestran las predicciones que reflejan un posible efecto sobre el *splicing*.

Además, la variante p.Thr615(p=) podría modificar los sitios de unión de los factores reguladores de *splicing* y por tanto, tener un impacto en la expresión de la proteína. Mientras que, la variante p.His961(p=), a pesar de afectar al proceso de *splicing*, parece no afectar a los sitios de unión de las proteínas reguladoras del *splicing* (Tabla 19).

* ESE finder matrices para SRp40, SC35, SF2/ASF y SRp55					
VARIANTE	MOTIVO DE REFERENCIA		MOTIVO MUTANTE		VARIACIÓN
	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	
p.Thr615(p=) <i>ITGA4</i>			SRp40	ACAGTAG (78,5)	Sitio Nuevo
p.His961(p=) <i>ITGA4</i>	SRp55	CGCATg (75.52)	SF2/ASF (IgM-BRCA1)	CGCACgt (98.23)	+30.06 %
	SF2/ASF (IgM-BRCA1)	CGCATgt (84.31)	SF2/ASF	CGCACgt (95.34)	+13.09 %
	SRp55	CATgta (74.56)	SRp55	CACgta (84.49)	+13.31 %
* RESCUE ESE hexamers					
VARIANTE	MOTIVO DE REFERENCIA		MOTIVO MUTANTE		VARIACIÓN
p.Thr615(p=) <i>ITGA4</i>				AAACAG	Sitio Nuevo

Tabla 19. Análisis *in silico* para las variantes p.Thr615(p=) y p.His961(p=). Para la variante p.Thr615(p=), en verde se muestra la creación del nuevo sitio de unión para las proteínas que pueden alterar el *splicing*.

* Predicciones PESE Octamers de Zhang & Chasin					
VARIANTE	MOTIVO DE REFERENCIA		MOTIVO MUTANTE		VARIACIÓN
	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	
p.Thr615(p=) <i>ITGA4</i>				AGTAGGAA (25,6)	New site
* Motivos ESE de HSF					
VARIANTE	MOTIVO DE REFERENCIA		MOTIVO MUTANTE		VARIACIÓN
	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	
p.Thr615(p=) <i>ITGA4</i>			Tra2-β	AACAG (83,2)	New site

Tabla 19 (Continuación). Análisis *in silico* para las variantes p.Thr615(p=) y p.His961(p=). Para la variante p.Thr615(p=), en verde se muestra la creación del nuevo sitio de unión para las proteínas que pueden alterar el *splicing*.

4.3.2.1.2 Estudio de expresión para la proteína integrina α4

A continuación se llevó a cabo un estudio de expresión, en suero pre-TC, para comprobar si el haplotipo AGT-*ITGA4* podía alterar los niveles de integrina α4. La mediana de los niveles de integrina α4 en el suero pre-TC de 8 pacientes con RMA con el haplotipo AGT, fue de 0,02 ng/mL ([Q1-Q3] 0,00-0,1 ng/mL) (Figura 47).

Este valor era significativamente menor ($p < 0,05$), en comparación con los niveles de integrina α4 medidos en el suero pre-TC de 8 pacientes control con el haplotipo GAC de referencia (0,1 ng/mL; [Q1-Q3] 0,05-0,7 ng/mL).

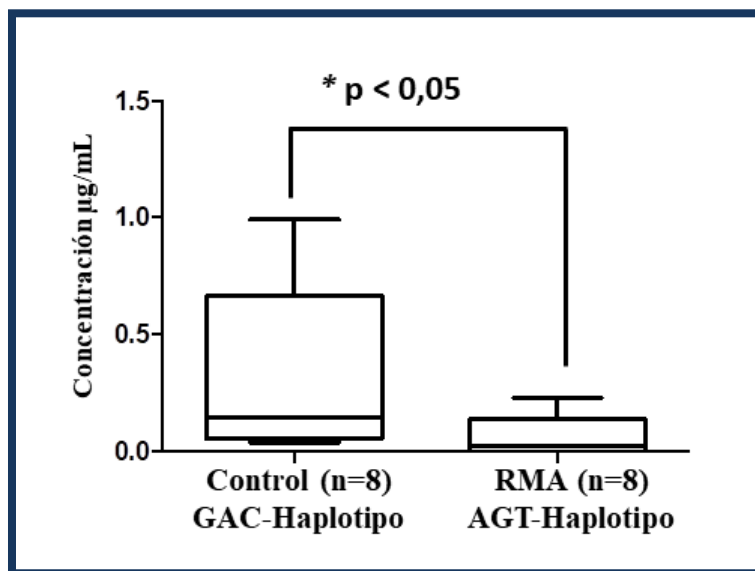


Figura 47. Concentración de integrina $\alpha 4$ en suero según el genotipo *ITGA4* para 8 pacientes control con el haplotipo GAC de referencia y 8 pacientes con RMA con el haplotipo AGT.

4.4 Variantes presentes en Donantes y su asociación con el RMA

En esta tesis doctoral se seleccionaron 28 donantes, 14 de receptores con RMA y 14 de pacientes control trasplantados y con ausencia de RMA en el período de seguimiento post-TC. En estos 28 donantes se analizó la presencia de polimorfismos en los 112 genes seleccionados por su implicación en el RMA (Tabla 6).

4.4.1 Polimorfismos presentes en los genes del complemento, en donantes y su relación con el RMA

Se analizaron las regiones codificantes y adyacentes (± 10 pb) de los 51 genes de la vía del complemento seleccionados y se detectaron 257 SNPs (Figura 48, Anexo 3) y una profundidad media de $86,35 \pm 2,86$ lecturas, siendo el gen *MBL2* el que presenta una profundidad mayor ($148,71 \pm 4,60$ lecturas) y el gen *IGHG2* el que presenta una menor profundidad ($38,37 \pm 3,74$ lecturas) (Figura 49).

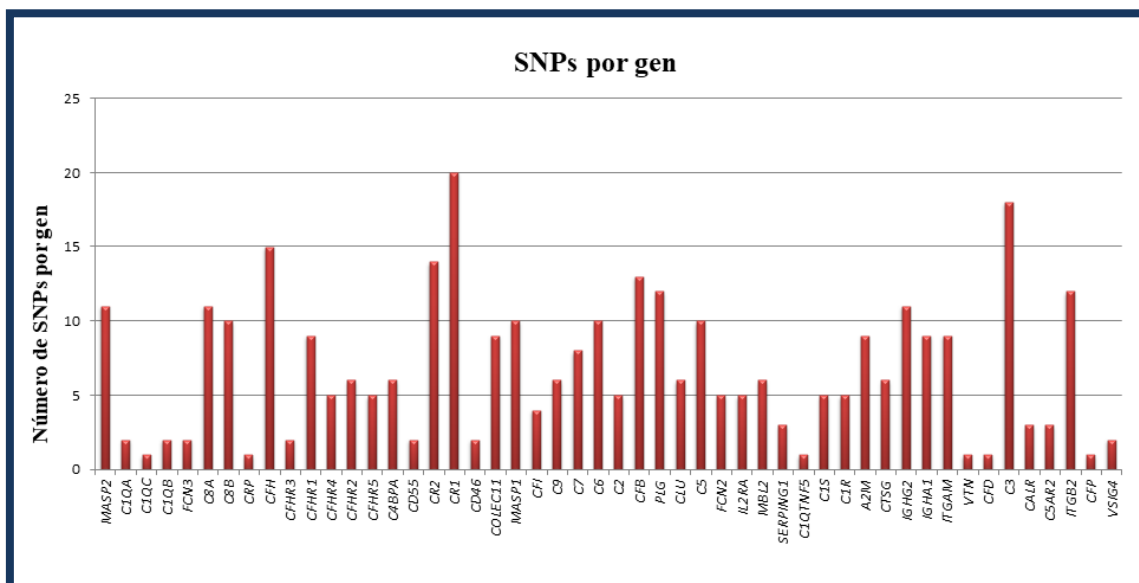


Figura 48. Distribución de los SNPs detectados en los genes del complemento, en los donantes.

Tras realizar los análisis en *SNPStats* y *R*, se encontró asociación, con alguno de los modelos empleados (codominante, dominante, sobredominante, recesivo y aditivo), entre la presencia de 12 SNPs en donantes y el RMA (rs1013579-*C8B*, rs4230-*CFHR1*, rs35662416-*CFHR5*, rs4308977-*CR2*, rs56232421-*CR1*, rs34347618-*COLEC11*, rs850312-*MASP1*, rs2072634-*CFB*, rs41258306-*C5*, rs17612-*C5*, rs9331888-*CLU*, rs2230204-*C3*). Sin embargo, tras realizar el test exacto de Fisher, para estos SNPs, ninguno de ellos mantuvo la asociación con el RMA.

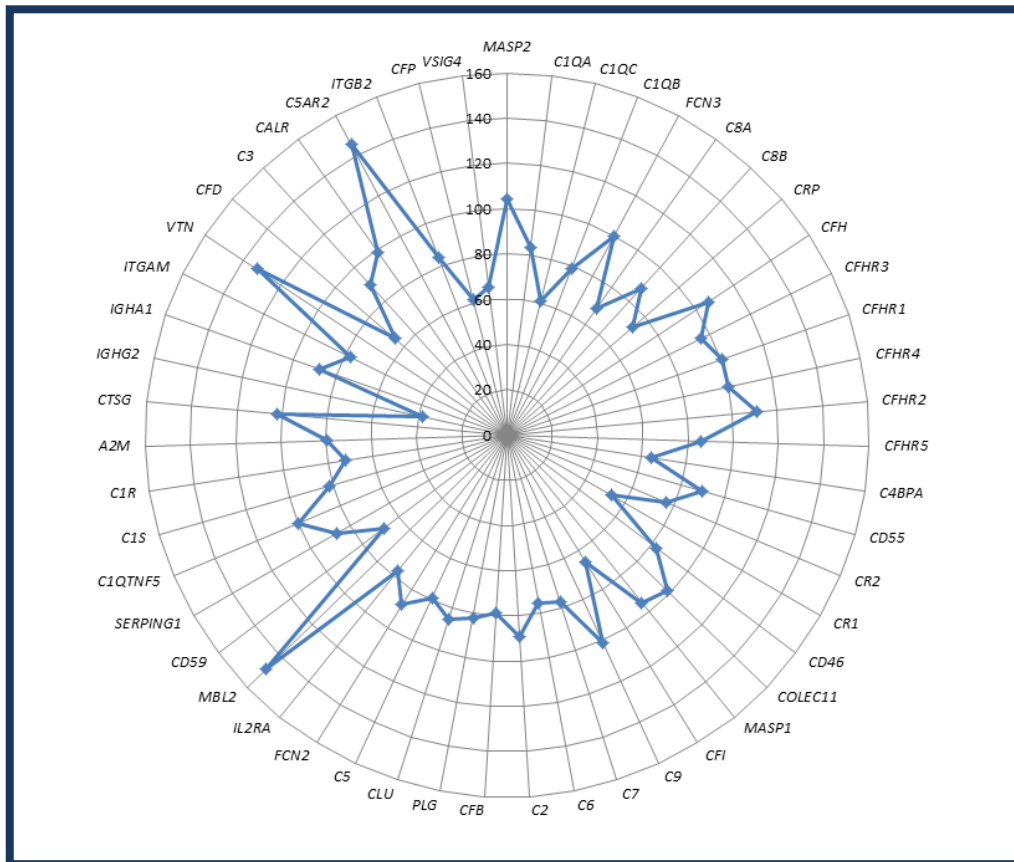


Figura 49. Profundidad media de los 51 genes seleccionados por su papel en la vía del complemento, en los donantes.

4.4.2 Polimorfismos presentes en los genes implicados en la biología de las células B, en donantes y su relación con el RMA

Se analizaron 61 genes relacionados con la biología de las células B en los 28 donantes seleccionados. Los 61 genes presentaban una profundidad media de $88,49 \pm 4,13$ lecturas, siendo el gen *IGHM* el que presenta una profundidad mayor ($290,30 \pm 8,82$ lecturas) y el gen *CD32B* el que presenta una menor profundidad ($36,42 \pm 2,14$ lecturas) (Figura 50). Tras analizar las regiones codificantes y adyacentes (± 10 pb), se detectaron 222 SNPs (Figura 51, Anexo 4).

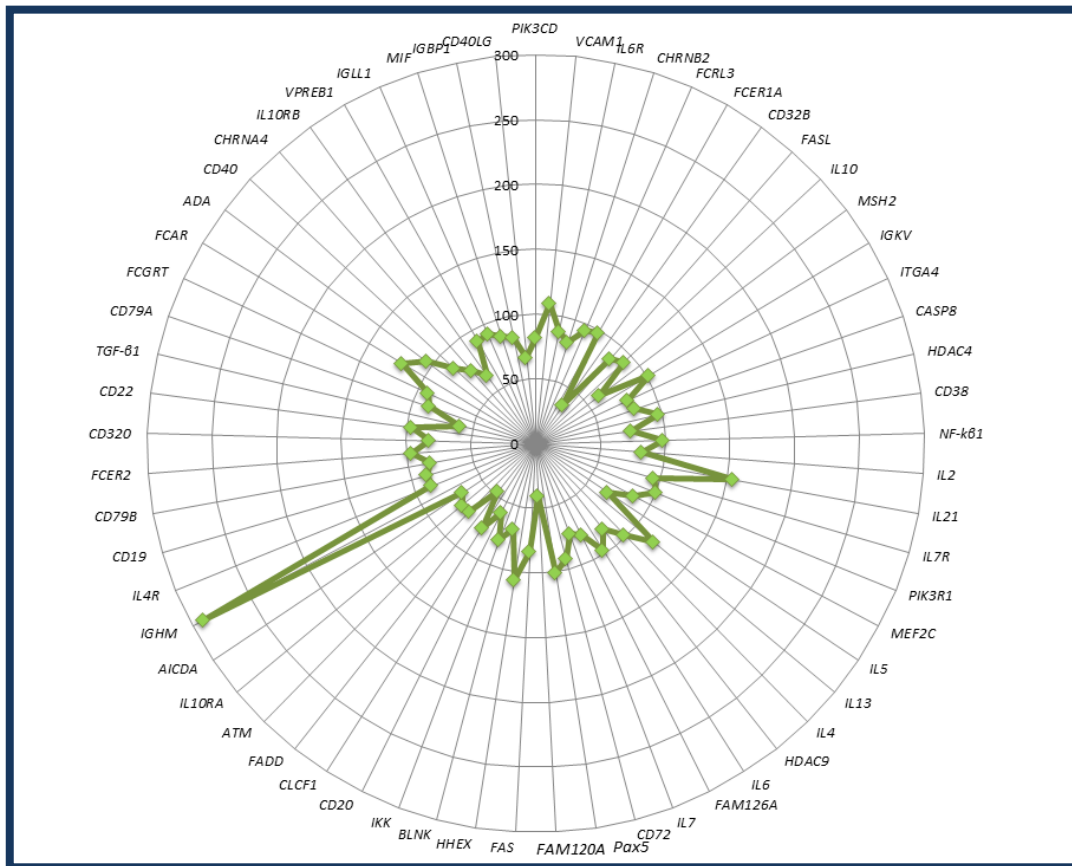


Figura 50. Profundidad media de los 61 genes seleccionados por su papel en la biología de las células B, en los donantes.

A continuación, en los análisis llevados a cabo en *SNPStats* y *R*, se detectaron 12 SNPs (rs2228145-*IL6R*, rs11121484-*PIK3CD*, rs12140725-*FCRL3*, rs2303426-*MSH2*, rs201861379-*IGKV*, rs1143674-*ITGA4*, rs756232-*ITGA4*, rs1143676-*ITGA4*, rs3769823-*CASP8*, rs6897932-*IL7R*, rs1805010-*IL4R*, rs10406069-*CD22*) asociados con el RMA con alguno de los modelos de herencia empleados. Al realizar el test exacto de Fisher para estos polimorfismos, solo el SNP p.Ile75Val-*IL4R* (rs1805010) mantuvo la asociación con el RMA.

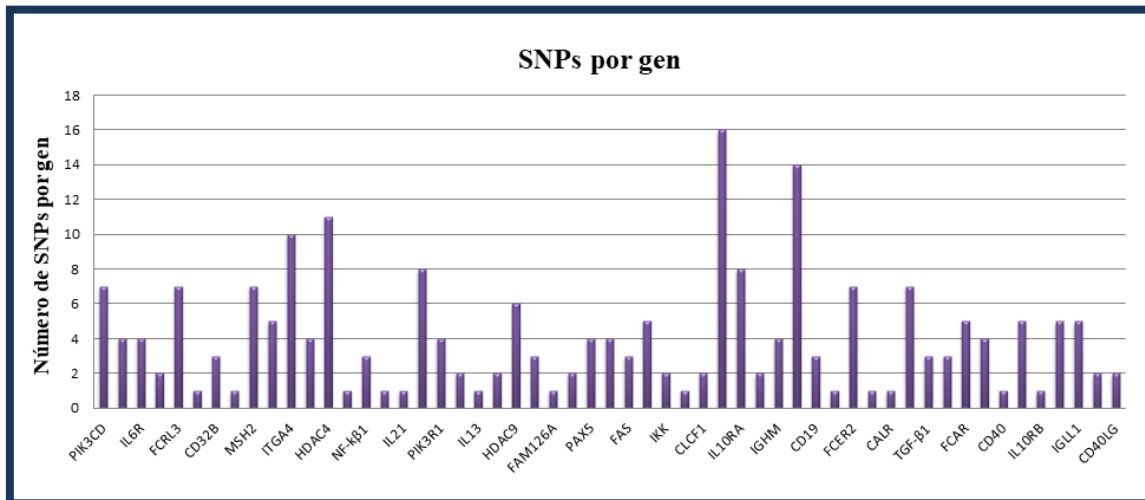


Figura 51. Distribución de los SNPs detectados en los genes relacionados con la biología de las células B, en los donantes.

4.4.2.1 Polimorfismo p.Ile75Val-*IL4R α* en el RMA

El polimorfismo p.Ile75Val en el gen *IL4R α* , es una sustitución, en el nucleótido c.223, de una A por una G que produce una sustitución en el aminoácido 75, de isoleucina por valina (rs1805010) (Figura 52).

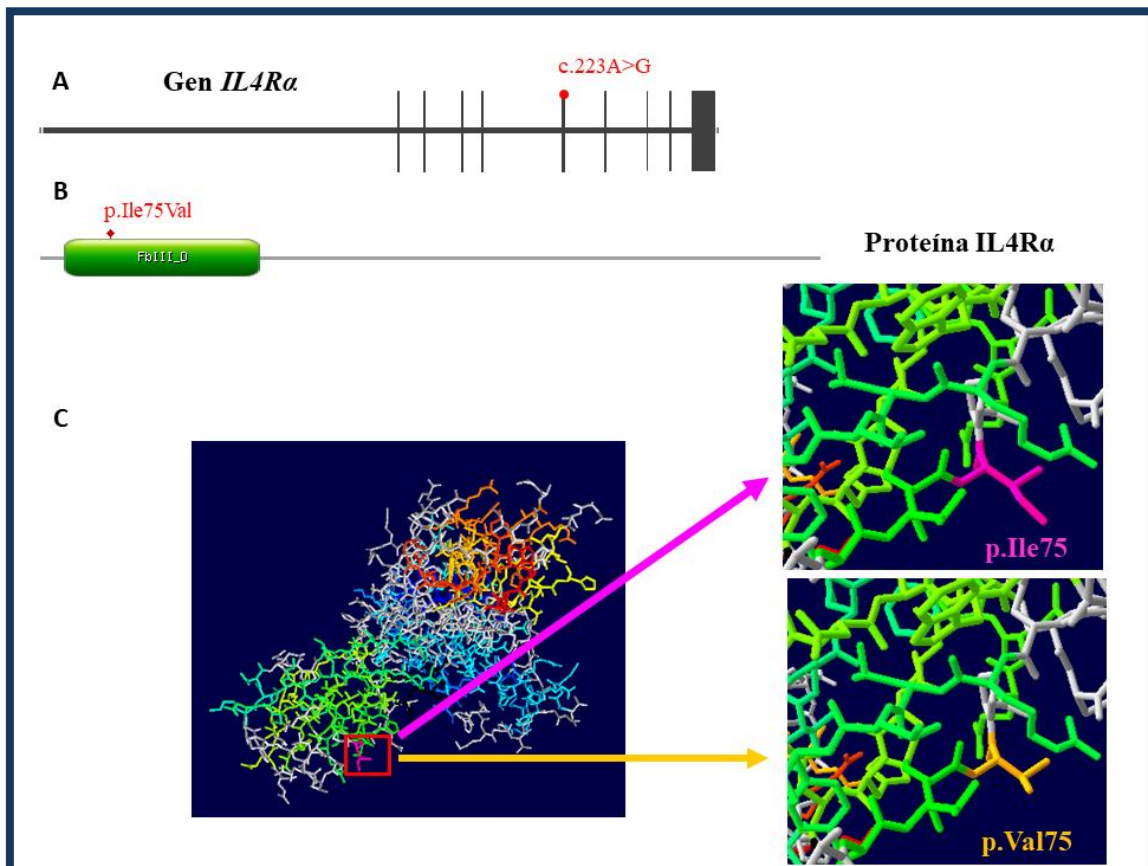


Figura 52. Tránsito del gen *IL4Ra*, dominios y estructura IL4R α . **A.** Representación esquemática del gen *IL4Ra*. En rojo se indica la posición relativa del polimorfismo p.Ile75Val (c.223A>G); **B.** Representación del dominio Fibronectina tipo-III (FbIII) en verde. En rojo se indica la posición relativa del polimorfismo p.Ile75Val; **C.** Estructura cristalográfica IL4R α (PDB ID: 1IAR) indicando el cambio de p.Ile75 (rosa) a p.Val75 (amarillo).

4.4.2.1.1 Bases de datos, análisis de asociación y pruebas *in silico*

La MAF descrita en la base de datos dbSNP, para el alelo G, es de entre 0,4565 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,4512 (ExAC). Sin embargo, el análisis de asociación llevado a cabo para el polimorfismo p.Ile75Val indicó que este era significativamente más frecuente en los donantes de pacientes con RMA, para los modelos de herencia codominante, dominante, sobredominante y aditivo, así como con el test exacto de Fisher (Tabla 20).

rs1805010 <i>IL4R</i> p.Ile75Val	Modelo	Genotipo	Control	RMA	OR (95% IC)	p-valor	AIC	BIC
SNPstats	Codominante	A/A	10 (71,4%)	2 (15,4%)	1,00	0,0073	33,6	37,5
		A/G	4 (28,6%)	10 (76,9%)	12,50 (1,85-84,44)			
		G/G	0 (0%)	1 (7,7%)	ND (0,00-ND)			
	Dominante	A/A	10 (71,4%)	2 (15,4%)	1,00	0,0024	32,2	34,8
		A/G-G/G	4 (28,6%)	11 (84,6%)	13,75 (2,05-92,04)			
	Recesivo	A/A-A/G	14 (100%)	12 (92,3%)	1,00	0,22	39,9	42,5
		G/G	0 (0%)	1 (7,7%)	ND (0,00-ND)			
	Sobredominante	A/A-G/G	10 (71,4%)	3 (23,1%)	1,00	0,01	34,8	37,4
		A/G	4 (28,6%)	10 (76,9%)	8,33 (1,47-47,23)			
	Aditivo	---	---	---	12,99 (1,99-84,58)	0,0018	31,6	34,2
R (F(x) association)	Codominante	A/A	10 (71,4%)	2 (15,4%)	1,00	0,0063	33,6	
		A/G	4 (28,6%)	10 (76,9%)	12,50 (1,85-84,44)			
		G/G	0 (0%)	1 (7,7%)	0,00			
	Dominante	A/A	10 (71,4%)	2 (15,4%)	1,00	0,0024	32,2	
		A/G-G/G	4 (28,6%)	11 (84,6%)	13,75 (2,05-92,04)			
	Recesivo	A/A-A/G	14 (100%)	12 (92,3%)	1,00	0,4815	39,9	
		G/G	0 (0%)	1 (7,7%)	0,00			
	Sobredominante	A/A-G/G	10 (71,4%)	3 (23,1%)	1,00	0,0102	34,8	
		A/G	4 (28,6%)	10 (76,9%)	8,33 (1,47-47,23)			
	Aditivo	---	---	---	12,99 (1,99-84,58)	0,0063	31,6	
Test Exacto de Fisher (Omnibus p-valor)						0,0213		

Tabla 20. Análisis de asociación para el SNP p.Ile75Val en el gen *IL4Rα*. AIC: criterios de información Akaike; BIC: criterios de información bayesianos; IC: Intervalo de confianza; ND: No disponible; OR: Odds ratio.

A continuación, para comprobar el posible efecto del polimorfismo p.Ile75Val en la proteína IL4R α , se realizaron análisis *in silico* y todos ellos indicaron un efecto neutral de la variante (Tabla 21). Sin embargo, en la base de datos *ClinVar* esta variante está descrita como patogénica asociada a la atopía y a una progresión lenta del síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Programa <i>in silico</i>	Predicción
<i>Polyphen</i>	Benigna (0,001)
<i>SIFT</i>	Tolerada (1)
<i>PhD-SNP</i>	Neutral
<i>MutationTaster</i>	Polimorfismo (1)
<i>SNAP2</i>	Neutral (87%)

Tabla 21. Análisis *in silico* para el SNP p.Ile75Val.

4.5 Variantes presentes en las parejas donante-receptor y su asociación con el RMA

El genotipo de los 112 genes seleccionados por su relevancia en la vía del complemento o en la biología de las células B, fue analizado en 14 parejas donante-receptor con RMA (n=28) y en 14 parejas donante-receptor control con TC y ausencia de RMA (n=28). Tras el análisis, se detectaron 662 SNPs en la población de estudio (Anexo 5). Además, se obtuvo un valor para la profundidad media de $83,67 \pm 2,52$ lecturas, siendo el gen *IGHM* el que presenta una profundidad mayor ($280,22 \pm 5,90$ lecturas) y el gen *CD32B* el que presenta una menor profundidad ($35,27 \pm 1,49$ lecturas).

A continuación, se llevó a cabo un primer análisis para determinar si existían diferencias significativas entre el número de discrepancias totales en las parejas donante-receptor con RMA ($103,6 \pm 3,3$) y las parejas donante-receptor control ($108,7 \pm 8,4$), mediante la prueba U de Mann-Whitney con el *software R*. Sin embargo, dicho análisis mostró que

no había diferencias significativas entre el número de discrepancias totales en ambos grupos $p > 0,05$.

En el segundo análisis se comparó la frecuencia de cada SNP encontrado en los dos grupos de parejas donante-receptor. Para ello, se descartaron aquellos SNPs con una frecuencia menor al 7%, es decir, que la variante estuviese presente en menos de 5 de los 56 sujetos (n=402 SNPs descartados, Anexo 5).

A continuación, se comparó la distribución de las frecuencias genotípicas en 260 SNPs (Anexo 5) en donantes y receptores con RMA y control, creando para ello 4 grupos: 1) D+/R+; 2) D+/R-; 3) D-/R+; 4) D-/R-, donde + significa presencia de la variante y - ausencia de la variante.

Tras este análisis solo se encontró un polimorfismo en el gen *ADA* (p.Val178(p=), rs244076) distribuido de forma significativamente diferente entre los 4 grupos y con un $p < 0,05$.

4.5.1 Polimorfismo p.Val178(p=)-*ADA* en el RMA

El polimorfismo p.Val178(p=) en el gen *ADA*, es una variante sinónima que produce un cambio en el nucleótido c.534 de una A por una G, que no afecta al aminoácido valina 178 (p.Val178(p=), Figura 53).

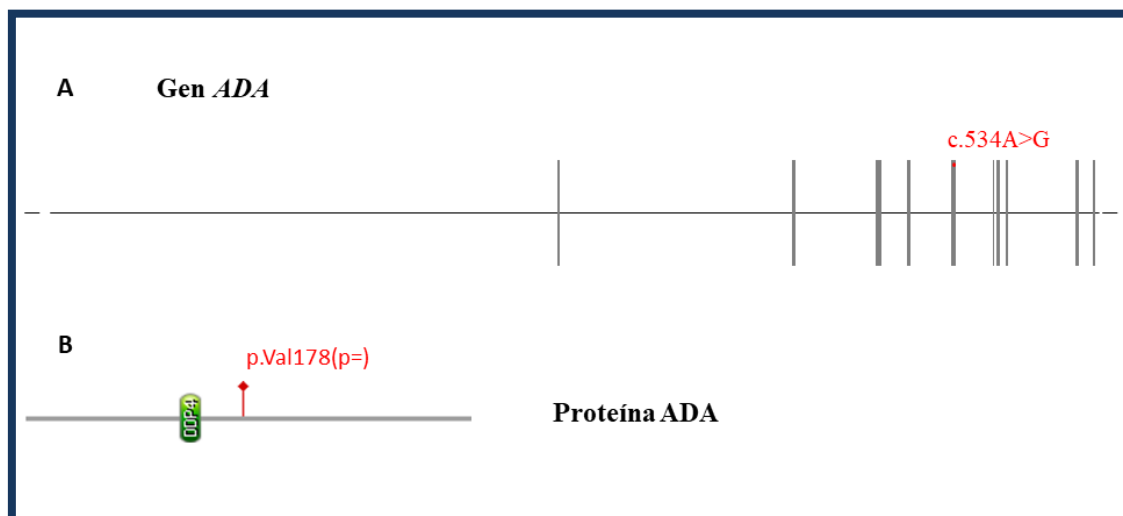


Figura 53. Tránsito del gen *ADA* y estructura primaria de ADA. **A.** Estructura del gen *ADA*. En rojo se refleja la posición relativa del polimorfismo p.Val178(p=) (c.534A>G); **B.** Estructura de la proteína ADA. En verde se muestra la región DDP4 necesaria para la función enzimática y en rojo la posición relativa del polimorfismo p.Val178(p=).

4.5.1.1 Bases de datos, análisis de asociación y pruebas *in silico*

La MAF descrita en la base de datos dbSNP, para el alelo G, es de entre 0,2658 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,2057 (ExAC). Sin embargo, el análisis de las frecuencias genotípicas, llevado a cabo para el SNP p.Val178(p=) indicó que este se encuentra distribuido de forma significativamente diferente entre los 4 grupos creados para su análisis con el *software EPIDAT 3.0* (Tabla 22).

Además, la presencia de este SNP mostró una relación inversa con la aparición del RMA (D-/R- vs D+/R+ o D+/R- o D-/R+), con un OR de 0,07 (IC 95%: 0,01-0,44) y un p-valor de 0,006 para el test exacto de Fisher realizado con *EPIDAT 3.0*.

	ADA-p.Val178(p=)	
	RMA	Control
D+/R+	0	1
D+/R-	2	3
D-/R+	0	6
D-/R-	12	4
p-valor	0,013	

Tabla 22. Distribución del SNP p.Val178-ADA.

A continuación, se llevó a cabo el análisis *in silico* para comprobar si la variante tenía algún efecto en el *splicing* y se observó, que aunque la variante p.Val178(p=) se encontraba alejada de la zona de *splicing* (+56 pb), el predictor HSF indicaba que podría afectar a los ESEs y por tanto podría alterar la conformación final de la proteína (Tabla 23).

* ESE finder matrices para SRp40, SC35, SF2/ASF y SRp55					
VARIANTE	MOTIVO DE REFERENCIA		MOTIVO MUTANTE		VARIACIÓN
	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	
p.Val178(p=) ADA	SC35	AGCCATTG (75,8)	SC35	GGCCATTG (86,5)	+14,2%
* Motivos ESE obtenidos de HSF					
VARIANTE	MOTIVO DE REFERENCIA		MOTIVO MUTANTE		VARIACIÓN
	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	Proteína SR unida	Motivo de referencia (valor 0-100)	
p.Val178(p=) ADA			9G8	GGTGGC (66,9)	Nuevo Sitio
	9G8	GTAGCC (63,4)			Rotura de sitio -100

Tabla 23. Análisis *in silico* para la variante p.Val178(p=). En verde se muestra la creación del nuevo sitio de unión, mientras que en rojo se muestra la pérdida de un sitio de unión para el factor de *splicing* 9G8.

DISCUSIÓN

Uno de los retos más importantes en el RMA es el conocimiento y la comprensión de su etiología con el fin de prevenirlo o tratarlo eficazmente. Aunque los mecanismos involucrados en el RMA no son del todo conocidos, se ha descrito que, tanto el papel del complemento, como de las células B son fundamentales en su progresión, lo cual pone de manifiesto la importancia de ambas vías en el RMA (24-25,28,34,53-54,86).

En esta tesis doctoral analizamos la asociación existente entre el RMA y las variantes presentes en 112 genes, 51 relacionados con la vía del complemento y 61 con la biología de las células B y hemos identificado 7 polimorfismos con diferencias significativas entre ambos grupos:

- ✓ 5 SNPs presentes en receptores: 2 SNPs en genes de la vía del complemento (p.Gly54Asp-*MBL2* y p.Asn428(p=)-*CFP*) y 3 SNPs en el gen *ITGA4* implicado en la biología de las células B [p.Thr615(p=), p.Gln878Arg y p.His961(p=)].
- ✓ 1 SNP (p.Ile75Val) en el gen *IL4Ra*, relacionado con la biología de las células B, en los donantes,
- ✓ 1 SNP (p.Val178(p=)) en el gen *ADA*, que participa en la regulación de las células B, en las parejas donante-receptor con TC.

El primer análisis se realizó en 46 receptores con TC, 23 de los cuales presentaron RMA y 23 controles, trasplantados y con ausencia de RMA en el período de seguimiento post-TC y se estudió la asociación del RMA en 51 genes del complemento. Tras este análisis, se encontraron 2 SNPs asociados:

- 1) p.Gly54Asp-*MBL2*, significativamente más frecuente en los pacientes control, por lo que se asoció con la ausencia de RMA,
- 2) p.Asn428(p=)-*CFP*, más frecuente en pacientes con RMA, que se asoció con una mayor probabilidad de desarrollar esta patología.

Para estimar la repercusión funcional de estos genotipos, a continuación se realizaron estudios de expresión de las proteínas codificadas por los genes implicados. De esta manera se comprobó que el polimorfismo p.Gly54Asp-*MBL2* se asociaba con un déficit de la proteína MBL en los pacientes control que portaban la variante. Mientras que, el estudio de expresión realizado para el polimorfismo p.Asn428(p=)-*CFP* indicaba un aumento de los niveles de properdina en los pacientes con RMA que portaban la variante.

En el caso de los genes relacionados con la biología de las células B en receptores, se hallaron 3 SNPs significativos en el gen *ITGA4* [p.Thr615(p=), p.Gln878Arg y p.His961(p=)], correlacionados con el desarrollo del RMA. Estos 3 SNPs conforman el haplotipo AGT-*ITGA4*, que era significativamente más frecuente en los receptores con RMA. Es importante destacar que al realizar un estudio de expresión en pacientes con este haplotipo, se encontró que los pacientes con RMA y el haplotipo AGT presentaban niveles más bajos en suero de la integrina $\alpha 4$ que los pacientes control con el haplotipo GAC de referencia.

Debido a la importancia de la genética de los donantes en la respuesta post-trasplante, se incluyeron 28 donantes, 14 donantes cuyos receptores presentaban RMA y 14 donantes cuyos receptores fueron considerados como controles. En este caso se estudiaron los mismos genes del complemento y de las células B que en los receptores y se analizó el papel de las variantes en donantes y en las parejas donante-receptor en el contexto del RMA. En el análisis de las variantes en los donantes, se encontró 1 SNP en el gen *IL4R α* (p.Ile75Val), relacionado con las células B. Dicho polimorfismo era significativamente más frecuente en los donantes de los pacientes con TC y RMA por lo que se asoció con una probabilidad mayor de desarrollar esta patología.

En el análisis de las variantes presentes en las parejas donante-receptor, aunque el análisis del número de discrepancias totales, realizado entre las parejas de ambos grupos no fue significativo, se detectaron 662 SNPs, de los cuales fueron seleccionados para su estudio, aquellos que presentaban una frecuencia mayor al 7%, es decir, que la variante estuviese presente en al menos 5 de los 56 pacientes analizados. Tras este análisis se detectó 1 SNP, p.Val178(p=)-*ADA* que participa en la regulación de las células B y cuya presencia significativamente mayor, en las parejas donante-receptor del grupo control, hizo que se le relacionase con la ausencia de RMA.

Por lo tanto, en esta tesis doctoral, se pone de manifiesto la importante implicación de las variantes presentes en los receptores y donantes, en los genes del complemento y de las células B en el desarrollo del RMA tras el TC.

5.1 Variantes presentes en pacientes con TC y su asociación con el RMA

La mayoría de los estudios sobre el RMA se centran en el papel del genotipo de los receptores. En esta tesis doctoral se han encontrado variantes en los receptores asociadas con el RMA, tras un exhaustivo estudio de los genes implicados en las vías del complemento (n=51) y de las células B (n=61). Este amplio enfoque contrasta con los estudios previos en los que, en general, se analizó un número pequeño de genes, entre 1 y 7, relacionados con vías muy diversas (103-106, 109,118,139,145-147,149).

5.1.1 Polimorfismos presentes en los genes del complemento y su relación con el RMA

En esta tesis doctoral hemos descrito dos variantes en genes del complemento asociadas con el RMA (p.Gly54Asp-*MBL2* y p.Asn428(p=)-*CFP*). El único estudio previo en este

ámbito es el realizado por Ermini y colaboradores (187) en dos cohortes de 650 y 520 parejas donante-receptor con TR, de dos hospitales de Reino Unido. En este estudio se centraron en 106 SNPs presentes en 47 genes del complemento, y su relación con la función del injerto, los niveles de creatinina, o la aparición de RMA. Aunque en este estudio no se encontró ninguna asociación entre SNPs presentes en el complemento y el RMA en TR; hay que resaltar que nuestros datos muestran una asociación con el RMA, lo cual puede deberse a las diferencias existentes entre el TR y el TC. A pesar de ello, se requieren nuevos estudios para confirmar el papel de estos polimorfismos en el TC.

5.1.1.1 Efecto protector del polimorfismo p.Gly54Asp-*MBL2* frente al RMA

En esta tesis doctoral, el primer polimorfismo que encontramos asociado con un efecto protector frente al RMA es el p.Gly54Asp (rs1800450) en el gen *MBL2*. Dicho polimorfismo es una sustitución de una guanina por una adenina en el nucleótido c.161 y presenta una MAF, para el alelo A, entre 0,1220 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,1389 (ExAC).

El gen *MBL2*, codifica para la proteína MBL que es un iniciador del complemento por la vía de las lectinas y un componente esencial de la inmunidad innata (188). La proteína MBL consta de un dominio de lectina y otro de tipo colágeno en el cual se encuentra la variante p.Gly54Asp. Aunque se trata de un polimorfismo presente en la población en un 12-14%, las predicciones *in silico* realizadas, indican un efecto deletéreo para esta variante. Estos datos se corresponden con el efecto encontrado en el estudio de expresión realizado en esta tesis doctoral para la proteína MBL. En el estudio de expresión se observó que los pacientes control, con el polimorfismo p.Gly54Asp, presentaban una cantidad de MBL en suero (mediana=6,2 ng/mL), que puede ser clasificada como déficit de MBL (<100 ng/mL) (93,189).

Estos resultados coinciden con lo descrito previamente en la literatura en la cual se ha estudiado el papel del polimorfismo p.Gly54Asp-*MBL2* en el desarrollo de patologías como lupus, asma, artritis reumatoide o una mayor sensibilidad a las infecciones (188-195). En todos estos estudios, los autores describen que el polimorfismo p.Gly54Asp produce un déficit de la proteína MBL, lo que su vez produciría una menor activación del complemento y por tanto una menor activación del sistema inmune. Este hecho aumentaría la sensibilidad ante ciertas patologías y en nuestro caso, esta menor activación del sistema inmune, ejercería un efecto protector frente al RMA.

En el área del trasplante, la mayoría de las investigaciones sobre este polimorfismo se centran en el TR (93,108,187). Aunque en algunos estudios no se encontró una asociación entre la presencia de polimorfismos en el gen *MBL2*, la activación del complemento y la progresión del injerto (108,187), en el estudio llevado a cabo por Golshayan y colaboradores (93) sí muestra una asociación entre el déficit de MBL y el aumento de la incidencia del RC en TR. Sin embargo, en dicho estudio, no se encuentra una relación entre el déficit de MBL y la aparición de RMA; lo cual apoyaría el efecto protector que el déficit de la proteína MBL tendría frente a la aparición del RMA. No obstante, la diversidad de resultados obtenidos entre los diferentes estudios, podría deberse, tal y como explican Pağowska-Klimek y colaboradores (196), a la complejidad para relacionar el desarrollo de una enfermedad con el déficit de la proteína MBL, resaltando que no solo influye la genética sino que también deben considerarse los factores ambientales.

En el caso del TC, encontramos 2 estudios con resultados discrepantes: el primero asocia el déficit de la proteína MBL con una frecuencia mayor de vasculopatía del injerto y RC (197). Mientras que, en el segundo, Fildes y colaboradores (148) asocian el déficit de MBL con menos RC. Desafortunadamente, en estos estudios no se analizaba

la presencia del polimorfismo p.Gly54Asp en los pacientes con déficit de MBL. Por tanto, con nuestros resultados, hemos conseguido vincular, por primera vez, el genotipo p.Gly54Asp con el déficit de MBL, indicando un efecto protector de dicho polimorfismo frente al RMA.

5.1.1.2 Efecto del polimorfismo p.Asn428(p=)-CFP en el RMA

El segundo SNP relacionado de forma positiva y significativa con el RMA, es la variante sinónima p.Asn428(p=) en el gen *CFP* (rs1048118). Esta variante presenta una MAF, entre 0,2069 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,2287 (ExAC).

El gen *CFP* codifica la proteína properdina o factor P, encargada de estabilizar el complejo C3bBb en la vía alternativa y es el único regulador positivo de la vía del complemento que se conoce (100,198). La properdina consta de 6 dominios trombospondina tipo-1 y el SNP p.Asn428(p=) se encontraría en el sexto de estos dominios. Aunque el polimorfismo p.Asn428(p=) es una variante sinónima, distintos estudios reflejan que este tipo de variantes puede alterar la conformación final de la proteína (199-200). De hecho, los estudios *in silico* realizados para esta variante, reflejan que esta podría alterar el proceso de *splicing*. Además, el estudio de expresión realizado en esta tesis doctoral, reflejaba que los pacientes con RMA con la variante, presentaban una concentración mayor de properdina que la hallada en los pacientes control.

El polimorfismo p.Asn428(p=) fue estudiado por Seitsonen y colaboradores (201) en relación con la degeneración macular asociada a la edad. Aunque en dicho estudio encontraron que este polimorfismo era frecuente en sus pacientes, no consiguieron una asociación significativa con la patología. Sin embargo, sí que se ha descrito que déficits en la proteína properdina podrían estar asociados a un aumento del riesgo de infecciones

debido a una menor activación del complemento (202-203). Otros estudios señalan que altos niveles de properdina, como los presentados por nuestros pacientes con RMA, producirían una mayor activación del sistema del complemento por la vía alternativa lo cual podría repercutir en diferentes eventos cardiovasculares (204), o en la progresión de enfermedades como la diabetes de tipo 2 (205). Ambos estudios concuerdan con lo observado en esta tesis doctoral, puesto que una mayor activación del sistema del complemento, estaría relacionado con el RMA.

Sin embargo, los estudios sobre el papel de la properdina y el trasplante, son escasos. El artículo más relevante al respecto, se centra en el RC en TC (106). En dicho estudio, se describió que las BEM de grado 3A (rechazo moderado 2R), contenían una cantidad significativamente mayor de transcritos de CFP que las BEM de grado 0 ó 1. Teniendo en cuenta todos estos datos, podemos postular que, altos niveles de properdina, relacionados con la presencia de la variante p.Asn428(p=), podrían influir en la aparición del rechazo, tanto celular (106) como RMA (datos presentados en esta tesis doctoral), tras el TC.

5.1.2 Polimorfismos presentes en genes relacionados con la biología de las células B y su relación con el RMA

En esta tesis doctoral se ha analizado la presencia de polimorfismos relacionados con la biología de las células B, en receptores con TC. Estudios previos señalan el importante papel de las células B en el RMA como células productoras de anticuerpos y citoquinas (123,124-125). Recientemente se ha empezado a investigar el papel de los polimorfismos en los genes de las células B y su posible papel en el RMA. A este respecto, en el trabajo llevado a cabo por Loupy y colaboradores (61), en 110 receptores con TC, se emplearon *microarrays* para el estudio de los niveles de expresión génica en

genes relacionados con las células NK, células B, activación endotelial e interferón- γ y su relación con la presencia de RMA. En este caso no encontraron relación entre niveles de expresión en genes de las células B y el RMA. En otro estudio de Chang y colaboradores (206), en 231 pacientes con TR, analizaron la presencia de polimorfismos en 2 genes *MIF* (Factor inhibidor de macrófagos) y *BAFF* (Factor activador de las células B) en relación con el RMA. En este caso encontraron dos polimorfismos, uno en el gen *MIF* (rs1007888) relacionado con el aumento del riesgo de positividad para DSAs, y otro en el gen *BAFF* (rs12583006) relacionado con el aumento de DSAs de clase II. Por tanto ambos polimorfismos podrían incrementar el riesgo de desarrollar DSAs tras el trasplante y por tanto RMA. Aunque en esta tesis doctoral no se ha estudiado el gen *BAFF*, sí se ha analizado la presencia de polimorfismos en el gen *MIF*, pero no se halló ningún SNP significativo en dicho gen. Sin embargo el amplio número de genes relacionados con la biología de las células B estudiados, entre los cuales se han encontrado 3 SNPs significativos, podría aportar una visión más amplia del papel de las células B en el RMA tras el TC.

5.1.2.1 Efecto de los polimorfismos (p.Thr615(p=), p.Gln878Arg y p.His961(p=))- *ITGA4* en el RMA

Tras el análisis de los genes asociados a la biología de las células B, se han detectado 3 SNPs significativos en el gen *ITGA4* [p.Thr615(p=) (rs1143674), p.Gln878Arg (rs1143676) y p.His961(p=) (rs7562325)] que se encuentran con una frecuencia significativamente mayor en los pacientes con RMA. Estos polimorfismos han sido relacionados anteriormente con enfermedades como el autismo, el cáncer de colon o complicaciones derivadas del infarto de miocardio (207-209). Sin embargo, esta es la primera vez que se describen los 3 SNPs formando el haplotipo AGT-*ITGA4* que podría influir en la aparición del RMA. Estos polimorfismos presentan una MAF entre 0,3385

(dbSNP-1000 Genomes) y 0,3813 (ExAC) para el SNP p.Thr615(p=), entre 0,2095 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,2633 (ExAC) para el SNP p.Gln878Arg y entre 0,3431 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,3737 (ExAC) para el tercer SNP p.His961(p=).

El gen *ITGA4* codifica la proteína integrina $\alpha 4$ que es crítica para las funciones del sistema inmune y la juega un papel muy importante debido a sus funciones de adhesión y señalización (210). Estas funciones incluyen la migración y activación de células mieloides y de los linfocitos T y B *naïve*, la diferenciación de efectores de linfocitos T: Th1, Th2 o Th16 y los procesos de señalización y unión a la integrina $\alpha 4$, proporcionan señales coestimuladoras para los linfocitos T (211). Además, la integrina $\alpha 4$ participa en la localización de las células B en la médula ósea y en los órganos linfoides secundarios donde participa en las vías de inhibición de la apoptosis de las células B, mediante la regulación de la proteína antiapoptótica Bcl-XL (210).

Aunque los 3 polimorfismos [p.Thr615(p=) (c.1845G>A), p.Gln878Arg (c.2633A>G) y p.His961(p=) (c.2883C>T)] se encuentran fuera de los dominios de repetición FG-GAP de la proteína integrina $\alpha 4$; el polimorfismo p.Thr615(p=) se encuentra en el motivo SG1 que participa en la adhesión celular, mientras que los otros 2 SNPs (p.Gln878Arg y p.His961(p=)) se localizan en la parte final de la proteína. Las predicciones *in silico* muestran que, si bien la variante p.Gln878Arg no parece alterar la función proteica, las variantes sinónimas p.Thr615(p=) y p.His961(p=) sí podrían afectar el *splicing* y por tanto alterar la conformación final de la proteína. Es importante destacar que el estudio de expresión realizado para el haplotipo AGT en los pacientes con RMA, refleja una concentración de $\alpha 4$ significativamente más baja que la encontrada en los pacientes control con el haplotipo GAC de referencia.

En la literatura se ha descrito el papel de las integrinas en enfermedades autoinmunes como el asma, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, autismo, cáncer y la enfermedad de Crohn (207-209,212-215). En el área del trasplante, la mayoría de los estudios se centran en el RC debido al papel de la integrinas en las células T. A este respecto, se ha descrito que la integrina $\alpha_v\beta_6$, que tiene funciones similares a α_4 , se encuentra sobre expresada en el RC en TC en humanos (216-217). Por otra parte, el tratamiento con el anticuerpo anti- α_4 , prolonga la supervivencia del injerto lo que sugiere que el sistema de adhesión de α_4 podría ser importante en la presentación de antígenos, en la activación de los linfocitos T y en el reclutamiento de linfocitos hacia el injerto (218). De hecho, estudios previos han demostrado, en modelos animales, que el tratamiento con el anticuerpo anti- α_4 puede prolongar durante un tiempo, la supervivencia del injerto cardíaco (219-220). Por todo ello, parece que niveles altos de α_4 estarían relacionados con el RC y suprimirlos se asociaría con una mayor supervivencia del injerto. Sin embargo, los resultados obtenidos en el RMA, reflejan que niveles bajos de α_4 estarían relacionados con la progresión de esta patología

Para explicar el posible papel del haplotipo AGT, presente con una frecuencia significativamente mayor en nuestros pacientes con RMA y asociado a unos niveles más bajos de α_4 , se ha tenido en cuenta que la proteína α_4 se expresa en mayor medida en los precursores de las células B que en las células B maduras (221). De esta manera, podemos especular que los niveles bajos de α_4 en estos pacientes podrían deberse, a una mayor presencia de células B maduras que son las encargadas de secretar anticuerpos que se unirán a los antígenos y activarán el complemento produciendo el RMA (222). Además, Weinländer y colaboradores (223), han descrito que la proteína endotelial GBP1 inhibe la proliferación y migración de las células endoteliales durante la angiogénesis, induciendo la expresión de α_4 . Así, bajos niveles de α_4 podrían estar

explicados por la inhibición de GBP1, lo que a su vez produciría una mayor proliferación y migración de las células endoteliales que constituyen el primer objetivo de la respuesta inmune humoral de los receptores (224-225). No obstante, serían necesarios más estudios que permitan comprobar estas hipótesis sobre el papel del haplotipo AGT en el RMA en el TC.

5.2 Variantes presentes en donantes y su asociación con el RMA

En los últimos años diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia que el genotipo de los donantes puede tener en el desarrollo de diversas patologías post-trasplante como: el RC (88,116,142,144), la incidencia de infecciones (116), la supervivencia (115-116,148) o la enfermedad del injerto contra huésped (151). Los genes asociados con estos hallazgos fueron diferentes interleucinas (*IL2*, *IL4*, *IL6* e *IL10*) (88,142,144,151), proteínas de la vía del complemento (MBL y CD59) (115-116) y 5 genes relacionados con la biología de las células B (*TNF α* , *TGF β 1*, *IFN γ* , *CCR2* y *CCR5*) (144,148). Sin embargo, en el RMA, a pesar de la importancia del complemento y las células B, ninguno de estos estudios analizaba la presencia de estos polimorfismos en donantes con RMA.

En esta tesis doctoral, tras el análisis del genotipo de los donantes, no se detectó ningún SNP en los genes del complemento que presentase asociación con el RMA. Con respecto al estudio de genes relacionados con las células B, a pesar de que tampoco se encontró asociación con ningún gen de interleucinas, sí que se halló la variante p.Ile75Val (rs1805010) en el gen *IL4R α* , que codifica para la subunidad α del receptor de IL-4. Además, variante p.Ile75Val se encontró con una frecuencia significativamente mayor en donantes de los pacientes con RMA y por tanto se asoció con esta patología.

5.2.1 Efecto del polimorfismo p.Ile75Val-*IL4Rα* en el RMA

El polimorfismo p.Ile75Val (rs1805010) en el gen *IL4Rα*, es una sustitución de una adenina por una guanina en el nucleótido c.233 que produce una sustitución, en el aminoácido 75, de lisina por valina y presenta una MAF, para el alelo G, entre 0,4565 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,4512 (ExAC).

La subunidad α del receptor de IL-4, codificada por el gen *IL4Rα*, interviene en los procesos de señalización que darán lugar a dos isotipos distintos de anticuerpos, IgG1 e IgE, producidos por las células B a través de la proteína STAT6 en respuesta a un estímulo producido por la IL-4 (226). IL-4R α consta de un dominio fibronectina de tipo-III que es donde se localiza el polimorfismo p.Ile75Val, también denominado p.Ile50Val relativo al péptido maduro.

Aunque las predicciones *in silico* realizadas para la variante p.Ile75Val muestran un efecto neutral en la proteína, es importante destacar que esta variante ha sido descrita previamente como una mutación de “ganancia de función” debido a que es capaz de inducir un estado de fosforilación sostenida en la proteína STAT6 (227). De hecho, en la literatura, esta variante ha sido relacionada con un aumento en suero de los niveles totales de IgE en pacientes con asma atópica, debido a su papel en la recombinación de cambio de clase de las inmunoglobulinas (228). Así, basándonos en los estudios previos, una posible explicación de la función que el SNP p.Ile75Val-*IL4Rα* podría tener en el RMA, sería que los donantes con el alelo p.Val75, asociado a una “ganancia de función”, podrían presentar niveles más altos de IgE/IgG debido al estado de fosforilación sostenida de la proteína STAT6. Esta modificación podría incrementar la estimulación de la IL-4 produciendo una mayor respuesta de los linfocitos Th2 que a su vez incrementarían la actividad de las células B (229). Asimismo, una mayor

producción de IgG por las células B podría aumentar la activación del complemento lo que a su vez incrementaría el riesgo de RMA (222).

5.3 Análisis de variantes presentes en las parejas donante-receptor y su asociación con el RMA

El interés creciente en estudiar, no solo los donantes, sino las discrepancias entre donante y receptor se ha puesto de manifiesto con estudios que describen el papel que las discrepancias, pueden tener en la progresión del trasplante (88,107-108,110-114,141,152-153). En esta tesis doctoral, nos centramos en el estudio de 112 genes implicados en las células B y el complemento, debido a su importante papel en el RMA. En este caso no hemos encontrado ningún SNP en las parejas donante-receptor, en relación con la vía del complemento. Este resultado está en concordancia con estudios previos en los que tampoco se encuentra asociación, en las parejas donante-receptor, entre genes del complemento y el RC (117) y la progresión del injerto (111-112,114,187). Por tanto, parece que los genes del complemento, en relación al RMA, tienen una mayor importancia en los receptores tal y como reflejan nuestros resultados. Diversos estudios llevados a cabo en las células B en parejas donante-receptor, muestran una asociación con las diferentes patologías post-trasplante estudiadas: RC (88,141), función del injerto (141) e infecciones (152-153). Sin embargo, ninguno de estos estudios se centra en el estudio de las variantes presentes en las parejas donante-receptor y su relación con el RMA. En esta tesis doctoral, en el estudio de los SNPs presentes en las parejas donante-receptor, en genes relacionados con las células B, se encontró una variante p.Val178(p=) (rs244076) en el gen *ADA*, asociada a un efecto protector frente al RMA.

5.3.1 Efecto del polimorfismo p.Val178(p=)-ADA en el RMA

En esta tesis doctoral, después de analizar los 316 SNPs encontrados en los 61 genes relacionados con la biología de las células B, se ha encontrado un único SNP significativamente más frecuente en las parejas donante-receptor del grupo control por lo que podría tener un efecto protector frente al RMA. El polimorfismo p.Val178(p=) (rs244076) en el gen *ADA*, es una variante sinónima que presenta una frecuencia MAF, para el alelo G, entre 0,2658 (dbSNP-1000 Genomes) y 0,2057 (ExAC).

La adenosina desaminasa (ADA), codificada por el gen *ADA*, es una enzima metabólica con una función integral en el metabolismo de las purinas que cataliza la desaminación de adenosina y 2'-deoxyadenosina, que son tóxicas para los linfocitos, produciendo inosina y 2'-deoxyinosina, respectivamente. Además, es esencial para la proliferación de las células linfoides y ayuda en la maduración de los monocitos a macrófagos (230-232). Aunque la variante sinónima p.Val178(p=), se encuentra en una de las cadenas β , fuera de la región funcional, se ha descrito que este tipo de variantes sinónimas podrían alterar la conformación final de la proteína, tal y como se ha descrito para el SNP p.Asn428(p=) en el gen *CFP*. En el caso de la variante p.Val178(p=), el análisis *in silico* realizado refleja que este podría modificar el corte y empalme de los exones, afectando a la conformación final de la proteína. Sin embargo, serían necesarios más estudios para confirmar esta predicción.

La enzima ADA es conocida por la inmunodeficiencia combinada grave por déficit de adenosina desaminasa (ADA-SCID) en el cual se produce una disfunción de los linfocitos B y T con un descenso en la producción de inmunoglobulinas como resultado de una mutación en el gen *ADA* (232). Además, otros polimorfismos en este gen, han sido relacionados con patologías como el autismo, el asma y la artritis reumatoide (200,233-234). De hecho, en el estudio llevado a cabo por Sharma y colaboradores

(200), se describe una asociación significativa entre la variante p.Val178(p=), y una baja respuesta al tratamiento de la artritis reumatoide. Desafortunadamente, en dicho estudio no se describe ningún mecanismo por el cual la variante podría afectar a la respuesta. Sin embargo, basándonos en los estudios previos y puesto que la variante p.Val178(p=), es significativamente más frecuente en las parejas donante-receptor del grupo control y que el análisis *in silico* señala que esta variante podría afectar la conformación final de la proteína. Una posible hipótesis sería que el SNP p.Val178(p=) produciría una disminución de los niveles de ADA alterando la función de los linfocitos B y T, ejerciendo, en este caso, un efecto protector frente al RMA.

CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral hemos analizado la asociación existente entre el RMA y las variantes presentes en 112 genes, 51 relacionados con la vía del complemento y 61 con la biología de las células B en 46 receptores con TC, 23 con RMA y 23 pacientes control sin RMA y en 28 donantes, 14 donantes de pacientes con RMA y 14 donantes de pacientes control sin RMA. Además, para los polimorfismos significativos, detectados en los receptores, se realizaron estudios de expresión para analizar el efecto de la variante detectada en la expresión proteica.

De los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, se concluye:

- 1) La variante p.Gly54Asp en el gen *MBL2*, que participa en la vía del complemento, se encuentra con una frecuencia mayor en pacientes control. Esto podría indicar un efecto protector de la variante frente al RMA.
- 2) El estudio de expresión, llevado a cabo para la variante p.Gly54Asp-*MBL2*, indica que esta variante se asocia con un déficit de la proteína MBL lo cual produciría una menor activación del complemento, ejerciendo un efecto protector frente al RMA.
- 3) La variante p.Asn428(p=) en el gen *CFP*, se encuentra con una frecuencia mayor en pacientes con RMA por lo que podría estar relacionada con un aumento del riesgo de desarrollar RMA.
- 4) El estudio de expresión realizado en pacientes con RMA, que portaban la variante p.Asn428(p=)-*CFP*, reflejó un aumento de la concentración en suero de la proteína properdina. Esto podría aumentar la activación del complemento y por tanto aumentar el riesgo de desarrollar RMA.
- 5) Los polimorfismos presentes en los receptores, en los genes relacionados con el sistema del complemento, podrían jugar un papel importante en el desarrollo del RMA.

- 6) El haplotipo AGT en el gen *ITGA4*, relacionado con la biología de las células B, se encuentra con una frecuencia significativamente mayor en pacientes con RMA por lo que podría aumentar el riesgo de desarrollar RMA.
- 7) El estudio de expresión llevado a cabo en los receptores con RMA y el haplotipo AGT-*ITGA4*, mostró una disminución en la concentración de la proteína integrina $\alpha 4$. Esto podría relacionarse con un mayor número de células B maduras, productoras de anticuerpos, lo cual aumentaría el riesgo de desarrollar RMA.
- 8) Los polimorfismos presentes en los receptores, en genes relacionados con la biología de las células B, pueden tener un importante papel en la aparición del RMA. Concretamente el haplotipo AGT en el gen *ITGA4*, presente con una frecuencia significativamente mayor en el grupo de RMA, podría aumentar el riesgo de desarrollar RMA.
- 9) La variante p.Ile75Val en el gen *IL4R α* , relacionado con la biología de las células B, es significativamente más frecuente en los donantes de los pacientes con RMA. Esto podría aumentar el riesgo de desarrollar RMA.
- 10) Las discrepancias entre donante y receptor para la variante p.Val178(p=) en el gen *ADA*, relacionado con la biología de las células B, se encuentran con una frecuencia significativamente mayor en el grupo control. Esto podría indicar un efecto protector frente al RMA.
- 11) Las variantes presentes en los donantes, así como las discrepancias existentes entre donante y receptor, encontradas en genes relacionados con la biología de las células B, y no en los genes de la vía del complemento, reflejan la importancia de estudiar esta vía en los donantes ya que estas pueden jugar un papel importante en el desarrollo del RMA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Conolly BW, Benanzio M. Cosmas and Damian Revisited. En: Hand Transplantation. Ed Springer, Milano. 2007.
2. Kahan BD. Pien Ch'iao, the legendary exchange of hearts, traditional Chinese medicine, and the modern era of cyclosporine. *Transplant Proc.* 1988;20(2 Suppl 2):2-12.
3. Jacopo da Varagine. *Legenda aurea*. trad. it. di C. Ed. Alianza Editoriale. Lisi, Firenze. 1952.
4. Brandacher G. *The Science of Reconstructive Transplantation*. Ed. Humana Press. 2015. 404 p.
5. Greco M, Ciriaco AG, Vonella M, Vitagliano T. The primacy of the Vianeo family in the invention of nasal reconstruction technique. *Ann Plast Surg.* 2010;64(6):702-5.
6. Bath K, Aggarwal S, Sharma V. Sushruta: Father of plastic surgery in Benares. *J Med Biogr.* 2016. *In Press* pii: 0967772016643463.
7. Tubbs RS, Riech S, Verma K, Chern J, Mortazavi M, Cohen-Gadol AA. China's first surgeon: Hua Tuo (c. 108-208 AD). *Childs Nerv Syst.* 2011;27(9):1357-60.
8. Oo KK, Park SS. The midline forehead flap in nasal reconstruction. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011;19(1):141-55.
9. Barker CF, Markmann JF. Historical Overview of Transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(4):a014977.
10. Hauben DJ, Baruchin A, Mahler A. On the history of the free skin graft. *Ann Plast Surg.* 1982;9(3):242-5.
11. Gorer PA. Some reactions of H-2 antibodies in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 1958;73(3):707-21.

12. Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet.* 1948;49(2):87-108.
13. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* 1958;20(1-4):156-66.
14. Payne R. Leukocyte Agglutinins in Human Sera: Correlation Between Blood Transfusions and Their Development. *AMA Arch Intern Med.* 1957;99(4):587-606.
15. Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A. Leucocyte Antibodies in Sera from Pregnant Women. *Nature.* 1958;181(4625):1735-6.
16. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature.* 1964;204:998-1000.
17. Brent L, Brown JB, Medawar PB. Skin transplantation immunity in relation to hypersensitivity reactions of the delayed type. *Bull Soc Int Chir.* 1959;18(2):116-30.
18. Jeannet M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russell PS. Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. *N Engl J Med.* 1970;282(3):111-7.
19. Terasaki PI. A personal perspective: 100-year history of the humoral theory of transplantation. *Transplantation.* 2012;93(8):751-6.
20. Herskowitz A, Soule LM, Ueda K, Tamura F, Baumgartner WA, Borkon AM, *et al.* Arteriolar vasculitis on endomyocardial biopsy: a histologic predictor of poor outcome in cyclosporine-treated heart transplant recipients. *J Heart Transplant.* 1987;6(3):127-36.
21. Hammond EH, Yowell RL, Nunoda S, Menlove RL, Renlund DG, Bristow MR, *et al.* Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: pathologic observations and clinical implications. *J Heart Transplant.* 1989;8(6):430-43.

22. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, *et al.* Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant.* 2003;3(6):708-14.
23. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(10):807-17.
24. Crespo-Leiro MG, Veiga-Barreiro A, Doménech N, Paniagua MJ, Piñón P, González-Cuesta M, Vázquez-Martul E, Ramirez C, Cuenca JJ, Castro-Beiras A. Humoral heart rejection (severe allograft dysfunction with no signs of cellular rejection or ischemia): incidence, management, and the value of C4d for diagnosis. *Am J Transplant.* 2005;5(10):2560-4.
25. Colvin MM, Cook JL, Chang P, Francis G, Hsu DT, Kiernan MS, *et al.* Antibody-Mediated Rejection in Cardiac Transplantation: Emerging Knowledge in Diagnosis and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2015;131(18):1608-39.
26. Hammond MEH, Kfoury AG. Antibody-mediated rejection in the cardiac allograft: diagnosis, treatment and future considerations. *Curr Opin Cardiol.* 2017. *In Press.*
27. Kobashigawa J, Crespo-Leiro MG, Ensminger SM, Reichenspurner H, Angelini A, Berry G, *et al.* Consensus Conference Participants. Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2011;30(3):252-69.
28. Chih S, Chruscinski A, Ross HJ, Tinckam K, Butany J, Rao V. Antibody-Mediated Rejection: An Evolving Entity in Heart Transplantation. *J Transplant.* 2012;2012:210210.

29. Rodriguez ER, Skojec DV, Tan CD, Zachary AA, Kasper EK, Conte JV, *et al.* Antibody-mediated rejection in human cardiac allografts: evaluation of immunoglobulins and complement activation products C4d and C3d as markers. *Am J Transplant.* 2005;5(11):2778-85.
30. Berry GJ, Angelini A, Burke MM, Bruneval P, Fishbein MC, Hammond E, *et al.* The ISHLT working formulation for pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation: evolution and current status (2005-2011). *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(6):601-11.
31. Wu GW, Kobashigawa JA, Fishbein MC, Patel JK, Kittleson MM, Reed EF, *et al.* Asymptomatic antibody-mediated rejection after heart transplantation predicts poor outcomes. *J Heart Lung Transplant.* 2009;28(5):417-22.
32. Kulkarni HS, Bemiss BC, Hachem RR. Antibody-mediated Rejection in Lung Transplantation. *Curr Transplant Rep.* 2015;2(4):316-23.
33. Wu GS, Cruz RJ Jr, Cai JC. Acute antibody-mediated rejection after intestinal transplantation. *World J Transplant.* 2016;6(4):719-28.
34. Butler CL, Valenzuela NM, Thomas KA, Reed EF. Not All Antibodies Are Created Equal: Factors That Influence Antibody Mediated Rejection. *J Immunol Res.* 2017;2017:7903471.
35. Gruessner AC, Sutherland DE, Gruessner RW. Pancreas transplantation in the United States: a review. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(1):93-101.
36. Niederhaus SV, Levenson GE, Lorentzen DF, Robillard DJ, Sollinger HW, Pirsch JD, *et al.* Acute cellular and antibody-mediated rejection of the pancreas allograft: incidence, risk factors and outcomes. *Am J Transplant.* 2013;13(11):2945-55.

37. Kohei N, Tanaka T, Tanabe K, Masumori N, Dvorina N, Valujskikh A, *et al.* Natural killer cells play a critical role in mediating inflammation and graft failure during antibody-mediated rejection of kidney allografts. *Kidney Int.* 2016;89(6):1293-306.
38. Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. *Roitt – Inmunología Fundamentos*. 12^a Edición. Ed. Medica Panamericana (México). 2014.
39. Cernoch M, Viklicky O. Complement in Kidney Transplantation. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:66.
40. Akiyoshi T, Hirohashi T, Alessandrini A, Chase CM, Farkash EA, Neal Smith R, *et al.* Role of complement and NK cells in antibody mediated rejection. *Hum Immunol.* 2012;73(12):1226-32.
41. Jane-wit, D., Manes, T. D., Yi, T., Qin, L., Clark, P., Kirkiles-Smith, N. *et al.* Alloantibody and Complement Promote T Cell-Mediated Cardiac Allograft Vasculopathy through Non-Canonical NF- κ B Signaling in Endothelial Cells. *Circulation.* 2013;128(23).
42. Lee C-Y, Lotfi-Emran S, Erdinc M, Murata K, Velidedeoglu E, Fox-Talbot K, *et al.* The involvement of FcR mechanisms in antibody-mediated rejection. *Transplantation.* 2007;84(10):1324-34.
43. Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, Campbell PM, Mengel M, Einecke G, Chang J, Halloran PF. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2010;10(8):1812-22.
44. Thomas KA, Valenzuela NM, Reed EF. The perfect storm: HLA antibodies, complement, Fc γ Rs, and endothelium in transplant rejection. *Trends Mol Med.* 2015;21(5):319-29.

45. Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant.* 2009;9(11):2459-65.
46. Farkash EA, Colvin RB. Diagnostic challenges in chronic antibody-mediated rejection. *Nat Rev Nephrol.* 2012;8(5):255-7.
47. Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nature Reviews Nephrology.* 2012;8(11):670-8.
48. Orandi BJ, Alachkar N, Kraus ES, Naqvi F, Lonze BE, Lees L, *et al.* Presentation and Outcomes of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Am J Transplant.* 2016;16(1):213-20.
49. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, *et al.* Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014;14(2):272-83.
50. Chih S, Tinckam KJ, Ross HJ. A survey of current practice for antibody-mediated rejection in heart transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13(4):1069-74.
51. Hammond MEH, Revelo MP, Miller DV, Snow GL, Budge D, Stehlik J, *et al.* ISHLT pathology antibody mediated rejection score correlates with increased risk of cardiovascular mortality: A retrospective validation analysis. *J Heart Lung Transplant.* 2016;35(3):320-5.
52. Tible M, Loupy A, Vernerey D, Suberbielle C, Beuscart T, Cazes A, *et al.* Pathologic classification of antibody-mediated rejection correlates with donor-specific antibodies and endothelial cell activation. *J Heart Lung Transplant.* 2013;32(8):769-76.

53. Berry GJ, Burke MM, Andersen C, Bruneval P, Fedrigo M, Fishbein MC, *et al.* The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2013;32(12):1147-62.
54. Bruneval P, Angelini A, Miller D, Potena L, Loupy A, Zeevi A, *et al.* The XIIIth Banff Conference on Allograft Pathology: The Banff 2015 Heart Meeting Report: Improving Antibody-Mediated Rejection Diagnostics: Strengths, Unmet Needs, and Future Directions. *Am J Transplant.* 2017;17(1):42-53.
55. Garg N, Samaniego MD, Clark D, Djamali A. Defining the phenotype of antibody-mediated rejection in kidney transplantation: Advances in diagnosis of antibody injury. *Transplant Rev (Orlando).* 2017;31(4):257-67.
56. Choo SY. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing and Clinical Implications. *Yonsei Med J.* 2007;48(1):11-23.
57. Garces JC, Giusti S, Staffeld-Coit C, Bohorquez H, Cohen AJ, Loss GE. Antibody-Mediated Rejection: A Review. *The Ochsner Journal.* 2017;17(1):46-55.
58. Roedder S, Vitalone M, Khatri P, Sarwal MM. Biomarkers in solid organ transplantation: establishing personalized transplantation medicine. *Genome Med.* 2011;3(6):37.
59. Rabant M, Amrouche L, Lebreton X, Aulagnon F, Benon A, Sauvaget V, *et al.* Urinary C-X-C Motif Chemokine 10 Independently Improves the Noninvasive Diagnosis of Antibody-Mediated Kidney Allograft Rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(11):2840-51.

-
60. Danger R, Paul C, Giral M, Lavault A, Foucher Y, Degauque N, *et al.* Expression of miR-142-5p in peripheral blood mononuclear cells from renal transplant patients with chronic antibody-mediated rejection. *PLoS One*. 2013;8(4):e60702.
 61. Loupy A, Duong Van Huyen JP, Hidalgo L, Reeve J, Racapé M, Aubert O, *et al.* Gene Expression Profiling for the Identification and Classification of Antibody-Mediated Heart Rejection. *Circulation*. 2017;135(10):917-35.
 62. Beck J, Oellerich M, Schulz U, Schauerte V, Reinhard L, Fuchs U, *et al.* Donor-Derived Cell-Free DNA Is a Novel Universal Biomarker for Allograft Rejection in Solid Organ Transplantation. *Transplant Proc*. 2015;47(8):2400-3.
 63. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, Bunnapradist S, Langone AJ, Sood P, *et al.* Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(7):2221-32.
 64. Blume OR, Yost SE, Kaplan B. Antibody-mediated rejection: pathogenesis, prevention, treatment, and outcomes. *J Transplant*. 2012.2012:201754.
 65. Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. *Am J Transplant*. 2014;14(2):255-71.
 66. González-Vílchez F, Segovia Cubero J, Almenar L, Crespo-Leiro MG, Arizón JM, Sousa I, *et al.* Registro Español de Trasplante Cardíaco. XXVII Informe Oficial de la Sección de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante Cardíaco de la Sociedad Española de Cardiología (1984-2015). *Rev Esp Cardiol*. 2016;69(11):1071-82.

67. Costanzo-Nordin MR, Hubbell EA, O'Sullivan EJ, Johnson MR, Mullen GM, Heroux AL, *et al.* Successful treatment of heart transplant rejection with photopheresis. *Transplantation*. 1992;53(4):808-15.
68. Ballester M, Obrador D, Carrió I, Bordes R, Augé JM, Crexells C, *et al.* Reversal of rejection-induced coronary vasculitis detected early after heart transplantation with increased immunosuppression. *J Heart Transplant*. 1989;8(5):413-7.
69. Malafa M, Mancini MC, Myles JL, Gohara A, Dickinson JM, Walsh TE. Successful treatment of acute humoral rejection in a heart transplant patient. *J Heart Lung Transplant*. 1992;11(3 Pt 1):486-91.
70. Gopal AK, Press OW. Clinical applications of anti-CD20 antibodies. *J Lab Clin Med*. 1999;134(5):445-50.
71. Perry DK, Burns JM, Pollinger HS, Amiot BP, Gloor JM, Gores GJ, *et al.* Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am J Transplant*. 2009;9(1):201-9.
72. Trivedi HL, Terasaki PI, Feroz A, Everly MJ, Vanikar AV, Shankar V, *et al.* Abrogation of anti-HLA antibodies via proteasome inhibition. *Transplantation*. 2009;87(10):1555-61.
73. Sberro-Soussan R, Zuber J, Suberbielle-Boissel C, Candon S, Martinez F, Snanoudj R, *et al.* Bortezomib as the sole post-renal transplantation desensitization agent does not decrease donor-specific anti-HLA antibodies. *Am J Transplant*. 2010;10(3):681-6.
74. Stegall MD, Diwan T, Raghavaiah S, Cornell LD, Burns J, Dean PG, *et al.* Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2011;11(11):2405-13.

75. Keren A, Hayes HM, O'Driscoll G. Late humoral rejection in a cardiac transplant recipient treated with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Transplant Proc.* 2006;38(5):1520-2.
76. Ensor CR, Yousem SA, Marrari M, Morrell MR, Mangiola M, Pilewski JM, *et al.* Proteasome Inhibitor Carfilzomib-Based Therapy for Antibody-Mediated Rejection of the Pulmonary Allograft: Use and Short-Term Findings. *Am J Transplant.* 2017;17(5):1380-8.
77. Webber A, Hirose R, Vincenti F. Novel strategies in immunosuppression: issues in perspective. *Transplantation.* 2011;91(10):1057-64.
78. Yeung MY, Gabardi S, Sayegh MH. Use of polyclonal/monoclonal antibody therapies in transplantation. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(3):339-52.
79. Kittleson MM, Patel JK, Moriguchi JD, Kawano M, Davis S, Hage A, *et al.* Heart transplant recipients supported with extracorporeal membrane oxygenation: outcomes from a single-center experience. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(11):1250-6.
80. Kaminski ER. How important is histocompatibility in bone marrow transplantation? *Bone Marrow Transplant.* 1989;4(4):439-44.
81. Chinen J, Buckley RH. Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S324-35.
82. Bach FH. Genetics of transplantation: the major histocompatibility complex. *Annu Rev Genet.* 1976;10:319-39.
83. Edinur HA, Manaf SM, Che Mat NF. Genetic barriers in transplantation medicine. *World J Transplant.* 2016;6(3):532-41.
84. L. Alonso Pulpón, M.G. Crespo-Leiro. *Trasplante Cardíaco.* Ed. Medica Panamericana (México). 2009.

-
85. Michielsen LA, van Zuilen AD, Krebber MM, Verhaar MC, Otten HG. Clinical value of non-HLA antibodies in kidney transplantation: Still an enigma? *Transplant Rev (Orlando)*. 2016;30(4):195-202.
 86. Hiemann NE, Meyer R, Wellnhofer E, Schoenemann C, Heidecke H, Lachmann N, *et al.* Non-HLA antibodies targeting vascular receptors enhance alloimmune response and microvasculopathy after heart transplantation. *Transplantation*. 2012;94(9):919-24.
 87. Zhang Q, Cecka JM, Gjertson DW, Ge P, Rose ML, Patel JK, *et al.* HLA and MICA: Targets of Antibody-Mediated Rejection in Heart Transplantation. *Transplantation*. 2011;91(10):1153-8.
 88. Marshall SE, Welsh KI. The role of cytokine polymorphisms in rejection after solid organ transplantation. *Genes Immun*. 2001;2(6):297-303.
 89. Fox AA, Shernan SK, Body SC. Predictive genomics of adverse events after cardiac surgery. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2004;8(4):297-315.
 90. Morgun A, Shulzhenko N, Gerbase-DeLima M. IL-10 Gene Polymorphisms in Transplantation. Ed. Madame Curie Bioscience Database. Landes Bioscience; 2000-2013.
 91. Muffak-Granero K, Olmedo C, Garcia-Alcalde F, Comino A, Villegas T, Villar JM, *et al.* Gene network profiling before and after transplantation in alcoholic cirrhosis liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2012;44(6):1493-5.
 92. Sánchez-Lázaro I, Herrero MJ, Jordán-De Luna C, Bosó V, Almenar L, Rojas L, *et al.* Association of SNPs with the efficacy and safety of immunosuppressant therapy after heart transplantation. *Pharmacogenomics*. 2015;16(9):971-9.
 93. Golshayan D, Wójtowicz A, Bibert S, Pyndiah N, Manuel O, Binet I, *et al.* Polymorphisms in the lectin pathway of complement activation influence the

- incidence of acute rejection and graft outcome after kidney transplantation. *Kidney Int.* 2016;89(4):927-38.
94. Farrar CA, Sacks SH. Mechanisms of rejection: role of complement. *Curr Opin Organ Transplant.* 2014;19(1):8-13.
95. Mayilyan KR. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. *Protein Cell.* 2012;3(7):487-96.
96. Mizuno M, Suzuki Y, Ito Y. Complement regulation and kidney diseases: recent knowledge of the double-edged roles of complement activation in nephrology. *Clin Exp Nephrol.* 2018; 22(1):3-14.
97. Sellar GC, Cockburn D, Reid KB. Localization of the gene cluster encoding the A, B, and C chains of human C1q to 1p34.1-1p36.3. *Immunogenetics.* 1992;35(3):214-6.
98. Matsushita M, Fujita T. Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol Rev.* 2001;180:78-85.
99. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:157-83.
100. Cortes C, Ohtola JA, Saggi G, Ferreira VP. Local release of properdin in the cellular microenvironment: role in pattern recognition and amplification of the alternative pathway of complement. *Front Immunol.* 2013;3:412.
101. Rgueiro J, López, C, Gonzalez S, Martinez E. *Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune.* 3^a Edición. Ed. Médica Panamericana (México). 2002:20-27.
102. Frank MM, Hester CG. Complement and arthritis: another step in understanding. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(1):104.

103. Caprioli J, Castelletti F, Bucchioni S, Bettinaglio P, Bresin E, Pianetti G, *et al.* Complement factor H mutations and gene polymorphisms in haemolytic uraemic syndrome: the C-257T, the A2089G and the G2881T polymorphisms are strongly associated with the disease. *Hum Mol Genet.* 2003;12(24):3385-95.
104. Bresin E, Rurali E, Caprioli J, Sanchez-Corral P, Fremeaux-Bacchi V, Rodriguez de Cordoba S, *et al.* Combined Complement Gene Mutations in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Influence Clinical Phenotype. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(3):475-86.
105. Ranghino A, Tognarelli G, Basso E, Messina M, Manzione AM, Daidola G, *et al.* A newly identified mutation in the complement factor I gene not associated with early post-transplant recurrence of atypical hemolytic-uremic syndrome: a case report. *Transplant Proc.* 2013;45(7):2785-7.
106. Keslar K, Rodriguez ER, Tan CD, Starling RC, Heeger PS. Complement gene expression in human cardiac allograft biopsies as a correlate of histologic grade of injury. *Transplantation.* 2008;86(9):1319-21.
107. Damman J, Daha MR, Leuvenink HG, van Goor H, Hillebrands JL, Dijk MC, *et al.* Association of complement C3 gene variants with renal transplant outcome of deceased cardiac dead donor kidneys. *Am J Transplant.* 2012;12(3):660-8.
108. Damman J, Kok JL, Snieder H, Leuvenink HG, van Goor H, Hillebrands JL, *et al.* Lectin complement pathway gene profile of the donor and recipient does not influence graft outcome after kidney transplantation. *Mol Immunol.* 2012;50(1-2):1-8.
109. Park MS, Kim SK, Lee TW, Lee SH, Moon JY, Ihm CG, *et al.* A Promoter Polymorphism in the CD46 Complement Regulatory Protein Gene Is Associated With Acute Renal Allograft Rejection. *Transplant Proc.* 2016;48(3):809-12.

110. Brown KM, Kondeatis E, Vaughan RW, Kon SP, Farmer CK, Taylor JD, *et al.* Influence of donor C3 allotype on late renal-transplantation outcome. *N Engl J Med.* 2006;354(19):2014-23.
111. Varaganam M, Yaqoob MM, Döhler B, Opelz G. C3 polymorphisms and allograft outcome in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2009;360(9):874-80.
112. Dhillon N, Walsh L, Krüger B, Mehrotra A, Ward SC, Godbold J, *et al.* Complement component C3 allotypes and outcomes in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2010;16(2):198-203.
113. Jeong JC, Hwang YH, Kim H, Ro H, Park HC, Kim YJ, *et al.* Association of complement 5 genetic polymorphism with renal allograft outcomes in Korea. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(10):3378-85.
114. Wahrman M, Döhler B, Ruhstroth A, Haslacher H, Perkmann T, Exner M, *et al.* Genotypic diversity of complement component C4 does not predict kidney transplant outcome. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(2):367-76.
115. Budding K, van de Graaf EA, Kardol-Hoefnagel T, Broen JC, Kwakkel-van Erp JM, Oudijk EJ, *et al.* A Promoter Polymorphism in the CD59 Complement Regulatory Protein Gene in Donor Lungs Correlates With a Higher Risk for Chronic Rejection After Lung Transplantation. *Am J Transplant.* 2016;16(3):987-98.
116. Cervera C, Balderramo D, Suárez B, Prieto J, Fuster F, Linares L, *et al.* Donor mannose-binding lectin gene polymorphisms influence the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl.* 2009;15(10):1217-24.
117. Bazayr N, Azarpira N, Khatami SR, Galehdari H, Salahi H. Complement C3 gene polymorphism in renal transplantation (an Iranian experience). *Gene.* 2012;498(2):254-8.

118. Le Quintrec M, Zuber J, Moulin B, Kamar N, Jablonski M, Lionet A, *et al.* Complement genes strongly predict recurrence and graft outcome in adult renal transplant recipients with atypical hemolytic and uremic syndrome. *Am J Transplant.* 2013;13(3):663-75.
119. Platt JL, Tsuji S, Cascalho M. Novel functions of B cells in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011;16:61-8.
120. Wehner J, Morrell CN, Reynolds T, Rodriguez ER, Baldwin WM 3rd. Antibody and complement in transplant vasculopathy. *Circ Res.* 2007;100(2):191-203.
121. Zarkhin V, Chalasani G, Sarwal MM. The yin and yang of B cells in graft rejection and tolerance. *Transplant Rev (Orlando).* 2010;24(2):67-78.
122. Clatworthy MR. Targeting B cells and antibody in transplantation. *Am J Transplant.* 2011;11(7):1359-67.
123. Cascalho MI, Chen BJ, Kain M, Platt JL. The paradoxical functions of B cells and antibodies in transplantation. *J Immunol.* 2013;190(3):875-9.
124. Banham GD, Clatworthy MR. B-cell biomarkers in transplantation--from genes to therapy. *Tissue Antigens.* 2015;85(2):82-92.
125. Kim M, Martin ST, Townsend KR, Gabardi S. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options. *Pharmacotherapy.* 2014;34(7):733-44.
126. Pieper K, Grimbacher B and Eible H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(4):959-71.
127. Naradikian MS, Jean L. Scholz, Michael A. Oropallo, and Michael P. Cancro. Understanding B Cell Biology. X. Bosch *et al.* (eds.), *Drugs Targeting B-Cells in Autoimmune Diseases, Milestones in Drug Therapy.* Ed. Springer Basel. 2014.

128. Juge P-A, Gazal S, Constantin A, Mariette X, Combe B, Tebib J, *et al.* Variants of genes implicated in type 1 interferon pathway and B-cell activation modulate the EULAR response to rituximab at 24 weeks in rheumatoid arthritis. *RMD Open* [Internet]. 2017;3(2).
129. Roa S, Isidoro-Garcia M, Davila I, Laffond E, Lorente F, Gonzalez-Sarmiento R. Molecular analysis of activation-induced cytidine deaminase gene in immunoglobulin-E deficient patients. *Clin Dev Immunol.* 2008;2008:146715.
130. Han Q, Yang C, Li N, Li F, Sang J, Lv Y, *et al.* Association of genetic variation in B-cell activating factor with chronic hepatitis B virus infection. *Immunol Lett.* 2017;188:53-8.
131. Deau MC, Heurtier L, Frange P, Suarez F, Bole-Feysot C, Nitschke P, *et al.* A human immunodeficiency caused by mutations in the PIK3R1 gene. *J Clin Invest.* 2014;124(9):3923-8.
132. Zeng C, Fang C, Weng H, Xu X, Wu T, Li W. B-cell lymphocyte kinase polymorphisms rs13277113, rs2736340, and rs4840568 and risk of autoimmune diseases: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(36):e7855.
133. Hishida A, Matsuo K, Goto Y, Mitsuda Y, Hiraki A, Naito M, *et al.* No association between AICDA 7888 C/T polymorphism, *Helicobacter pylori* seropositivity, and the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japanese. *Gastric Cancer.* 2010;13(1):43-9.
134. Messina M, Chiaretti S, Fedullo AL, Piciocchi A, Puzzolo MC, Lauretti A, *et al.* Clinical significance of recurrent copy number aberrations in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia without recurrent fusion genes across age cohorts. *Br J Haematol.* 2017;178(4):583-7.

135. Tooze JA, Hamzic E, Willis F, Pettengell R. Differences between chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma cells by proteomic profiling and SNP microarray analysis. *Cancer Genet.* 2017;218-219:20-38.
136. Kwun J, Oh BC, Gibby AC, Ruhil R, Lu VT, Kim DW, *et al.* Patterns of de novo allo B cells and antibody formation in chronic cardiac allograft rejection after alemtuzumab treatment. *Am J Transplant.* 2012;12(10):2641-51.
137. Lynch RJ, Silva IA, Chen BJ, Punch JD, Cascalho M, Platt JL. Cryptic B cell response to renal transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13(7):1713-23.
138. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA, *et al.* Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int.* 1999;56(1):281-8.
139. Asderakis A, Sankaran D, Dyer P, Johnson RW, Pravica V, Sinnott PJ, *et al.* Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. *Transplantation.* 2001;71(5):674-7.
140. Awad MR, Webber S, Boyle G, Sturchio C, Ahmed M, Martell J, *et al.* The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. *J Heart Lung Transplant.* 2001;20(6):625-30.
141. Poole KL, Gibbs PJ, Evans PR, Sadek SA, Howell WM. Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study. *Transpl Immunol.* 2001;8(4):259-65.
142. Bijlsma FJ, van Kuik J, van Hoffen E, de Jonge N, Tilanus MG, Gmelig-Meyling FH, *et al.* Acute cardiac transplant rejection is associated with low frequencies of interleukin-4 producing helper T-lymphocytes rather than with interleukin-4 promoter or splice variants. *Hum Immunol.* 2002;63(4):317-23.

143. Densem CG, Hutchinson IV, Yonan N, Brooks NH. Donor and recipient-transforming growth factor-beta 1 polymorphism and cardiac transplant-related coronary artery disease. *Transpl Immunol.* 2004;13(3):211-7.
144. Hoffmann S, Park J, Jacobson LM, Muehrer RJ, Lorentzen D, Kleiner D, *et al.* Donor genomics influence graft events: the effect of donor polymorphisms on acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int.* 2004;66(4):1686-93.
145. Girnita DM, Brooks MM, Webber SA, Burckart GJ, Ferrell R, Zdanowicz G, *et al.* Genetic polymorphisms impact the risk of acute rejection in pediatric heart transplantation: a multi-institutional study. *Transplantation.* 2008;85(11):1632-9.
146. Hejr S, Karimi MH, Yaghobi R, Kamali-Sarvestani E, Geramizadeh B, Roozbeh J. Association of IL-17, IL-21, and IL-23R gene polymorphisms with HBV infection in kidney transplant patients. *Viral Immunol.* 2013;26(3):201-6.
147. Kwiatkowska E, Domanski L, Kłoda K, Pawlik A, Safranow K, Ciechanowski K. IL2-IL21 gene cluster polymorphism is not associated with allograft function after kidney transplantation. *Int Urol Nephrol.* 2014;46(12):2415-20.
148. Fildes JE, Walker AH, Howlett R, Bittar MN, Hutchinson IV, Leonard CT, *et al.* Donor CCR5 Delta32 polymorphism and outcome following cardiac transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37(5):2247-9.
149. Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Czerny B, Juzyszyn Z, Dutkiewicz G, *et al.* The association between cytokine gene polymorphisms and kidney allograft survival. *Ann Transplant.* 2008;13(2):54-8.
150. Holweg CT, Baan CC, Balk AH, Niesters HG, Maat AP, Mulder PM, *et al.* The transforming growth factor-beta1 codon 10 gene polymorphism and accelerated

- graft vascular disease after clinical heart transplantation. *Transplantation*. 2001;71(10):1463-7.
151. Karabon L, Wysoczanska B, Bogunia-Kubik K, Suchnicki K, Lange A. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms of patients and donors of allogeneic sibling hematopoietic stem cell transplants associate with the risk of acute graft-versus-host disease. *Hum Immunol*. 2005;66(6):700-10.
152. Biggins SW, Trotter J, Gralla J, Burton JR Jr, Bambha KM, Dodge J, *et al*. Differential effects of donor and recipient IL28B and DDX58 SNPs on severity of HCV after liver transplantation. *J Hepatol*. 2013;58(5):969-76.
153. Firpi RJ, Dong H, Clark VC, Soldevila-Pico C, Morelli G, Cabrera R, *et al*. CC genotype donors for the interleukin-28B single nucleotide polymorphism are associated with better outcomes in hepatitis C after liver transplant. *Liver Int*. 2013;33(1):72-8.
154. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagn Prenat*. 2014;25(2):56-66.
155. Illumina Inc. Guía del sistema NextSeq® 500. Illumina Inc. 2016; Pub. N° 15046563 v02 ESP. San Diego, CA, USA. URL. https://support.illumina.com/content/dam/illumina_support/documents/documentation/system_documentation/nextseq/translations/nextse-500-system-guide-15046563-02-esp.pdf.
156. Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics & Human Genetics*. 2008;9(1):387-402.

-
157. Illumina Inc. Technology Spotlight: Illumina® Sequencing. Illumina Sequencing Technology. Illumina Inc. 2010; Pub N° 770-2007-002. San Diego, CA, USA. URL. https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf.
 158. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, *et al.* Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008;456(7218):53.
 159. Illumina Inc. Technology Spotlight: Illumina® Sequencing. Illumina Two-Channel SBS Sequencing Technology. Illumina Inc. 2016; Pub N° 770-2013-054. San Diego, CA, USA. URL. www.illumina.com/systems/nextseq-sequencer/technology.html.
 160. Illumina Inc. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. Illumina Inc. 2017; Pub N° 770-2012-008-B. San Diego, CA, USA. URL. https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf.
 161. Cock PJA, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(6):1767-71.
 162. Illumina Inc. Technical Note: Sequencing. Quality Scores for Next-Generation Sequencing. Illumina Inc. 2011; Pub N° 770-2011-030. San Diego, CA, USA. URL. https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf.
 163. Trapnell C, Salzberg SL. How to map billions of short reads onto genomes. *Nat Biotechnol*. 2009;27(5):455-7.

-
164. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-9.
 165. Illumina Inc. Technical Note: Sequencing. Estimating Sequencing Coverage. Illumina Inc. 2014; Pub N° 770-2011-022. San Diego, CA, USA. URL.https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_coverage_calculation.pdf.
 166. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, *et al.* The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 2011;27(15):2156-8.
 167. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, *et al.* Integrative Genomics Viewer. *Nat Biotechnol*. 2011;29(1):24-6.
 168. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W71-4.
 169. NCBI Resource Coordinators. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(Database issue):D12-D17.
 170. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22:1928-9.
 171. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
 172. Tregouet DA, Garelle V. A new JAVA interface implementation of THESIAS: Testing Haplotypes Effects in Association Studies. *Bioinformatics* 2007;23:1038-9.

-
173. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, *et al.* ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(Database issue):D862-8.
 174. Guex N, Peitsch. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997;18(15):2714-23.
 175. Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Web Server issue):W452-7.
 176. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-9.
 177. Capriotti E, Calabrese R, Casadio R. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics.* 2006;22(22):2729-34.
 178. Bromberg Y & Rost B. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:3823-35.
 179. Schwarz JM, Rödelberger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods.* 2010;7(8):575-6.
 180. Pertea M, Lin X, Salzberg SL. GeneSplicer: A new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:1185-90.
 181. Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouze P, Brunak S. Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Research.* 1996;24:3439-52.

-
182. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3568-71.
 183. Reese MG, Eeckman, FH, Kulp, D, Haussler, D. Improved Splice Site Detection in Genie. *J Comp Biol.* 1997;4:311-23.
 184. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acid Research.* 2009;37:e67.
 185. Houdayer C, Dehainault C, Mattler C, *et al.* Evaluation of in silico splice tools for decision-making in molecular diagnosis. *Hum Mutat.* 2008;29:975-82.
 186. Clerkin KJ, Farr MA, Restaino SW, Zorn E, Latif F, Vasilescu ER, *et al.* Donor-specific anti-HLA antibodies with antibody-mediated rejection and long-term outcomes following heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2017;36(5):540-5.
 187. Ermini L, Weale ME, Brown KM, Mesa IR, Howell WM, Vaughan R, *et al.* Systematic assessment of the influence of complement gene polymorphisms on kidney transplant outcome. *Immunobiology.* 2016;221(4):528-34.
 188. Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol Immunol.* 2001;38(2-3):133-49.
 189. Luz PR, Miyazaki MI, Neto NC, Nisihara RM, Messias-Reason IJ. High levels of mannose-binding lectin are associated with the risk of severe cardiomyopathy in chronic Chagas Disease. *Int J Cardiol.* 2010;143(3):448-50.
 190. Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, *et al.* High frequencies in African and non-African populations of independent

- mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet.* 1992;1(9):709-15.
191. Davies EJ, Tikly M, Wordsworth BP, Ollier WE. Mannose-binding protein gene polymorphism in South African systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol.* 1998;37(4):465-6.
192. Aittoniemi J, Soranummi H, Rovio AT, Hurme M, Pessi T, Nieminen M, *et al.* Mannose-binding lectin 2 (MBL2) gene polymorphism in asthma and atopy among adults. *Clin Exp Immunol.* 2005;142(1):120-4.
193. Carmolli M, Duggal P, Haque R, Lindow J, Mondal D, Petri WA Jr, *et al.* Deficient serum mannose-binding lectin levels and MBL2 polymorphisms increase the risk of single and recurrent *Cryptosporidium* infections in young children. *J Infect Dis.* 2009;200(10):1540-7.
194. Bronkhorst MW, Patka P, Lieshout EM. Multiple Infectious Complications in a Severely Injured Patient with Single Nucleotide Polymorphisms in Important Innate Immune Response Genes. *Open Orthop J.* 2015;9:367-71.
195. Luz PR, Miyazaki MI, Neto NC, Padeski MC, Barros ACM, Boldt ABW, *et al.* Genetically Determined MBL Deficiency Is Associated with Protection against Chronic Cardiomyopathy in Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2016;10(1):e0004257.
196. Pağowska-Klimek I, Cedzyński M. Mannan-binding lectin in cardiovascular disease. *Biomed Res Int.* 2014;2014:616817.
197. Fiane AE, Ueland T, Simonsen S, Scott H, Endresen K, Gullestad L, *et al.* Low mannose-binding lectin and increased complement activation correlate to allograft vasculopathy, ischaemia, and rejection after human heart transplantation. *Eur Heart J.* 2005;26(16):1660-5.

198. Leshner AM, Nilsson B, Song WC. Properdin in complement activation and tissue injury. *Mol Immunol*. 2013;56(3):191-8.
199. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM. Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res*. 2007;67(20):9609-12.
200. Sharma S, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Singh P, *et al*. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(10):823-8.
201. Seitsonen S, Onkamo P, Torniaainen S, Ihalainen M, Immonen I, Meri S, *et al*. Screening of DNA-variants in the properdin gene (CFP) in age-related macular degeneration (AMD). *Mol Immunol*. 2010;47(6):1334-6.
202. Emonts M, Hazelzet JA, de Groot R, Hermans PW. Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(9):565-77.
203. Bathum L, Hansen H, Teisner B, Koch C, Garred P, Rasmussen K, *et al*. Association between combined properdin and mannose-binding lectin deficiency and infection with *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol*. 2006;43(5):473-9.
204. Hertle E, Arts IC, van der Kallen CJ, Feskens EJ, Schalkwijk CG, Stehouwer CD, *et al*. The alternative complement pathway is longitudinally associated with adverse cardiovascular outcomes. The CODAM study. *Thromb Haemost*. 2016;115(2):446-57.
205. Somani R, Richardson VR, Standeven KF, Grant PJ, Carter AM. Elevated properdin and enhanced complement activation in first-degree relatives of South Asian subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2012;35(4):894-9.
206. Chang Y, Shah T, Min DI. Association of genetic polymorphisms of macrophage inhibitory factor (MIF) and B-cell activating factor (BAFF) with

- the detection of donor specific antibodies in kidney allograft recipients. *Hum Immunol.* 2017;78(10):621-8.
207. Conroy J, Cochrane L, Anney RJ, Sutcliffe JS, Carthy P, Dunlop A, *et al.* Fine mapping and association studies in a candidate region for autism on chromosome 2q31-q32. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009;150B(4):535-44.
208. Bohanes P, Yang D, Loupakis F, LaBonte MJ, Gerger A, Ning Y, *et al.* Integrin genetic variants and stage-specific tumor recurrence in patients with stage II and III colon cancer. *Pharmacogenomics J.* 2015;15(3):226-34.
209. Goncharova I, Golubenko M, Makeeva O, Kashtalap V, Tarasenko N, Markov A, *et al.* Genetic determination of the atherosclerotic plaque stability. *Atherosclerosis.* 2016;252(Supplement C):e78.
210. Rose DM, Han J, Ginsberg MH. Alpha4 integrins and the immune response. *Immunol Rev.* 2002;186:118-24.
211. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110:673-87.
212. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature.* 1992;356:63-6.
213. Abraham WM, Sielczak MW, Ahmed A, *et al.* Alpha 4-integrins mediate antigen-induced late bronchial responses and prolonged airway hyperresponsiveness in sheep. *J Clin Invest.* 1994;93:776-87.
214. Lobb RR, Hemler ME. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J Clin Invest.* 1994;94:1722-8.

215. Chisholm PL, Williams CA, Lobb RR. Monoclonal antibodies to the integrin alpha-4 subunit inhibit the murine contact hypersensitivity response. *Eur J Immunol.* 1993;23:682-8.
216. Yamani MH, Yang J, Masri CS, Ratliff NB, Bond M, Starling RC, *et al.* Acute cellular rejection following human heart transplantation is associated with increased expression of vitronectin receptor (integrin alphavbeta3). *Am J Transplant.* 2002;2:129-33.
217. Yamani MH, Masri CS, Ratliff NB, Bond M, Starling RC, Tuzcu EM, *et al.* The role of vitronectin receptor (alphavbeta3) and tissue factor in the pathogenesis of transplant coronary vasculopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:804-10.
218. Stegall MD, Dean PG, Ninova D, Cohen AJ, Shepard GM, Gup C, *et al.* alpha4 integrin in islet allograft rejection. *Transplantation.* 2001;71:1549-55.
219. Paul LC, Davidoff A, Benediktsson H, Issekutz T. Anti-integrin (LFA-1, VLA-4, and Mac-1) antibody treatment and acute cardiac graft rejection in the rat. *Transpl Int.* 1996;9:420-25.
220. Isobe M, Suzuki J, Yagita H, Okumura K, Yamazaki S, Nagai R, *et al.* Immunosuppression to cardiac allografts and soluble antigens by anti-vascular cellular adhesion molecule-1 and anti-very late antigen-4 monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1994;153:5810-8.
221. Ryan DH, Nuccie BL, Abboud CN, Winslow JM. Vascular cell adhesion molecule-1 and the integrin VLA-4 mediate adhesion of human B cell precursors to cultured bone marrow adherent cells. *J Clin Invest.* 1991;88(3):995-1004.
222. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(1):182-92.

-
223. Weinländer K, Naschberger E, Lehmann MH, Tripal P, Paster W, Stockinger H, *et al.* Guanylate binding protein-1 inhibits spreading and migration of endothelial cells through induction of integrin alpha4 expression. *FASEB J.* 2008;22(12):4168-78.
224. Al-Lamki RS, Bradley JR, Pober JS. Endothelial cells in allograft rejection. *Transplantation.* 2008;86(10):1340-8.
225. Wang S, Zhang C, Wang J, Yang C, Xu M, Rong R, *et al.* Endothelial Cells in Antibody-Mediated Rejection of Kidney Transplantation: Pathogenesis Mechanisms and Therapeutic Implications. *J Immunol Res.* 2017;2017:8746303.
226. Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J Exp Med.* 1988;167:183-96.
227. Ford AQ, Heller NM, Stephenson L, Boothby MR, Keegan AD. An atopy-associated polymorphism in the ectodomain of the IL-4R(alpha) chain (V50) regulates the persistence of STAT6 phosphorylation. *J Immunol.* 2009;183(3):1607-16.
228. Choi WA, Kang MJ, Kim YJ, Seo JH, Kim HY, Kwon JW, *et al.* Gene-gene interactions between candidate gene polymorphisms are associated with total IgE levels in Korean children with asthma. *J Asthma.* 2012;49(3):243-52.
229. Knutsen AP, Vijay HM, Kariuki B, Santiago LA, Graff R, Wofford JD, *et al.* Association of IL-4RA single nucleotide polymorphisms, HLA-DR and HLA-DQ in children with *Alternaria*-sensitive moderate-severe asthma. *Clin Mol Allergy.* 2010;8:5.
230. Carson DA, Kaye J, Seegmiller JE. Lymphospecific toxicity in adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency: Possible role of nucleoside kinase(s). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(12):5677-81.

231. Afrasiabian S, Mohsenpour B, Bagheri KH, Sigari N, Aftabi K. Diagnostic value of serum adenosine deaminase level in pulmonary tuberculosis. *J Res Med Sci.* 2013;18(3):252-4.
232. Whitmore KV, Gaspar HB. Adenosine Deaminase Deficiency - More Than Just an Immunodeficiency. *Front Immunol.* 2016;7:314.
233. Bottini N, De Luca D, Saccucci P, Fiumara A, Elia M, Porfirio MC, *et al.* Autism: evidence of association with adenosine deaminase genetic polymorphism. *Neurogenetics.* 2001;3(2):111-3.
234. Kim SH, Kim YK, Park HW, Kim SH, Kim SH, Ye YM, *et al.* Adenosine deaminase and adenosine receptor polymorphisms in aspirin-intolerant asthma. *Respir Med.* 2009;103(3):356-63.

ANEXOS

Anexo 1: Polimorfismos encontrados en los genes de la vía del complemento, en receptores con TC

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>MASP2</i>	rs1782455	G	A/A	A	0,2926 (G)	34HM/12HZ	variante_sinónima	p.Ser493(p=)
<i>MASP2</i>	rs2273346	A	A/G	G	0,0897 (G)	1HM/2HZ	variante_missense	p.Val377Ala
<i>MASP2</i>	rs12711521	C	A/A	A	0,3745 (C)	32HM/13HZ	variante_missense	p.Asp371Tyr
<i>MASP2</i>	rs12142107	C	T/T	T	0,1007 (T)	1HM/3HZ	variante_sinónima	p.Ala297(p=)
<i>MASP2</i>	rs61735598	C	C/T	T	0,0165 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr294(p=)
<i>MASP2</i>	rs139962539	G	G/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_missense	p.Thr294Met
<i>MASP2</i>	rs72550853	C	C/T	T	0,0105 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro204(p=)
<i>MASP2</i>	rs144247267	T	T/C	C	0,0055 (C)	1HZ	variante_missense	p.His157Arg
<i>MASP2</i>	rs138386377	G	G/A	A	0,0060 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala136(p=)
<i>MASP2</i>	rs72550870	T	T/C	C	0,0174 (C)	3HZ	variante_missense	p.Asp120Gly
<i>CIQA</i>	rs172378	A	G/G	G	0,4148 (A)	10HM/25HZ	variante_sinónima	p.Gly92(p=)
<i>CIQA</i>	rs180679721	A	A/C	C	0,0005 (C)	1HZ	variante_missense	p.Ile99Leu
<i>CIQC</i>	rs80083522	C	T/T	T	0,2926 (T)	6HM/9HZ	variante_sinónima	p.Pro42(p=)
<i>CIQB</i>	rs35477594	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_missense	p.Gly75Arg
<i>CIQB</i>	rs149612866	C	C/T	T	0,0023 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Asn183(p=)
<i>FCN3</i>	rs28385652	G	G/A	A	0,0018 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.His250(p=)
<i>FCN3</i>	rs28357092	AG	AG/A	-	0,0151 (-)	4HZ	variante_frameshift	p.Leu117SerfsTer65
<i>C8A</i>	rs116201358	C	C/A	A	0,0050 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ala36Glu
<i>C8A</i>	rs34047108	A	A/G	G	0,0096 (G)	2HZ	variante_sinónima	p.Ala36(p=)
<i>C8A</i>	rs652785	C	C/A	A	0,3278 (A)	7HM/26HZ	variante_missense	p.Gln93Lys
<i>C8A</i>	rs116129675	C	C/G	G	0,0050 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu197(p=)
<i>C8A</i>	rs150755683	T	T/C	C	0,0009 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Asp202(p=)
<i>C8A</i>	rs17114555	G	G/A	A	0,0234 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp458Asn
<i>C8A</i>	rs386631447	GC	GC/TT	TT	ND	8HZ	variante_missense	p.Arg485Leu
<i>C8A</i>	rs1754533	T	T/C	C	0,1030 (C)	8HZ	variante_sinónima	p.Pro501(p=)
<i>C8A</i>	rs1342440	G	G/C	C	0,1035 (C)	7HZ	variante_missense	p.Glu561Gln

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
C8A	rs41285938	C	C/T	T	0,0050 (T)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro575Ser
C8A	rs17300936	C	C/T	T	0,0728 (T)	1HM/3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro575Leu
C8B	rs202139453	G	G/A	A	0,0009 (A)	1HZ	variante_3_ <i>prima</i> _UTR	3'UTR-10C>A
C8B	rs149900569	A	A/C	C	0,0005 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro572(p=)
C8B	rs61737417	G	G/A	A	0,0027 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr542Ile
C8B	rs139498867	C	C/A	A	0,0037 (A)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp382Tyr
C8B	rs141295453	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg323Trp
C8B	rs12085435	G	G/A	A	0,0421 (A)	8HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro261Leu
C8B	rs1013579	C	T/T	T	0,0192 (C)	42HM/4HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly117Arg
C8B	rs12067507	C	C/T	T	0,0412 (T)	8HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu108Lys
C8B	rs151032934	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro99(p=)
C8B	rs72670382	A	A/G	G	0,0156 (G)	5HZ	variante_5_ <i>prima</i> _UTR	5'UTR-8T>C
CRP	rs1800947	C	C/G	G	0,0412 (G)	7HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu184(p=)
CFH	rs141336681	T	T/G	G	0,0005 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser58Ala
CFH	rs800292	G	G/A	A	0,4345 (A)	2HM/15HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val62Ile
CFH	rs35814900	G	G/A	A	0,0105 (A)	2HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS2-7G>A
CFH	rs1061147	A	C/C	C	0,2958 (A)	14HM/15HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala307(p=)
CFH	rs1061170	C	T/T	T	0,2784 (C)	14HM/15HZ	variante_ <i>missense</i>	p.His402Tyr
CFH	rs2274700	G	A/A	A	0,4368 (A)	4HM/20HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala473(p=)
CFH	rs3753396	A	A/G	G	0,2331 (G)	12HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gln672(p=)
CFH	rs515299	G	G/T	T	0,0517 (T)	1HM/2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser890Ile
CFH	rs1065489	G	G/T	T	0,2326 (T)	8HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu936Asp
CFH	rs534399	G	G/T	T	0,0746 (T)	1HM/2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val1007Leu
CFH	rs34362004	C	C/T	T	0,0041 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr1017Ile
CFH	rs513699	T	T/C	C	0,2585 (C)	8HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS19-5T>C
CFH	rs61822181	C	C/T	T	0,2657 (T)	10HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr1046(p=)
CFH	rs35274867	A	A/T	T	0,0128 (T)	5HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asn1050Tyr
CFH	rs113347629	T	T/C	C	0,0049 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn1050(p=)
CFHR3	rs400344	C	T/T	T	0,4112 (C)	12HM/11HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser159(p=)
CFHR3	rs138839071	T	T/C	C	0,0041 (C)	3HZ	variante_ <i>splice_donor</i>	IVS4+2T>C

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
CFHR1	rs513729	T	T/G	G	0,0008 (G)	2HZ	variante_sinónima	p.Thr145(p=)
CFHR1	rs111236855	T	C/C	C	0,0247 (C)	1HM	variante_sinónima	p.Asn149(p=)
CFHR1	rs425757	C	T/T	T	0,3649 (T)	6HM/4HZ	variante_missense	p.His157Tyr
CFHR1	rs113811987	C	G/G	G	0,3127 (G)	3HM/2HZ	variante_missense	p.Leu159Val
CFHR1	rs388862	G	C/C	C	0,3013 (C)	4HM/5HZ	variante_missense	p.Glu175Gln
CFHR1	rs3201739	A	G/G	G	0,3196 (G)	6HM/1HZ	variante_sinónima	p.Thr196(p=)
CFHR1	rs12406079	G	G/A	A	0,1136 (A)	4HM/5HZ	variante_sinónima	p.Pro223(p=)
CFHR1	rs4230	G	T/T	T	0,4954 (T)	12HM/10HZ	variante_sinónima	p.Arg302(p=)
CFHR1	rs414628	A	T/T	T	0,4258 (T)	9HM/9HZ	variante_sinónima	p.Arg314(p=)
CFHR4	rs145744152	T	T/C	C	0,0060 (C)	5HZ	variante_sinónima	p.Asp75(p=)
CFHR4	rs7417769	A	A/G	G	0,3700 (A)	24HM/17HZ	variante_missense	p.Asn209Ser
CFHR4	rs10801578	G	T/T	T	0,0060 (G)	46HM	variante_missense	p.Glu124Asp
CFHR4	rs150845796	A	A/T	T	0,0975 (T)	7HZ	variante_sinónima	p.Pro509(p=)
CFHR4	rs10494745	G	G/A	A	0,0527 (A)	1HM/9HZ	variante_missense	p.Gly552Glu
CFHR2	rs61746417	G	G/A	A	0,0238 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr71(p=)
CFHR2	rs79351096	G	G/A	A	0,0151 (A)	1HZ	variante_missense	p.Cys72Tyr
CFHR2	rs4085749	C	C/T	T	0,3347 (T)	14HZ	variante_sinónima	p.Cys140(p=)
CFHR2	rs41313888	C	C/T	T	0,0008 (T)	1HZ	stop_gained	p.Arg254Ter
CFHR2	rs41310132	A	A/G	G	0,0082 (G)	1HZ	variante_missense	p.Tyr264Cys
CFHR5	rs147791058	G	G/T	T	0,0055 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Ser128(p=)
CFHR5	rs57960694	G	G/A	A	0,0353 (A)	2HZ	variante_missense	p.Gly145Glu
CFHR5	rs139260377	T	T/C	C	0,0005 (C)	2HZ	variante_sinónima	p.Asn155(p=)
CFHR5	rs16840956	T	T/G	G	0,0027 (G)	1HZ	variante_missense	p.Leu529Arg
CFHR5	rs143140599	T	T/A	A	0,0060 (A)	2HZ	stop_gained	p.Cys568Ter
C4BPA	rs12072216	C	C/G	G	0,0147 (G)	1HZ	variante_missense	p.Pro4Ala
C4BPA	rs55867570	C	C/A	A	0,0270 (A)	1HZ	variante_missense	p.Pro4Gln
C4BPA	rs1126618	T	C/C	C	0,1516 (T)	36HM/10HZ	variante_sinónima	p.Gly225(p=)
C4BPA	rs4844573	T	C/C	C	0,4679 (C)	10HM/7HZ	variante_missense	p.Ile300Thr
C4BPA	rs116700161	G	G/A	A	0,0014 (A)	2HZ	variante_missense	p.Gly423Glu
C4BPA	rs150551566	G	G/C	C	0,0018 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Val535(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
CD55	rs28371628	G	G/A	A	0,0151 (A)	1HZ	variante_intrónica	IVS8-8G>A
CR2	rs61759494	C	C/G	G	0,0069 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro208(p=)
CR2	rs772909129	G	G/A	A	0,00003 (A)	1HZ	variante_missense	p.Arg520His
CR2	rs34349246	C	C/T	T	0,0183 (T)	4HZ	variante_sinónima	p.Thr539(p=)
CR2	rs1048971	G	G/A	A	0,4020 (A)	12HM/21HZ	variante_sinónima	p.Leu592(p=)
CR2	rs17615	G	G/A	A	0,2683 (A)	7HM/23HM	variante_missense	p.Ser639Asn
CR2	rs4308977	T	T/C	C	0,2972 (C)	7HM/20HM	variante_missense	p.Ser663Pro
CR2	rs17616	G	G/A	A	0,2674 (A)	7HM/20HM	variante_missense	p.Arg671His
CR2	rs61735651	T	T/C	C	0,0646 (C)	8HZ	variante_sinónima	p.Ile776(p=)
CR2	rs138062179	C	C/T	T	0,0014 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ser1016Leu
CR2	rs771520863	T	T/C	C	0,00004 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Arg1030(p=)
CR2	rs17618	A	A/G	G	0,0430 (G)	3HZ	variante_missense	p.Ile1052Val
CR2	rs6540433	C	A/A	A	0,0723 (C)	36HM/10HZ	variante_missense	p.Ala1062Glu
CR1	rs4844600	A	A/G	G	0,2024 (A)	31HM/14HZ	variante_sinónima	p.Glu60(p=)
CR1	rs536471861	C	C/T	T	0,0002/1 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg74Cys
CR1	rs3818565	A	G/G	G	ND	6HM/4HZ	variante_missense	p.Thr445Arg
CR1	rs114610598	T	T/G	G	0,0165 (G)	2HZ	variante_intrónica	IVS28-7T>G
CR1	rs2274567	A	A/G	G	0,2230 (G)	1HM/10HZ	variante_missense	p.His1658Arg
CR1	rs3737002	C	C/T	T	0,2660 (T)	3HM/20HZ	variante_missense	p.Thr1858Met
CR1	rs12144461	C	C/T	T	0,0064 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Val1868(p=)
CR1	rs61734513	T	T/C	C	0,0032 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Cys1902(p=)
CR1	rs17259045	A	A/G	G	0,0591 (G)	4HZ	variante_missense	p.Asn1990Ser
CR1	rs370954317	C	C/A	A	0,00004 (A)	1HZ	variante_missense	p.Pro2002Gln
CR1	rs41274768	G	G/A	A	0,0165 (A)	2HZ	variante_missense	p.Val2011Met
CR1	rs17047660	A	A/G	G	0,0572 (G)	1HZ	variante_missense	p.Lys2040Glu
CR1	rs17047661	A	A/G	G	0,1525 (G)	1HM/4HZ	variante_missense	p.Arg2051Gly
CR1	rs4844609	A	T/T	T	0,0078 (A)	44HM/2HZ	variante_missense	p.Thr2060Ser
CR1	rs6691117	A	A/G	G	0,3892 (G)	3HM/14HZ	variante_missense	p.Ile2065Val
CR1	rs113247278	G	G/A	A	0,0018 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp2254Asn
CR1	rs3811381	C	C/G	G	0,1964 (G)	1HM/10HZ	variante_missense	p.Pro2277Arg

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>CRI</i>	rs2296160	A	A/G	G	0,2115 (A)	37HM/11HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr2419Ala
<i>CRI</i>	rs115510609	G	G/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg2476Gln
<i>CD46</i>	rs12126088	A	A/G	G	0,0064 (G)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu139(p=)
<i>COLEC11</i>	rs76490827	A	A/G	G	0,0060 (G)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser40(p=)
<i>COLEC11</i>	rs10170348	G	G/A	A	0,1516 (A)	1HM/6HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Lys53(p=)
<i>COLEC11</i>	rs112274120	A	A/G	G	0,0238 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gln64Arg
<i>COLEC11</i>	rs34347618	T	T/C	C	0,0339 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Arg95(p=)
<i>COLEC11</i>	rs17017791	T	T/C	C	0,0394 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ile99(p=)
<i>COLEC11</i>	rs34436491	C	C/T	T	0,0284 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ile136(p=)
<i>COLEC11</i>	rs139848694	C	C/T	T	0,0003 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala208Val
<i>COLEC11</i>	rs7567833	A	A/G	G	0,1919 (G)	2HM/2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.His233Arg
<i>MASPI</i>	-	TC	TC/T	-	0,0002 ExAC	1HZ	variante_ <i>frameshift</i>	p.Lys591SerfsTer11
<i>MASPI</i>	rs850312	C	C/T	T	0,2119 (T)	5HM/17HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu617(p=)
<i>MASPI</i>	rs72549154	C	C/A	A	0,0473 (A)	6HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg576Met
<i>MASPI</i>	rs710452	A	G/G	G	0,0479 (A)	46HM/1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro458(p=)
<i>MASPI</i>	rs3774268	G	G/A	A	0,1518 (A)	4HM/14HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser445(p=)
<i>MASPI</i>	rs28945068	C	C/T	T	0,0087 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly426Glu
<i>MASPI</i>	rs113938200	C	C/T	T	0,0032 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp368Asn
<i>MASPI</i>	rs16861801	G	G/C	C	0,0009 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser467(p=)
<i>MASPI</i>	rs72549252	A	A/G	G	0,0018 (G)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asp139(p=)
<i>MASPI</i>	rs72549254	G	G/A	A	0,1644 (A)	1HM/17HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS1+4C>T
<i>CFI</i>	rs114013791	C	C/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS12+5G>T
<i>CFI</i>	rs11098044	T	C/C	C	0,0094 (T)	46HM	variante_ <i>missense</i>	p.Thr300Ala
<i>CFI</i>	rs2298749	C	C/T	T	0,3205 (T)	4HM/19HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser268(p=)
<i>CFI</i>	rs79375065	G	G/A	A	0,0357 (A)	2HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS3+6C>T
<i>C9</i>	rs754943606	G	G/A	A	0,00002 (C)	1HZ	<i>stop_gained</i>	p.Arg446Ter
<i>C9</i>	rs35460483	G	G/C	C	0,0151 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu355(p=)
<i>C9</i>	rs114751055	G	G/A	A	0,0060 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Phe212(p=)
<i>C9</i>	rs76184752	A	A/G	G	0,0060 (G)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn178(p=)
<i>C9</i>	rs476569	C	C/T	T	0,4636 (C)	17HM/21HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS1-10G>A

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
C9	rs700233	G	G/A	A	0,2949 (A)	10HM/23HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg5Trp
C7	rs34196526	G	G/A	A	0,0073 (A)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gln61(p=)
C7	rs2271708	T	T/C	C	0,0234 (C)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Cys128Arg
C7	rs1450656	C	C/T	T	0,3434 (C)	18HM/26HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS8-9C>T
C7	rs1063499	G	G/C	C	0,4881 (G)	13HM/29HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser389Thr
C7	rs150696042	G	G/A	A	0,0014 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Glu447(p=)
C7	rs141595076	A	A/G	G	0,0023 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.His559Arg
C7	rs13157656	A	C/C	C	0,1809 (C)	4HM/17HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr587Pro
C7	rs60714178	A	A/T	T	0,0810 (T)	7HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr598Ser
C6	rs374161182	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu766(p=)
C6	rs144666796	C	C/T	T	0,0009 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg656Gln
C6	rs62361567	A	A/G	G	0,0206 (G)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser545(p=)
C6	rs370054003	C	C/A	A	0,00002 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala500Ser
C6	rs61734263	T	T/A	A	0,0055 (A)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser270(p=)
C6	rs61733159	T	T/G	G	0,0440 (G)	6HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr226(p=)
C6	rs141862960	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg182Trp
C6	rs114609505	G	G/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr181Ile
C6	rs1801033	G	G/T	T	0,4373 (G)	22HM/20HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala119Glu
C2	rs765581026	G	G/A	A	0,00003 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Val161(p=)
C2	rs9332739	G	G/C	C	0,0302 (C)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu318Asp
C2	rs1042663	G	G/A	A	0,0971 (A)	10HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala341(p=)
C2	rs9332730	G	G/C	C	0,0444 (C)	6HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS15+6G>C
C2	rs36221133	T	T/C	C	0,0137 (C)	4HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val641Ala
CFB	rs4151667	T	T/A	A	0,0298 (A)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Leu9His
CFB	rs12614	C	C/T	T	0,1671 (T)	19HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg32Trp
CFB	rs641153	G	G/A	A	0,0983 (A)	10HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg32Gln
CFB	rs1048709	A	G/G	G	0,1735 (A)	38HM/8HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Arg150(p=)
CFB	rs4151669	G	G/A	A	0,0284 (A)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro168(p=)
CFB	rs4151670	C	C/T	T	0,0137 (T)	4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Tyr224(p=)
CFB	rs4151651	G	G/A	A	0,0133 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly252Ser

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
CFB	rs201659953	C	C/G	G	0,0007 (G)	1HZ	variante_intrónica	IVS7-10C>G
CFB	rs45600936	C	C/T	T	0,0064 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Arg379(p=)
CFB	rs2072634	C	C/T	T	0,0243 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Val455(p=)
CFB	rs149101394	A	A/G	G	0,0018 (G)	1HZ	variante_missense	p.Lys533Arg
CFB	rs45484591	A	A/C	C	0,0069 (C)	2HZ	variante_missense	p.Glu566Ala
PLG	rs73015965	A	A/G	G	0,0027 (G)	1HZ	variante_missense	p.Lys38Glu
PLG	rs143079629	G	G/A	A	0,0027 (A)	1HZ	variante_missense	p.Arg89Lys
PLG	rs4757	C	C/T	T	0,2509 (T)	9HM/23HZ	variante_sinónima	p.Asn110(p=)
PLG	rs14224	T	T/C	C	0,4501 (C)	12HM/24HZ	variante_sinónima	p.Cys257(p=)
PLG	rs1130656	C	C/T	T	0,3709 (T)	11HM/20HZ	variante_sinónima	p.Phe314(p=)
PLG	rs13231	A	A/G	G	0,1584 (G)	7HM/22HZ	variante_sinónima	p.Gln361(p=)
PLG	rs4252120	T	T/C	C	0,1621 (C)	7HM/23HZ	variante_intrónica	IVS10+9T>C
PLG	rs116573785	T	T/A	A	0,0201 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ser460Arg
PLG	rs4252125	G	G/A	A	0,1621 (A)	7HM/23HZ	variante_missense	p.Asp472Asn
PLG	rs4252170	T	T/C	C	0,0824 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala694(p=)
PLG	rs11060	T	T/G	G	0,3114 (T)	13HM/24HZ	variante_sinónima	p.Gly762(p=)
CLU	rs9331939	G	G/A	A	0,0041 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Asp328(p=)
CLU	rs9331938	C	C/T	T	0,0046 (T)	3HZ	variante_missense	p.Asp328Asn
CLU	rs9331936	T	T/G	G	0,0618 (G)	1HZ	variante_missense	p.Asn317His
CLU	rs150552076	G	G/A	A	0,00009 (A)	1HZ	variante_missense	p.Thr283Ile
CLU	rs7982	A	G/G	G	0,3489 (A)	21HM/21HZ	variante_sinónima	p.His263(p=)
CLU	rs9331892	G	G/A	A	0,0485 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Asp28(p=)
C5	rs41258306	T	T/C	C	0,0380 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Lys1602(p=)
C5	rs17612	T	T/G	G	0,0293 (G)	1HZ	variante_missense	p.Glu1437Asp
C5	rs200624729	C	C/T	T	0,0004 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ala1155Thr
C5	rs17611	C	C/T	T	0,4075 (T)	8HM/21HZ	variante_missense	p.Val802Ile
C5	rs25681	G	G/A	A	0,4084 (A)	8HM/21HZ	variante_sinónima	p.Tyr544(p=)
C5	rs2230214	G	A/A	A	0,0710 (A)	1HM/4HZ	variante_sinónima	p.Thr487(p=)
C5	rs10985126	T	T/C	C	0,2253 (C)	9HZ	variante_sinónima	p.Gly385(p=)
C5	rs17216529	C	C/T	T	0,1511 (T)	5HZ	variante_missense	p.Val145Ile

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>FCN2</i>	rs17514136	A	A/G	G	0,1951 (G)	6HM/17HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-4A>G
<i>FCN2</i>	rs3128624	A	A/G	G	0,3608 (G)	7HM/18HZ	variante_intrónica	IVS2-9A>G
<i>FCN2</i>	rs4520243	T	T/C	C	0,3585 (C)	7HM/18HZ	variante_sinónima	p.Arg74(p=)
<i>FCN2</i>	rs17549193	C	T/T	T	0,2418 (T)	6HM/18HZ	variante_missense	p.Thr236Met
<i>FCN2</i>	rs7851696	G	G/T	T	0,1493 (T)	1HM/8HZ	variante_missense	p.Ala258Ser
<i>IL2RA</i>	rs12722698	G	G/A	A	0,0137 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ile251(p=)
<i>IL2RA</i>	rs2228149	G	G/A	A	0,0673 (T)	5HZ	variante_sinónima	p.His172(p=)
<i>IL2RA</i>	rs11256369	C	C/G	G	0,1928 (G)	13HZ	variante_intrónica	IVS3+7C>G
<i>IL2RA</i>	rs201105599	T	T/A	A	0,00007 (A)	1HZ	variante_missense	p.Glu99Asp
<i>IL2RA</i>	rs2228150	C	T/T	T	0,0673 (T)	1HM/3HZ	variante_sinónima	p.Pro28(p=)
<i>MBL2</i>	rs35805975	G	G/A	A	0,0179 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.Asn136(p=)
<i>MBL2</i>	rs930507	G	G/C	C	0,2294 (G)	31HM/14HZ	variante_sinónima	p.Leu126(p=)
<i>MBL2</i>	rs1800451	C	C/T	T	0,0545 (T)	1HZ	variante_missense	p.Gly57Glu
<i>MBL2</i>	rs1800450	C	C/T	T	0,1218 (T)	1HM/11HZ	variante_missense	p.Gly54Asp
<i>MBL2</i>	rs5030737	G	G/A	A	0,0284 (A)	6HZ	variante_missense	p.Arg52Cys
<i>MBL2</i>	-	GAGA	GAGA/G	-	9,251e-05 ExAC	1HZ	<i>inframe_deletion</i>	p.Leu11del
<i>SERPING1</i>	rs138315643	C	C/T	T	0,0001 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Gly41(p=)
<i>SERPING1</i>	rs35788383	C	C/T	T	0,0032 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Leu251(p=)
<i>SERPING1</i>	rs4926	G	G/A	A	0,1699 (A)	3HM/13HZ	variante_missense	p.Val480Met
<i>C1QTNF5</i>	rs148291350	C	C/T	T	0,0009 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg114Gln
<i>C1S</i>	rs12146727	G	G/A	A	0,1085 (A)	2HM/10HZ	variante_missense	p.Arg119His
<i>C1S</i>	rs7965055	C	C/T	T	0,0778 (T)	8HZ	variante_sinónima	p.Cys147(p=)
<i>C1S</i>	rs1143664	A	A/G	G	0,0801 (G)	9HZ	variante_sinónima	p.Pro389(p=)
<i>C1R</i>	rs75380747	G	G/T	T	0,0453 (T)	5HZ	variante_sinónima	p.Ile412(p=)
<i>C1R</i>	rs1126605	C	C/T	T	0,1749 (T)	12HZ	variante_missense	p.Glu183Lys
<i>C1R</i>	rs1801046	G	G/A	A	0,2527 (A)	4HM/21HZ	variante_missense	p.Ser151Leu
<i>C1R</i>	rs146478898	C	C/T	T	0,0018 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro8(p=)
<i>A2M</i>	rs202210880	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg1031Gln
<i>A2M</i>	rs669	T	T/C	C	0,2656 (C)	7HM/16HZ	variante_missense	p.Ile1000Val
<i>A2M</i>	rs11609582	A	A/T	T	0,1410 (T)	7HZ	variante_intrónica	IVS20-4T>A

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
A2M	rs55761427	G	G/A	A	0,0082 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala844Val
A2M	rs226405	T	C/C	C	0,0018 (T)	48HM	variante_ <i>missense</i>	p.Asn639Asp
A2M	rs149774234	C	C/T	T	0,0027 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Glu443(p=)
A2M	rs2228222	G	G/A	A	0,0307 (A)	4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Tyr432(p=)
A2M	rs201901298	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Val120(p=)
CTSG	rs61737118	G	G/A	A	0,0293 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Phe234(p=)
CTSG	rs45567233	T	T/C	C	0,1003 (C)	1HM/7HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asn125Ser
CTSG	rs61737120	G	G/A	A	0,0082 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr90Ile
CTSG	rs61737123	C	C/G	G	0,0101 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly15Ala
IGHG2	rs28371022	T	T/C	C	0,4363 (T)	9HM/32HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr316(p=)
IGHG2	rs1049810	T	T/C	C	0,0092 (C)	1HM/6HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr273(p=)
IGHG2	rs4983499	A	C/C	C	0,0855 (A)	44HM/4HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser257Ala
IGHG2	rs11160859	G	G/A	A	0,4611 (A)	12HM/23HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Val187(p=)
IGHG2	rs8009156	C	C/T	T	0,2894 (T)	7HM/15HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val161Met
IGHG2	rs11627594	G	G/T	T	0,2917 (T)	5HM/29HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro72Thr
IGHG2	rs374505434	C	C/A	A	0,0001 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly61Val
IGHG2	rs11557955	C	C/T	T	0,4597 (T)	12HM/26HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro54(p=)
IGHG2	rs61983197	A	A/G	G	0,0244 (G)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala45(p=)
IGHG2	rs199678915	C	C/G	G	0,0424 (G)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser7(p=)
IGHA1	rs182183329	C	C/T	T	0,0614 (T)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg273His
IGHA1	rs17349690	A	A/G	G	0,4420 (G)	5HM/36HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asp259(p=)
IGHA1	rs1130510	G	G/A	A	0,4731 (A)	6HM/25HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Arg253(p=)
IGHA1	rs117775520	G	G/A	A	0,0147 (A)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro190Ser
IGHA1	rs1407	C	C/G	G	0,3315 (G)	4HM/21HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu176Asp
IGHA1	rs1128917	T	T/C	C	0,0302 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser128(p=)
IGHA1	rs144145908	C	C/T	T	0,0426 (T)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gln69(p=)
IGHA1	rs374024965	C	T/T	T	0,0002/1 (T)	1HM	variante_ <i>missense</i>	p.Ala25Thr
IGHA1	rs111876280	G	G/A	A	0,0128 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ile24(p=)
ITGAM	rs1143679	G	G/A	A	0,0879 (A)	2HM/9HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg77His
ITGAM	rs35314490	G	G/A	A	0,1213 (A)	2HM/10HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS6-4G>A

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>ITGAM</i>	rs35472514	C	C/G	G	0,1210 (G)	1HM/10HZ	variante_intrónica	IVS7+10C>G
<i>ITGAM</i>	rs11861251	T	T/C	C	0,1044 (C)	1HM/12HZ	variante_missense	p.Met441Thr
<i>ITGAM</i>	rs8056264	C	C/T	T	0,0563 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Leu602(p=)
<i>ITGAM</i>	rs1143682	G	G/A	A	0,3929 (A)	7HM/26HZ	variante_sinónima	p.Thr834(p=)
<i>ITGAM</i>	rs1143683	C	T/T	T	0,1209 (T)	2HM/13HZ	variante_missense	p.Ala859Val
<i>ITGAM</i>	rs1143678	C	T/T	T	0,1259 (T)	2HM/14HZ	variante_missense	p.Pro1147Ser
<i>VTN</i>	rs150241335	G	G/A	A	0,0001 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ile465(p=)
<i>VTN</i>	rs2227728	A	A/G	G	0,1273 (G)	3HZ	variante_sinónima	p.Asn448(p=)
<i>VTN</i>	rs704	G	G/A	A	0,4231 (G)	11HM/20HZ	variante_missense	p.Thr400Met
<i>VTN</i>	rs150566083	C	C/T	T	0,0001 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg389His
<i>VTN</i>	rs782558128	G	G/A	A	0,00004 (A)	1HZ	variante_missense	p.Arg380Cys
<i>VTN</i>	rs2227725	A	G/G	G	0,0214 (A)	44HM/4HZ	variante_intrónica	IVS5-10G
<i>CFD</i>	rs1629038	G	C/C	C	0,4460 (C)	15HM/21HZ	variante_intrónica	IVS2-9G>C
<i>C3</i>	rs528697923	G	G/GGT	GT	0,0088 (G)	4HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-3_-2dupAC
<i>C3</i>	rs17030	G	G/A	A	0,4922 (A)	15HM/26HZ	variante_sinónima	p.Pro1632(p=)
<i>C3</i>	rs11569565	G	G/A	A	0,0751 (A)	4HZ	variante_intrónica	IVS38-8C>T
<i>C3</i>	rs2277984	C	C/T	T	0,4853 (T)	15HM/26HZ	variante_intrónica	IVS36-4G>A
<i>C3</i>	rs7951	G	G/A	A	0,0865 (A)	8HZ	variante_sinónima	p.Ala1437(p=)
<i>C3</i>	rs11569541	A	A/G	G	0,0041 (G)	1HZ	variante_missense	p.Ile1367Thr
<i>C3</i>	rs2287845	G	G/A	A	0,2729 (G)	16HM/26HZ	variante_intrónica	IVS22+7C>T
<i>C3</i>	rs423490	A	G/G	G	0,1799 (A)	29HM/18HZ	variante_sinónima	p.Ala915(p=)
<i>C3</i>	rs428453	C	C/G	G	0,2729 (C)	16HM/27HZ	variante_sinónima	p.Val807(p=)
<i>C3</i>	rs406514	G	A/A	A	0,1804 (G)	29HM/18HZ	variante_intrónica	IVS17-8C>T
<i>C3</i>	rs2230205	C	C/T	T	0,2097 (T)	1HM/11HZ	variante_sinónima	p.Thr612(p=)
<i>C3</i>	rs2230204	C	C/T	T	0,3938 (T)	5HM/16HZ	variante_sinónima	p.Val564(p=)
<i>C3</i>	rs2230203	G	G/T	T	0,0797 (T)	1HM/14HZ	variante_sinónima	p.Pro518(p=)
<i>C3</i>	rs11569422	C	C/G	G	0,0128 (G)	1HZ	variante_missense	p.Glu469Asp
<i>C3</i>	rs1047286	G	G/A	A	0,0856 (A)	1HM/17HZ	variante_missense	p.Pro314Leu
<i>C3</i>	rs2230201	C	C/T	T	0,2221 (T)	1HM/12HZ	variante_sinónima	p.Arg304(p=)
<i>C3</i>	rs2230200	G	G/A	A	0,0069 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Tyr261(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
C3	rs2230199	G	G/C	C	0,0975 (C)	2HM/15HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg102Gly
C3	rs528697923	G	G/GGT	GT	0,0088 (G)	1HZ	variante_5_ <i>prima</i> _UTR	5'UTR-2dupAC
CALR	rs187996595	A	A/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr169(p=)
CALR	-	AGAG	AGAG/A	-	0,0001 ExAC	1HZ	<i>inframe_deletion</i>	p.Glu378del
CALR	rs201971744	A	A/G	G	0,0009 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu380Gly
C5AR2	rs138613140	C	C/T	T	0,0055 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala43(p=)
C5AR2	rs754683420	G	G/T	T	0,00003 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg173Leu
C5AR2	rs36046934	G	G/A	A	0,0169 (A)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala199(p=)
ITGB2	rs17004713	G	G/A	A	0,0211 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Cys631(p=)
ITGB2	rs5030672	G	G/A	A	0,0082 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg586Trp
ITGB2	rs2230530	G	G/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Cys534(p=)
ITGB2	rs235326	A	G/G	G	0,2331 (A)	23HM/18HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Val441(p=)
ITGB2	rs141201564	G	G/A	A	0,0023 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr391Met
ITGB2	rs2230529	G	T/T	T	0,1928 (T)	3HM/14HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Val367(p=)
ITGB2	rs235330	A	A/T	T	0,00006 (T)	1HM	variante_ <i>missense</i>	p.Gln354His
ITGB2	rs2230528	C	T/T	T	0,1896 (T)	4HM/17HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gly273(p=)
ITGB2	rs17004715	G	G/A	A	0,0458 (A)	4HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS5+7C>T
ITGB2	rs35903905	C	C/T	T	0,0169 (T)	4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser39(p=)
ITGB2	rs5030667	G	G/A	A	0,0160 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu11(p=)
ITGB2	rs11088969	C	C/A	A	0,1690 (A)	5HM/11HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu8(p=)
CFP	rs1048118	G	A/A	A	0,1814 (A)	11HM/2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn428(p=)
VSIG4	rs146489734	C	C/A	A	0,0145 (A)	1HZ	variante_3_ <i>prima</i> _UTR	3'UTR*702C>A
VSIG4	rs17315645	C	T/T	T	0,0641 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly279Glu

HM: homocigosis; HZ: heterocigosis; MAF: Frecuencia alélica minoritaria; ND: No disponible; prot: proteína.

Anexo 2: Polimorfismos encontrados en genes relacionados con las células B, en receptores con TC

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>PIK3CD</i>	rs150205370	G	G/A	A	0,000008 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val98Ile
<i>PIK3CD</i>	rs113176101	C	C/T	T	0,0234 (T)	1HZ	variante_ intrónica	IVS4-3C>T
<i>PIK3CD</i>	rs2230735	A	A/G	G	0,0453 (G)	2HZ	variante_ sinónima	p.Thr226(p=)
<i>PIK3CD</i>	rs145697393	G	G/A	A	0,0041 (A)	1HZ	variante_ sinónima	p.Pro236(p=)
<i>PIK3CD</i>	rs557471275	T	T/C	C	0,0001 C	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Met285Thr
<i>PIK3CD</i>	rs28730668	G	G/A	A	0,0220 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val296Ile
<i>PIK3CD</i>	rs28730669	G	G/C	C	0,0096 (C)	3HZ	variante_ intrónica	IVS7-9G>C
<i>PIK3CD</i>	rs61755420	C	C/G	G	0,0128 (G)	5HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser312Cys
<i>PIK3CD</i>	rs139848768	C	C/T	T	0,0037 (T)	2HZ	variante_ sinónima	p.Ser773(p=)
<i>PIK3CD</i>	rs11121484	C	C/T	T	0,2294 (T)	2HM/4HZ	variante_ sinónima	p.Tyr936(p=)
<i>VCAM1</i>	rs2392221	C	C/T	T	0,1474 (T)	8HZ	variante_ intrónica	IVS3-7C>T
<i>VCAM1</i>	rs114207303	C	C/G	G	0,0037 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Leu555Val
<i>VCAM1</i>	rs3176878	C	C/T	T	0,1218 (T)	1HM/10HZ	variante_ sinónima	P.Asp693(p=)
<i>VCAM1</i>	rs3176879	A	A/G	G	0,0626 (G)	1HZ	variante_ sinónima	p.Lys736(p=)
<i>IL6R</i>	rs2228144	G	G/A	A	0,1190 (A)	14HZ	variante_ sinónima	p.Ala37(p=)
<i>IL6R</i>	rs2229237	C	C/T	T	0,0220 (T)	5HZ	variante_ sinónima	p.His70(p=)
<i>IL6R</i>	rs2228145	A	A/C	C	0,3196 (C)	8HM/15HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp358Ala
<i>IL6R</i>	rs2228146	G	G/A	A	0,0531 (A)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val385Ile
<i>CHRNA2</i>	rs3926124	A	A/G	G	0,0957 (G)	2HZ	variante_ intrónica	IVS2+9A>G
<i>CHRNA2</i>	rs55857552	G	G/A	A	0,0013 (A)	2HZ	variante_ sinónima	p.Ala411(p=)
<i>FCRL3</i>	rs2282284	T	T/C	C	0,0536 (C)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asn721Ser
<i>FCRL3</i>	rs944627	G	G/A	A	0,0339 (A)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro660Leu
<i>FCRL3</i>	rs4319323	T	T/C	C	0,0325 (C)	2HZ	variante_ sinónima	p.Pro643(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
FCRL3	rs71630672	G	G/A	A	0,0009 (A)	1HZ	stop_gained	p.Gln121Ter
FCRL3	rs7522061	T	T/C	C	0,4876 (T)	11HM/12HZ	variante_missense	p.Asn28Asp
FCRL3	rs12140725	G	A/A	A	0,1735 (A)	5HM/4HZ	variante_intrónica	IVS3-8C>T
FCRL3	rs113752575	CGGCC	CGGCC/TG GCG	TGGCG	0,0215 (T)	2HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR- 7delGGCCGinsCGCCA
FCRL3	rs144282361	C	C/T	T	0,0018 (T)	3HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-10G>A
FCERIA	rs41264475	C	C/A	A	0,0096 (A)	2HZ	variante_missense	p.Asn247Lys
CD32B	rs5017568	G	G/A	A	0,0054 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.Gln63(p=)
CD32B	rs144573139	G	G/A	A	0,0055 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Gly73(p=)
CD32B	rs6665610	G	G/A	A	0,1504 (A)	9HZ	variante_sinónima	p.Thr112(p=)
CD32B	rs182968886	G	G/A	A	0,0975 (A)	1HM/8HZ	variante_sinónima	p.Leu204(p=)
FASLG	rs61756244	G	G/A	A	0,0458 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro49(p=)
IL10	rs200783164	G	G/T	T	0,0009 (T)	1HZ	variante_missense	p.Leu71Met
MSH2	rs2303426	C	G/G	G	0,3846 (C)	12HM/10HZ	variante_intrónica	IVS1+9C>G
MSH2	rs35898375	G	G/A	A	0,0018 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Lys113(p=)
MSH2	rs17217772	A	A/G	G	0,0188 (G)	1HZ	variante_missense	p.Asn127Ser
MSH2	rs587779193	G	G/A	A	ND	2HZ	variante_intrónica	IVS5+1G>A
MSH2	rs4987188	G	G/A	A	0,0092 (A)	2HZ	variante_missense	p.Gly322Asp
MSH2	rs63750505	G	G/A	A	0,0009 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Gln324(p=)
MSH2	rs17224360	T	T/C	C	0,0073 (C)	1HM/3HZ	variante_intrónica	IVS6-10T>C
MSH2	rs12998837	A	A/T	T	0,0650 (T)	9HZ	variante_intrónica	IVS9-9A>T
MSH2	rs61756466	T	T/C	C	0,0032 (C)	2HZ	variante_sinónima	p.Leu556(p=)
MSH2	rs2303428	T	T/C	C	0,1282 (C)	1HM/9HZ	variante_intrónica	IVS12-6T>C
IGKV	rs201861379	T	T/C	C	0,0747 (C)	5HZ	variante_sinónima	p.Leu76(p=)
IGKV	rs386648262	AGACGCC TT	AGACGCCT T/GGAGGC ATC	GGAGGC ATC	0,07473(G)	5HZ	variante_missense	p.Lys72Asp

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>IGKV</i>	rs10865492	C	C/T	T	0,1519 (T)	10HZ	variante_sinónima	p.Ala73(p=)
<i>IGKV</i>	rs200979873	T	T/G	G	0,0050 (G)	1HZ	variante_missense	p.Lys64Asn
<i>IGKV</i>	rs201626492	A	A/G	G	0,0014 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu55(p=)
<i>IGKV</i>	rs112599788	G	G/A	A	0,0362 (A)	5HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-16C>T
<i>ITGA4</i>	rs35419274	G	G/A	A	0,0005 (A)	3HZ	variante_missense	p.Val359Ile
<i>ITGA4</i>	rs1143674	G	G/A	A	0,3813 (A)	8HM/20HZ	variante_sinónima	p.Thr615(p=)
<i>ITGA4</i>	rs35322532	T	T/A	A	0,0110 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ser634Thr
<i>ITGA4</i>	rs1143675	T	T/C	C	0,0023 (C)	1HZ	variante_missense	p.Val824Ala
<i>ITGA4</i>	rs1143676	A	A/G	G	0,2633 (G)	3HM/17HZ	variante_missense	p.Gln878Arg
<i>ITGA4</i>	rs7562325	C	C/T	T	0,3737 (T)	9HM/18HZ	variante_sinónima	p.His961(p=)
<i>ITGA4</i>	rs61731209	C	C/T	T	0,0027 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Asn1026(p=)
<i>CASP8</i>	rs3769824	T	T/C	C	0,0298 (C)	4HZ	variante_iniciadora_codon	p.Met1Thr
<i>CASP8</i>	rs3769823	A	A/G	G	0,3484 (A)	24HM/21HZ	variante_missense	p.Lys14Arg
<i>CASP8</i>	rs534884641	CG	CG/C	-	0,0002 (T)	1HZ	variante_frameshift	p.Asp129IlefsTer4
<i>CASP8</i>	rs17860422	C	C/T	T	0,0023 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Ser172(p=)
<i>CASP8</i>	rs1045485	G	G/C	C	0,0678 (C)	1HM/9HZ	variante_missense	p.Asp344His
<i>CASP8</i>	rs779189628	A	A/G	G	0,000008 (G)	1HZ	variante_missense	p.Gln350Arg
<i>CASP8</i>	rs1045487	G	G/A	A	0,1488 (A)	6HZ	variante_sinónima	p.Gln379(p=)
<i>HDAC4</i>	rs61754649	G	G/A	A	0,0142 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.Ser874(p=)
<i>HDAC4</i>	rs1063639	G	G/A	A	0,4199 (G)	14HM/25HZ	variante_sinónima	p.Pro855(p=)
<i>HDAC4</i>	rs61752234	T	T/C	C	0,0366 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr787(p=)
<i>HDAC4</i>	rs7585225	T	C/C	C	0,1777 (T)	34HM/12HZ	variante_intrónica	IVS15+10A>G
<i>HDAC4</i>	rs79199572	C	C/T	T	0,0234 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Pro522(p=)
<i>HDAC4</i>	rs10207474	T	T/C	C	0,0847 (C)	1HZ	variante_intrónica	IVS11+10A>G
<i>HDAC4</i>	rs35291459	C	C/T	T	0,0788 (T)	4HZ	variante_sinónima	p.Pro423(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>HDAC4</i>	rs2290087	A	G/G	G	0,1378 (A)	33HM/11HZ	variante_intrónica	IVS7-7T>C
<i>HDAC4</i>	rs148880349	G	G/A	A	0,0006 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.His227(p=)
<i>HDAC4</i>	rs2290092	C	T/T	T	0,1021 (T)	2HM/7HZ	variante_intrónica	IVS4+8G>A
<i>CD38</i>	rs78580781	C	C/T	T	0,0027 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Tyr70(p=)
<i>CD38</i>	rs1800561	C	C/T	T	0,0018 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg140Trp
<i>CD38</i>	rs1800051	A	A/C	C	0,0888 (C)	5HZ	variante_sinónima	p.Ile168(p=)
<i>CD38</i>	rs950566	A	A/G	G	0,0110 (G)	1HZ	variante_intrónica	IVS5+5A>G
<i>CD38</i>	rs139655522	A	A/G	G	0,0000 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Arg247(p=)
<i>NF-kβ</i>	rs4648039	C	C/T	T	0,0087 (T)	4HZ	variante_sinónima	p.Tyr350(p=)
<i>NF-kβ</i>	rs1609993	T	C/C	C	0,0417 (T)	38HM/7HZ	variante_sinónima	p.Aala381(p=)
<i>NF-kβ</i>	rs4648072	A	A/G	G	0,0119 (G)	1HZ	variante_missense	p.Met507Val
<i>NF-kβ</i>	rs190121351	T	T/C	C	0,0005 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Asp581(p=)
<i>NF-kβ</i>	rs4648093	G	G/A	A	0,0243 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr585(p=)
<i>NF-kβ</i>	rs777416263	C	C/T	T	0,00002 (T)	1HZ	variante_intrónica	IVS20+9C>T
<i>NF-kβ</i>	rs148268461	T	T/TA	A	0,1021 (A)	4HZ	variante_intrónica	IVS23+2_2749+3insA
<i>IL2</i>	rs2069763	C	A/A	A	0,3443 (A)	4HM/18HZ	variante_sinónima	p.Leu38(p=)
<i>IL21</i>	rs4833837	G	A/A	A	0,1992 (G)	25HM/16HZ	variante_sinónima	p.Cys78(p=)
<i>IL7R</i>	rs1494558	T	T/C	C	0,3869 (T)	17HM/24HZ	variante_missense	p.Ile66Thr
<i>IL7R</i>	rs1494555	G	G/A	A	0,3260 (G)	18HM/23HZ	variante_missense	p.Val138Ile
<i>IL7R</i>	rs2228141	C	C/T	T	0,1346 (T)	1HM/8HZ	variante_sinónima	p.His165(p=)
<i>IL7R</i>	rs6897932	C	C/T	T	0,1909 (T)	3HM/12HZ	variante_missense	p.Thr244Ile
<i>IL7R</i>	rs41270321	A	A/C	C	0,0078 (C)	1HZ	variante_missense	p.Asn348Thr
<i>IL7R</i>	rs3194051	A	A/G	G	0,2257 (G)	4HM/16HZ	variante_missense	p.Ile356Val
<i>PIK3R1</i>	rs706713	C	C/T	T	0,4414 (T)	3HM/20HZ	variante_sinónima	p.Tyr73(p=)
<i>PIK3R1</i>	rs376498902	T	T/C	C	0,00002 (C)	1HZ	variante_intrónica	IVS2+9T>C

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>PIK3R1</i>	rs375394677	C	C/A	A	0,0004 (A)	1HZ	variante_intrónica	IVS3+5C>A
<i>PIK3R1</i>	rs61749601	T	T/C	C	0,0156 (C)	2HZ	variante_sinónima	p.Ile207(p=)
<i>PIK3R1</i>	rs3730089	G	G/A	A	0,2175 (A)	8HZ	variante_missense	p.Met326Ile
<i>PIK3R1</i>	rs3730090	C	C/T	T	0,0695 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Phe392(p=)
<i>PIK3R1</i>	rs3729981	T	T/C	C	0,0435 (C)	1HM/1HZ	variante_sinónima	p.Leu703(p=)
<i>IL13</i>	rs55733734	C	C/T	T	0,0009 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Thr20(p=)
<i>IL13</i>	rs20541	A	G/G	G	0,2683 (A)	32HM/13HZ	variante_missense	p.Gln144Arg
<i>IL4</i>	rs35648164	C	C/T	T	0,0050 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Asp111(p=)
<i>IL4</i>	rs2243290	C	C/A	A	0,4066 (A)	15HZ	variante_intrónica	IVS3-9C>A
<i>HDAC9</i>	rs34096894	C	C/T	T	0,0408 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Leu194(p=)
<i>HDAC9</i>	rs150067220	G	G/A	A	0,0069 (A)	1HZ	variante_intrónica	IVS7+10G>A
<i>HDAC9</i>	rs35691757	C	C/T	T	0,0311 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Ser527(p=)
<i>HDAC9</i>	rs1178127	A	A/G	G	0,3301 (G)	2HM/23HZ	variante_sinónima	p.Pro624(p=)
<i>HDAC9</i>	rs17139769	A	A/C	C	0,0586 (C)	1HZ	variante_intrónica	IVS12+6A>C
<i>HDAC9</i>	rs2389998	C	C/T	T	0,2312 (C)	29HM/16HZ	variante_sinónima	p.Phe1010(p=)
<i>IL6</i>	rs2069860	A	A/T	T	0,0018 (T)	1HZ	variante_missense	p.Asp162Val
<i>IL6</i>	rs2069849	C	C/T	T	0,0559 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Phe201(p=)
<i>FAM126</i> A	rs3735231	T	T/C	C	0,3768 (C)	5HM/11HZ	variante_sinónima	p.Ser208(p=)
<i>CD72</i>	rs34791102	G	G/A	A	0,0517 (A)	3HZ	variante_missense	p.Pro234Leu
<i>CD72</i>	rs35185125	C	C/A	A	0,0124 (A)	2HZ	variante_missense	p.Val50Leu
<i>PAX5</i>	rs3780135	G	A/A	A	0,2138 (G)	39HM/5HZ	variante_sinónima	p.Tyr370(p=)
<i>PAX5</i>	rs35469494	C	C/T	T	0,0174 (T)	5HZ	variante_sinónima	p.Gly343(p=)
<i>FAM120</i> A	rs10821135	C	T/T	T	0,4144 (C)	11HM/19HZ	variante_sinónima	p.His254(p=)
<i>FAM120</i> A	rs35062269	T	T/TA	A	3,594e-05 (A)	7HZ	variante_intrónica	IVS5+2_933+3insA

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>FAM120A</i>	rs147979681	C	C/T	T	0,0713 (T)	1HM/4HZ	variante_sinónima	p.His447(p=)
<i>FAS</i>	rs5030766	A	A/G	G	0,0266 (G)	1HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-34A>G
<i>FAS</i>	rs3218619	G	G/A	A	0,0343 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ala16Thr
<i>FAS</i>	rs2229521	A	A/G	G	0,0394 (G)	3HZ	variante_sinónima	p.Thr74(p=)
<i>FAS</i>	rs2234978	T	T/C	C	0,2358 (T)	22HM/19HZ	variante_sinónima	p.Thr214(p=)
<i>BLNK</i>	rs727852	A	A/G	G	0,4876 (A)	28HM/17HZ	variante_sinónima	p.Pro57(p=)
<i>IKK</i>	rs17880383	G	G/A	A	0,0394 (A)	6HZ	variante_sinónima	p.Ser486(p=)
<i>IKK</i>	rs34458357	T	T/C	C	0,0014 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Gly447(p=)
<i>IKK</i>	rs2230804	C	T/T	T	0,4377 (C)	21HM/10HZ	variante_missense	p.Val268Ile
<i>CD20</i>	rs2070770	C	C/T	T	0,0678 (T)	1HM/4HZ	variante_sinónima	p.Ile72(p=)
<i>CLCF1</i>	rs867193	A	T/T	T	0,0852 (T)	1HM/2HZ	variante_sinónima	p.Pro36(p=)
<i>ATM</i>	rs1800054	C	C/G	G	0,0055 (G)	1HZ	variante_missense	p.Ser49Cys
<i>ATM</i>	rs2234997	T	T/A	A	0,0458 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp126Glu
<i>ATM</i>	rs3218707	G	G/C	C	0,0124 (C)	1HZ	variante_missense	p.Val182Leu
<i>ATM</i>	rs3218674	C	C/T	T	0,0069 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Val245(p=)
<i>ATM</i>	rs28904919	C	C/T	T	0,0014 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ser333Phe
<i>ATM</i>	rs138398778	C	C/T	T	0,00009 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg337Cys
<i>ATM</i>	rs4986761	T	T/C	C	0,0050 (C)	1HZ	variante_missense	p.Ser707Pro
<i>ATM</i>	rs34231402	T	T/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_missense	p.Phe763Leu
<i>ATM</i>	rs3218695	C	C/A	A	0,0092 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp814Glu
<i>ATM</i>	rs1800056	T	T/C	C	0,0069 (C)	1HZ	variante_missense	p.Phe858Leu
<i>ATM</i>	rs1800057	C	C/G	G	0,0151 (G)	4HZ	variante_missense	p.Pro1054Arg
<i>ATM</i>	rs3092856	C	C/T	T	0,0197 (T)	1HZ	variante_missense	p.His1380Tyr
<i>ATM</i>	rs1800058	C	C/T	T	0,0092 (T)	3HZ	variante_missense	p.Leu1420Phe
<i>ATM</i>	rs4988008	C	C/T	T	0,0014 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Phe1491(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>ATM</i>	rs1800889	C	C/T	T	0,0183 (T)	6HZ	variante_sinónima	p.Pro1526(p=)
<i>ATM</i>	rs3092829	T	T/C	C	0,0179 (C)	2HZ	variante_intrónica	IVS36-8T>C
<i>ATM</i>	rs1801516	G	G/A	A	0,0788 (A)	11HZ	variante_missense	p.Asp1853Asn
<i>ATM</i>	rs3092910	T	T/C	C	0,0087 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala1931(p=)
<i>ATM</i>	rs11212587	G	G/A	A	0,0014 (A)	1HZ	variante_missense	p.Gly2023Arg
<i>ATM</i>	rs1800060	G	G/A	A	0,0046 (A)	1HZ	variante_missense	p.Val2079Ile
<i>ATM</i>	rs56815840	G	G/C	C	0,0046 (C)	1HZ	variante_missense	p.Ser2146Thr
<i>ATM</i>	rs759069006	G	G/T	T	0,000008 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu2739(p=)
<i>IL10RA</i>	rs4252301	G	G/C	C	0,0027 (C)	2HZ	variante_sinónima	p.Val7(p=)
<i>IL10RA</i>	rs75968822	G	G/T	T	0,0133 (T)	1HZ	variante_intrónica	IVS1+224G>T
<i>IL10RA</i>	rs4252249	G	A/A	A	0,1145 (A)	2HM/7HZ	variante_sinónima	p.Ala60(p=)
<i>IL10RA</i>	rs4252250	C	C/G	G	0,0087 (G)	1HZ	variante_missense	p.Leu61Val
<i>IL10RA</i>	rs4252303	G	G/A	A	0,0037 (A)	3HZ	variante_missense	p.Val113Ile
<i>IL10RA</i>	rs2256111	A	G/G	G	0,4757 (A)	19HM/21HZ	variante_sinónima	p.Ala153(p=)
<i>IL10RA</i>	rs3135932	A	A/G	G	0,0824 (G)	8HZ	variante_missense	p.Ser159Gly
<i>IL10RA</i>	rs2228054	G	G/A	A	0,1218 (A)	1HM/3HZ	variante_sinónima	p.Pro175(p=)
<i>IL10RA</i>	rs2228055	A	A/G	G	0,1213 (G)	1HM/2HZ	variante_missense	p.Ile224Val
<i>IL10RA</i>	rs2229113	A	G/G	G	0,1896 (A)	31HM/11HZ	variante_missense	p.Arg351Gly
<i>IL10RA</i>	rs2229114	C	C/T	T	0,0284 (T)	8HZ	variante_missense	p.Ser420Leu
<i>AICDA</i>	rs2028373	G	G/A	A	0,4826 (G)	16HM/12HZ	variante_sinónima	p.His155(p=)
<i>AICDA</i>	rs2518144	G	G/A	A	0,4677 (G)	9HM/25HZ	variante_intrónica	IVS2+16G>A
<i>IGHM</i>	rs368913002	G	G/A	A	0,0008 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro358(p=)
<i>IGHM</i>	rs10287	A	A/G	G	0,0403 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr281(p=)
<i>IGHM</i>	rs113517608	G	G/A	A	0,0256 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ile227(p=)
<i>IGHM</i>	rs12365	C	A/A	A	0,0673 (C)	45HM/1HZ	variante_missense	p.Gly215Val

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>IGHM</i>	rs1059216	T	T/C	C	0,2198 (C)	5HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser191Gly
<i>IGHM</i>	rs1136534	G	G/A	A	0,4551 (G)	14HM/19HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala107(p=)
<i>IGHM</i>	rs113762053	G	G/C	C	0,0394 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp77Glu
<i>IGHM</i>	rs375883362	G	G/A	A	0,0004 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Tyr65(p=)
<i>IGHM</i>	rs368782551	C	C/T	T	0,0013 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp36Asn
<i>IL4R</i>	rs17548704	C	C/T	T	0,0060 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser36(p=)
<i>IL4R</i>	rs1805010	A	A/G	G	0,4512 (G)	8HM/20HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ile75Val
<i>IL4R</i>	rs145184963	C	C/T	T	0,0055 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn79(p=)
<i>IL4R</i>	rs112497527	T	T/C	C	0,0096 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asp97(p=)
<i>IL4R</i>	rs3024570	G	G/A	A	0,0394 (A)	6HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS5-4G>A
<i>IL4R</i>	rs2234895	C	C/T	T	0,0476 (T)	8HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn167(p=)
<i>IL4R</i>	rs3024638	C	C/G	G	0,0266 (G)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr256(p=)
<i>IL4R</i>	rs2234897	T	T/C	C	0,0137 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Phe313(p=)
<i>IL4R</i>	rs1805011	A	A/C	C	0,2234 (C)	1HM/10HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu400Ala
<i>IL4R</i>	rs2234898	G	G/T	T	0,2221 (T)	1HM/10HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu414(p=)
<i>IL4R</i>	rs1805012	T	T/C	C	0,1016 (C)	7HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Cys431Arg
<i>IL4R</i>	rs2234899	C	C/T	T	0,0343 (T)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Cys431(p=)
<i>IL4R</i>	rs2234900	T	T/C	C	0,2518 (C)	2HM/10HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu433(p=)
<i>IL4R</i>	rs1805013	C	C/T	T	0,0252 (T)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser436Leu
<i>IL4R</i>	rs1805015	T	T/C	C	0,2097 (C)	11HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser503Pro
<i>IL4R</i>	rs1801275	A	A/G	G	0,3452 (G)	2HM/14HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gln576Arg
<i>IL4R</i>	rs3024677	G	G/A	A	0,0293 (A)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val579Ile
<i>IL4R</i>	rs3024678	C	C/T	T	0,0069 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro675Ser
<i>IL4R</i>	rs1805016	T	T/G	G	0,1181 (G)	1HM/5HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser752Ala
<i>IL4R</i>	rs1805014	T	T/C	C	0,0087 (C)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser786Pro

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>IL4R</i>	rs2074570	T	T/C	C	0,0994 (C)	2HZ	variante_3_prima_UTR	3'UTR*6T>C
<i>CD19</i>	rs142342927	G	G/A	A	0,0032 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.Ser127(p=)
<i>CD19</i>	rs2904880	C	C/G	G	0,1827 (C)	25HM/14HZ	variante_missense	p.Leu174Val
<i>CD19</i>	rs148200569	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_missense	p.Pro176Leu
<i>CD19</i>	rs35979293	G	G/T	T	0,2624 (T)	6HM/10HZ	variante_sinónima	p.Pro235(p=)
<i>CD19</i>	rs34763945	G	G/A	A	0,0256 (A)	1HZ	variante_missense	p.Arg515His
<i>CD79B</i>	rs2070776	A	G/G	G	0,4006 (A)	22HM/19HZ	variante_sinónima	p.Cys123(p=)
<i>CD23</i>	rs142442084	A	A/G	G	0,0004 (G)	1HZ	variante_missense	p.Ser316Pro
<i>CD23</i>	rs8102872	C	C/T	T	0,0055 (T)	2HZ	variante_missense	p.Arg284Gln
<i>CD23</i>	rs2228138	G	A/A	A	0,3622 (A)	7HM/23HZ	variante_sinónima	p.His239(p=)
<i>CD23</i>	rs1042429	C	C/T	T	0,0032 (T)	3HZ	variante_sinónima	p.Gly230(p=)
<i>CD23</i>	rs4996973	A	A/G	G	0,3622 (G)	7HM/23HZ	variante_intrónica	IVS9-8T>C
<i>CD23</i>	rs28364072	A	A/G	G	0,3622 (G)	7HM/23HZ	variante_intrónica	IVS9+7T>C
<i>CD23</i>	rs72558007	C	C/T	T	0,0160 (T)	3HZ	variante_missense	p.Gly76Ser
<i>CD23</i>	rs2228137	G	G/A	A	0,1635 (A)	3HM/12HZ	variante_missense	p.Arg62Trp
<i>CD23</i>	rs138917660	C	C/T	T	0,0014 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ala32Thr
<i>CD23</i>	rs2287866	A	A/G	G	0,1575 (G)	1HM/5HZ	variante_sinónima	p.Arg20(p=)
<i>CD320</i>	rs2227289	G	G/C	C	0,1172 (C)	1HM/3HZ	variante_sinónima	p.Thr279(p=)
<i>CD320</i>	rs2336573	C	C/T	T	0,1172 (T)	1HM/3HZ	variante_missense	p.Gly220Arg
<i>CD320</i>	rs2232784	G	G/A	A	0,1168 (A)	1HM/3HZ	variante_sinónima	p.Ser161(p=)
<i>CD320</i>	rs188158114	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_missense	p.Asp160Asn
<i>CD320</i>	rs2232783	C	C/A	A	0,1172 (A)	1HM/3HZ	variante_sinónima	p.Thr149(p=)
<i>CD320</i>	rs2232776	C	C/G	G	0,1172 (G)	1HM/3HZ	variante_intrónica	IVS1+10G>C
<i>CD320</i>	rs2232775	T	T/C	C	0,1470 (C)	1HM/3HZ	variante_missense	p.Gln8Arg
<i>CD320</i>	rs2232773	C	C/T	T	0,1177 (T)	1HM/3HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-2G>A

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
CD22	rs146504496	C	C/T	T	0,0041 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Cys265(p=)
CD22	rs145621000	G	G/C	C	0,0023 (C)	5HZ	variante_sinónima	p.Leu325(p=)
CD22	rs61741013	G	G/A	A	0,0137 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ala391Thr
CD22	rs25677	C	C/T	T	0,0522 (T)	3HZ	variante_sinónima	p.Cys484(p=)
CD22	rs35715143	G	G/A	A	0,0188 (A)	1HZ	variante_missense	p.Gly551Arg
CD22	rs7259477	G	G/A	A	0,0027 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro681(p=)
CD22	rs10406069	G	G/A	A	0,1442 (A)	2HM/16HZ	variante_missense	p.Gly745Asp
CD22	rs79438722	C	C/T	T	0,0376 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Cys790(p=)
CD22	rs117891073	G	G/A	A	0,0156 (A)	1HZ	variante_intrónica	IVS13+10G>A
TGF- β	rs1800472	G	G/A	A	0,0137 (A)	7HZ	variante_missense	p.Thr263Ile
TGF- β	rs55659002	TG	TG/T	-	0,0139 (-)	4HZ	variante_intrónica	IVS4-8delC
TGF- β	rs202071274	T	T/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr137(p=)
TGF- β	rs1800471	C	C/G	G	0,0462 (G)	5HZ	variante_missense	p.Arg25Pro
TGF- β	rs1800470	G	A/A	A	0,4446 (G)	9HM/13HZ	variante_missense	p.Pro10Leu
FCGRT	rs150420714	G	G/C	C	0,0023 (C)	2HZ	variante_missense	p.Lys132Asn
FCGRT	rs200294618	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_missense	p.Arg185His
FCGRT	rs2878342	C	C/T	T	0,1268 (T)	1HM/5HZ	variante_sinónima	p.Arg194(p=)
FCGRT	rs3810194	T	T/C	C	0,1166 (C)	1HM/4HZ	variante_intrónica	IVS5+7T>C
FCGRT	rs768835093	G	G/A	A	0,00003 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ala365Thr
FCAR	rs1865096	A	A/G	G	0,2482 (A)	32HM/11HZ	variante_sinónima	p.Arg108(p=)
FCAR	rs11666735	G	G/A	A	0,0627 (A)	6HZ	variante_missense	p.Asp113Asn
FCAR	rs61735069	T	T/C	C	0,0545 (C)	4HZ	variante_sinónima	p.Leu211(p=)
FCAR	rs79401710	C	C/T	T	0,0531 (T)	4HZ	variante_sinónima	p.Pro224(p=)
FCAR	rs61735070	G	G/A	A	0,0019 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro266(p=)
FCAR	rs16986050	A	A/G	G	0,1662 (G)	3HM/11HZ	variante_missense	p.Ser269Gly

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
ADA	rs183914222	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_3_prima_UTR	3'UTR*4C>T
ADA	rs244076	T	T/C	C	0,2212 (C)	4HM/11HZ	variante_sinónima	p.Val178(p=)
ADA	rs61737144	C	C/T	T	0,0298 (T)	4HZ	variante_sinónima	p.Val130(p=)
ADA	rs11555566	T	T/C	C	0,0430 (C)	5HZ	variante_missense	p.Lys80Arg
ADA	rs73598374	C	C/T	T	0,0440 (T)	4HZ	variante_missense	p.Asp8Asn
CD40	rs1883832	T	T/C	C	0,2436 (T)	21HM/18HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-1T>C
CD40	rs11569321	C	T/T	T	0,0325 (T)	1HM	variante_missense	p.Ser124Leu
CD40	rs7273698	C	T/T	T	0,0343 (T)	1HM	variante_sinónima	p.Phe202(p=)
CD40	rs11086998	C	C/G	G	0,0211 (G)	2HZ	variante_missense	p.Pro227Ala
CHRNA4	rs2229960	A	G/G	G	0,1204 (A)	27HM	variante_sinónima	p.Cys409(p=)
CHRNA4	rs2229959	C	A/A	A	0,2321 (C)	26HM/4HZ	variante_sinónima	p.Pro403(p=)
CHRNA4	rs781131183	T	C/C	C	0,00001 C	1HM	variante_missense	p.Gln399Arg
CHRNA4	rs76270730	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Phe326(p=)
CHRNA4	rs1044394	A	G/G	G	0,1287 (A)	41HM/4HZ	variante_sinónima	p.Cys226(p=)
CHRNA4	rs1044393	A	G/G	G	0,2147 (A)	31HM/12HZ	variante_sinónima	p.Asp213(p=)
CHRNA4	rs2273506	G	G/A	A	0,0962 (A)	2HM/10HZ	variante_sinónima	p.Leu63(p=)
CHRNA4	rs79739740	C	T/T	T	0,0229 (T)	1HM/2HZ	variante_sinónima	p.Leu17(p=)
CHRNA4	rs6089898	C	C/G	G	0,0008 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala8(p=)
CHRNA4	rs6090387	G	G/C	C	0,3997 (G)	1HM/2HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-30C>G
IL10RB	rs80027572	G	G/A	A	0,0023 (A)	1HZ	variante_missense	p.Glu25Lys
IL10RB	rs2834167	A	A/G	G	0,3457 (G)	1HM/16HZ	variante_missense	p.Lys47Glu
VPREB1	rs9619852	G	G/A	A	0,0554 (A)	7HZ	variante_sinónima	p.Leu23(p=)
VPREB1	rs1320	G	G/A	A	0,0298 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp76Asn
VPREB1	rs5995719	C	T/T	T	0,1493 (T)	2HM/12HZ	variante_sinónima	p.Ser121(p=)
VPREB1	rs5995720	G	A/A	A	0,1511 (A)	2HM/11HZ	variante_missense	p.Glu132Lys

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>IGLL1</i>	rs8138122	C	C/T	T	0,0403 (T)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg189His
<i>IGLL1</i>	rs75088277	G	G/A	A	0,0343 (A)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro183(p=)
<i>IGLL1</i>	rs111903752	A	A/T	T	0,0449 (T)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Met162Lys
<i>IGLL1</i>	rs139571703	C	C/T	T	0,0353 (T)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly159Ser
<i>IGLL1</i>	rs145176864	G	G/A	A	0,0206 (A)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro155Leu
<i>IGLL1</i>	rs73157031	G	G/A	A	0,1346 (A)	9HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr148Ile
<i>IGLL1</i>	rs114285337	C	C/T	T	0,0037 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gln103(p=)
<i>IGLL1</i>	rs115303391	G	G/A	A	0,0247 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser100(p=)
<i>IGLL1</i>	rs116041505	G	G/T	T	0,0266 (T)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr95Lys
<i>IGLL1</i>	rs116275804	G	G/A	A	0,0229 (A)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn92(p=)
<i>IGLL1</i>	rs758781859	G	G/A	A	0,00004 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser45Leu
<i>MIF</i>	rs189811391	C	C/T	T	0,0064 (T)	1HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS2-9C>T
<i>MIF</i>	rs2070766	C	C/G	G	0,1900 (G)	1HM/10HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS2-6C>G
<i>CD40LG</i>	rs1126535	T	T/C	C	0,1911 (C)	4HM/2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu50(p=)

HM: homocigosis; HZ: heterocigosis; MAF: Frecuencia alélica minoritaria; ND: No disponible; prot: proteína.

Anexo 3: Polimorfismos encontrados en genes de la vía del complemento, en donantes

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>MASP2</i>	rs1782455	G	G/A	A	0,2926 (G)	20HM/8HZ	variante_sinónima	p.Ser493(p=)
<i>MASP2</i>	rs12085877	C	C/T	T	0,0247 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg439His
<i>MASP2</i>	rs2273346	A	A/G	G	0,0897 (G)	2HZ	variante_missense	p.Val377Ala
<i>MASP2</i>	rs12711521	C	C/A	A	0,3745 (C)	18HM/10HZ	variante_missense	p.Asp371Tyr
<i>MASP2</i>	rs12142107	C	C/T	T	0,1007 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala297(p=)
<i>MASP2</i>	rs61735598	C	C/T	T	0,0165 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr294(p=)
<i>MASP2</i>	rs7536030	G	G/A	A	0,0701 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Tyr243(p=)
<i>MASP2</i>	rs138386377	G	G/A	A	0,0060 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala136(p=)
<i>MASP2</i>	rs56392418	G	G/A	A	0,0321 (A)	1HZ	variante_missense	p.Pro126Leu
<i>MASP2</i>	rs72550870	T	T/C	C	0,0174 (C)	1HZ	variante_missense	p.Asp120Gly
<i>CIQA</i>	rs172378	A	A/G	G	0,4148 (A)	6HM/11HZ	variante_sinónima	p.Gly92(p=)
<i>CIQA</i>	rs180679721	A	A/C	C	0,0005 (C)	1HZ	variante_missense	p.Ile99Leu
<i>CIQA</i>	rs149050968	C	C/T	T	0,0037 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Ile175(p=)
<i>CIQC</i>	rs80083522	C	C/T	T	0,2926 (T)	9HZ	variante_sinónima	p.Pro42(p=)
<i>FCN3</i>	rs28357092	AG	AG/A	-	0,0151 (-)	1HZ	variante_frameshift	p.Leu117SerfsTer65
<i>C8A</i>	rs652785	C	C/A	A	0,3278 (A)	5HM/15HZ	variante_missense	p.Gln93Lys
<i>C8A</i>	rs139141074	C	C/T	T	ND	1HZ	variante_missense	p.Arg107Cys
<i>C8A</i>	rs150404785	G	G/A	A	0,0014 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp129Asn
<i>C8A</i>	rs386631447	GC	GC/TT	TT	ND	4HZ	variante_missense	p.Arg485Leu
<i>C8A</i>	rs1754533	T	T/C	C	0,1030 (C)	4HZ	variante_sinónima	p.Pro501(p=)
<i>C8A</i>	rs1342440	G	G/C	C	0,1035 (C)	4HZ	variante_missense	p.Glu561Gln
<i>C8A</i>	rs17300936	C	C/T	T	0,0728 (T)	1HM/5HZ	variante_missense	p.Pro575Leu
<i>C8B</i>	rs202139453	G	G/A	A	0,0009 (A)	1HZ	variante_3_prima_UTR	3'UTR*10C>A
<i>C8B</i>	rs139498867	C	C/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp382Tyr

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>C8B</i>	rs12085435	G	G/A	A	0,0421 (A)	5HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro261Leu
<i>C8B</i>	rs12067507	C	C/T	T	0,0412 (T)	5HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu108Lys
<i>CRP</i>	chr1:159.683.371	C	C/G	G	0,008302 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala207Pro
<i>CRP</i>	rs1800947	C	G/G	G	0,0412 (G)	1HZ/4HM	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu184(p=)
<i>CRP</i>	rs77832441	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr59Met
<i>CFH</i>	rs800292	G	A/A	A	0,4345 (A)	4HM/4HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val62Ile
<i>CFH</i>	rs1061147	C	C/A	A	0,2958 (A)	5HM/11HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala307(p=)
<i>CFH</i>	rs1061170	T	T/C	C	0,2784 (C)	5HM/11HZ	variante_ <i>missense</i>	p.His402Tyr
<i>CFH</i>	rs2274700	G	G/A	A	0,4368 (A)	5HM/10HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala473(p=)
<i>CFH</i>	rs143237092	G	G/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly650Val
<i>CFH</i>	rs3753396	A	A/G	G	0,2331 (G)	1HM/9HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gln672(p=)
<i>CFH</i>	rs35292876	C	C/T	T	0,0041 (T)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.His878(p=)
<i>CFH</i>	rs515299	G	G/T	T	0,0517 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser890Ile
<i>CFH</i>	rs1065489	G	G/T	T	0,2326 (T)	1HM/10HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu936Asp
<i>CFH</i>	rs534399	G	G/T	T	0,0746 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val1007Leu
<i>CFH</i>	rs513699	T	T/C	C	0,2585 (C)	3HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS19-5T>C
<i>CFH</i>	rs61822181	C	C/T	T	0,2657 (T)	7HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr1046(p=)
<i>CFHR3</i>	rs400344	C	T/T	T	0,4112 (C)	8HM/10HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser159(p=)
<i>CFHR3</i>	rs138675433	C	T/T	T	0,2230 (T)	1HM	variante_ <i>missense</i>	p.Pro241Ser
<i>CFHR3</i>	chr1:196.762.487	CAT	C/C	-	0,001246 (-)	1HM	variante_ <i>frameshift</i>	p.Ile280LysfsTer7
<i>CFHR1</i>	rs425757	C	T/T	T	0,3649 (T)	4HM/4HZ	variante_ <i>missense</i>	p.His157Tyr
<i>CFHR1</i>	rs113811987	C	G/G	G	0,3127 (G)	3HM	variante_ <i>missense</i>	p.Leu159Val
<i>CFHR1</i>	rs388862	G	C/C	C	0,3013 (C)	2HM	variante_ <i>missense</i>	p.Glu175Gln
<i>CFHR1</i>	rs3201739	A	G/G	G	0,3196 (G)	2HM	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr196(p=)
<i>CFHR1</i>	rs12406079	G	G/A	A	0,1136 (A)	3HM/5HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro223(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>CFHR1</i>	rs4230	G	G/T	T	0,4954 (T)	6HM/8HZ	variante_sinónima	p.Arg302(p=)
<i>CFHR1</i>	rs414628	A	T/T	T	0,4258 (T)	6HM/7HZ	variante_sinónima	p.Arg314(p=)
<i>CFHR4</i>	rs7417769	A	A/G	G	0,3700 (A)	10HM/14HZ	variante_missense	p.Asn209Ser
<i>CFHR4</i>	rs181498339	A	A/T	T	0,0032 (T)	1HZ	variante_missense	p.Gln388Leu
<i>CFHR4</i>	rs75774768	C	C/A	A	0,0018 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Arg411(p=)
<i>CFHR4</i>	rs371009491	G	G/A	A	0,03311 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ser506(p=)
<i>CFHR4</i>	rs150845796	A	A/T	T	0,0975 (T)	5HZ	variante_sinónima	p.Pro509(p=)
<i>CFHR4</i>	rs10494745	G	G/A	A	0,0527 (A)	4HZ	variante_missense	p.Gly552Glu
<i>CFHR2</i>	rs79351096	G	G/A	A	0,0151 (A)	1HZ	variante_missense	p.Cys72Tyr
<i>CFHR2</i>	rs4085749	C	C/T	T	0,3347 (T)	1HM/6HZ	variante_sinónima	p.Cys140(p=)
<i>CFHR2</i>	rs41310132	A	A/G	G	0,0082 (G)	2HZ	variante_missense	p.Tyr264Cys
<i>CFHR5</i>	rs12097550	C	C/T	T	0,0105 (T)	1HZ	variante_missense	p.Pro46Ser
<i>CFHR5</i>	rs140215003	T	T/C	C	0,0050 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr143(p=)
<i>CFHR5</i>	rs139017763	G	G/A	A	0,0073 (A)	1HZ	variante_missense	p.Gly278Ser
<i>CFHR5</i>	rs35662416	G	G/A	A	0,0156 (A)	3HZ	variante_missense	p.Arg356His
<i>CFHR5</i>	rs144438200	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_missense	p.Gly471Glu
<i>C4BPA</i>	rs55867570	C	C/A	A	0,0270 (A)	3HZ	variante_missense	p.Pro4Gln
<i>C4BPA</i>	rs1126618	C	C/T	T	0,1516 (T)	1HM/8HZ	variante_sinónima	p.Gly225(p=)
<i>C4BPA</i>	rs4844573	T	T/C	C	0,4679 (C)	5HM/3HZ	variante_missense	p.Ile300Thr
<i>CR2</i>	rs61759494	C	C/G	G	0,0069 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro208(p=)
<i>CR2</i>	rs200395047	G	G/A	A	0,0005 (A)	2HZ	variante_missense	p.Arg358Lys
<i>CR2</i>	rs34349246	C	C/T	T	0,0183 (T)	4HZ	variante_sinónima	p.Thr539(p=)
<i>CR2</i>	rs1048971	G	A/A	A	0,4020 (A)	3HM/12HZ	variante_sinónima	p.Leu592(p=)
<i>CR2</i>	rs17615	G	G/A	A	0,2683 (A)	2HM/8HZ	variante_missense	p.Ser639Asn
<i>CR2</i>	rs4308977	T	C/C	C	0,2972 (C)	2HM/7HZ	variante_missense	p.Ser663Pro

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
CR2	rs17616	G	G/A	A	0,2674 (A)	2HM/7HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg671His
CR2	rs61735651	T	T/C	C	0,0646 (C)	4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ile776(p=)
CR2	rs140808707	G	G/A	A	0,0008 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg885His
CR2	rs17618	A	A/G	G	0,0430 (G)	7HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ile1052Val
CR2	rs17617	A	A/C	C	0,0723 (C)	5HM/9HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala1062Glu
CR1	rs4844600	G	G/A	A	0,2024 (A)	2HM/8HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Glu60(p=)
CR1	rs199777103	C	C/T	T	0,0002 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg277Cys
CR1	rs2274567	A	A/G	G	0,2230 (G)	11HZ	variante_ <i>missense</i>	p.His1658Arg
CR1	rs3737002	C	C/T	T	0,2660 (T)	4HM/8HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr1858Met
CR1	rs12144461	C	C/T	T	0,0064 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Val1868(p=)
CR1	rs61734513	T	T/C	C	0,0032 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Cys1902(p=)
CR1	rs17259045	A	A/G	G	0,0591 (G)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asn1990Ser
CR1	chr1:207.782.930	C	C/A	A	0,04275 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ile2064(p=)
CR1	rs6691117	A	A/G	G	0,3892 (G)	1HM/13HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ile2065Val
CR1	rs3811381	C	C/G	G	0,1964 (G)	1HM/11HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro2277Arg
CR1	rs2296160	G	A/G	A	0,2115 (A)	8HM/7HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala2419Thr
CD46	rs12126088	A	A/G	G	0,0064 (G)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu139(p=)
CD46	rs35366573	C	C/T	T	0,0078 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala353Val
COLEC11	rs76490827	A	A/G	G	0,0060 (G)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser40(p=)
COLEC11	rs10170348	G	G/A	A	0,1516 (A)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Lys53(p=)
COLEC11	rs7567833	A	A/G	G	0,1919 (G)	4HZ	variante_ <i>missense</i>	p.His233Arg
COLEC11	rs140226372	C	C/T	T	0,00002 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser262Leu
MASPI	rs850312	C	C/T	T	0,2119 (T)	4HM/12HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu617(p=)
MASPI	rs72549154	C	C/A	A	0,0473 (A)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg576Met
MASPI	rs710452	G	G/A	A	0,0479 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro458(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>MASPI</i>	rs3774268	G	G/A	A	0,1518 (A)	3HZ	variante_sinónima	p.Ser445(p=)
<i>MASPI</i>	rs28945068	C	C/T	T	0,0087 (T)	1HZ	variante_missense	p.Gly426Glu
<i>MASPI</i>	rs113938200	C	C/T	T	0,0032 (T)	1HZ	variante_missense	p.Asp368Asn
<i>MASPI</i>	rs72549254	G	G/A	A	0,1644 (A)	1HM/7HZ	variante_intrónica	IVS1+4C>T
<i>CFI</i>	rs114013791	C	C/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_intrónica	IVS12+5G>T
<i>CFI</i>	rs2298749	C	C/T	T	0,3205 (T)	2HM/15HZ	variante_sinónima	p.Ser268(p=)
<i>C9</i>	rs13361416	T	T/C	C	0,0302 (C)	1HZ	variante_missense	p.Ile203Val
<i>C9</i>	rs34882957	G	G/A	A	0,0032 (A)	1HZ	variante_missense	p.Pro167Ser
<i>C9</i>	rs476569	T	T/C	C	0,4636 (C)	5HM/14HZ	variante_intrónica	IVS1-10G>A
<i>C9</i>	rs700233	G	G/A	A	0,2949 (A)	4HM/10HZ	variante_missense	p.Arg5Trp
<i>C7</i>	rs34196526	G	G/A	A	0,0073 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Gln61(p=)
<i>C7</i>	rs1450656	T	T/C	C	0,3091 (C)	5HM/15HZ	variante_intrónica	IVS8-9C>T
<i>C7</i>	rs1063499	G	G/C	C	0,4881 (G)	8HM/12HZ	variante_missense	p.Ser389Thr
<i>C7</i>	rs150696042	G	G/A	A	0,0014 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Glu447(p=)
<i>C7</i>	rs121964920	C	C/A	A	0,0014 (A)	1HZ	variante_missense	p.Arg521Ser
<i>C7</i>	rs13157656	A	A/C	C	0,1809 (C)	1HM/10HZ	variante_missense	p.Thr587Pro
<i>C7</i>	rs60714178	A	A/T	T	0,0810 (T)	1HM/8HZ	variante_missense	p.Thr598Ser
<i>C6</i>	rs200371424	T	T/C	C	0,0016 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Gln779(p=)
<i>C6</i>	rs41271067	T	T/C	C	0,0055 (C)	1HZ	variante_missense	p.Asp696Gly
<i>C6</i>	rs184169749	C	C/G	G	0,0005 (G)	1HZ	variante_missense	p.Asp667His
<i>C6</i>	rs62361567	A	A/G	G	0,0206 (G)	2HZ	variante_sinónima	p.Ser545(p=)
<i>C6</i>	chr5:41.176.606	TG	TG/T	-	0,000695 (T-)	1HZ	variante_frameshift	p.Gln380SerfsTer7
<i>C6</i>	rs61733159	T	T/G	G	0,0440 (G)	2HZ	variante_sinónima	p.Thr226(p=)
<i>C6</i>	rs1801033	T	T/G	G	0,4064 (G)	3HM/16HZ	variante_missense	p.Glu119Ala
<i>C6</i>	rs144491040	T	T/G	G	0,00002 (G)	1HZ	variante_missense	p.Asn74His

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
C6	rs200359838	T	T/G	G	0,00002 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu62Asp
C2	rs9332739	G	G/C	C	0,0302 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu318Asp
C2	rs1042663	G	G/A	A	0,0971 (A)	7HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala341(p=)
C2	rs9332730	G	G/C	C	0,0444 (C)	3HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS15+6G>C
C2	rs36221133	T	T/C	C	0,0137 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val641Ala
CFB	rs4151667	T	T/A	A	0,0298 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Leu9His
CFB	rs12614	C	C/T	T	0,1671 (T)	1HM/8HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg32Trp
CFB	rs641153	G	G/A	A	0,0983 (A)	7HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg32Gln
CFB	rs1048709	G	G/A	A	0,1735 (A)	5HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Arg150(p=)
CFB	rs4151669	G	G/A	A	0,0284 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro168(p=)
CFB	rs113197809	C	T/T	T	0,0027 (T)	1HM	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser200(p=)
CFB	rs4151651	G	G/A	A	0,0133 (A)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly252Ser
CFB	rs45600936	C	C/T	T	0,0064 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Arg379(p=)
CFB	rs2072634	C	C/T	T	0,0243 (T)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Val455(p=)
CFB	rs4151659	A	A/G	G	0,0183 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Lys565Glu
CFB	rs45484591	A	A/C	C	0,0069 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu566Ala
PLG	rs4252070	G	G/A	A	0,0046 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu57Lys
PLG	rs4757	C	C/T	T	0,2509 (T)	4HM/13HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn110(p=)
PLG	rs143034754	G	A/A	A	0,0009 (A)	1HM	variante_ <i>missense</i>	p.Arg253His
PLG	rs14224	T	T/C	C	0,4501 (C)	4HM/14HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Cys257(p=)
PLG	rs4252187	G	G/A	A	0,0018 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg261His
PLG	rs1130656	C	C/T	T	0,3709 (T)	3HM/11HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Phe314(p=)
PLG	rs13231	A	A/G	G	0,1584 (G)	3HM/12HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gln361(p=)
PLG	rs4252119	C	C/T	T	0,0092 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg408Trp
PLG	rs4252120	T	T/C	C	0,1621 (C)	3HM/10HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS10+9T>C

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
PLG	rs4252125	G	G/A	A	0,1621 (A)	3HM/12HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp472Asn
PLG	rs4252128	C	C/T	T	0,0096 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala494Val
PLG	rs4252129	C	C/T	T	0,0032 (T)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg523Trp
PLG	rs4252170	T	T/C	C	0,0824 (C)	4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala694(p=)
PLG	rs11060	G	G/T	T	0,3114 (T)	4HM/14HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gly762(p=)
CLU	rs9331939	G	G/A	A	0,0041 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asp328(p=)
CLU	rs7982	G	G/A	A	0,3489 (A)	4HM/7HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.His263(p=)
C5	rs41258306	T	T/C	C	0,0380 (C)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Lys1602(p=)
C5	rs17612	T	T/G	G	0,0293 (G)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu1437Asp
C5	rs12237774	C	C/T	T	0,1062 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala1422(p=)
C5	rs17610	C	C/T	T	0,0220 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser1310Asn
C5	rs115696235	T	T/C	C	0,0169 (C)	1HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS26+9A>G
C5	rs41311885	C	C/T	T	0,0062 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Lys1042(p=)
C5	rs41311887	G	G/T	T	0,00621 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gln1043Asn
C5	rs17611	C	C/T	T	0,4075 (T)	6HM/14HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val802Ile
C5	chr9:123.776.258	C	C/T	T	0,04121 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg717Gln
C5	rs25681	G	G/A	A	0,4084 (A)	5HM/15HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Tyr544(p=)
C5	rs2230214	G	G/A	A	0,0710 (A)	4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr487(p=)
C5	rs10985126	T	T/C	C	0,2253 (C)	6HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gly385(p=)
C5	rs17216529	C	C/T	T	0,1511 (T)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val145Ile
C5	rs140125346	T	T/G	G	ND	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro89(p=)
FCN2	rs17514136	A	A/G	G	0,1951 (G)	1HM/7HZ	variante_5_ <i>prima</i> _UTR	5'UTR-4A>G
FCN2	rs3128624	A	A/G	G	0,3608 (G)	6HM/15HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS2-9A>G
FCN2	rs4520243	T	T/C	C	0,3585 (C)	6HM/15HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Arg74(p=)
FCN2	rs17549193	C	C/T	T	0,2418 (T)	1HM/7HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr236Met

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>FCN2</i>	rs7851696	G	T/T	T	0,1493 (T)	1HM/5HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala258Ser
<i>IL2RA</i>	rs2228149	G	G/A	A	0,0641 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.His172(p=)
<i>IL2RA</i>	rs11256369	C	C/G	G	0,1928 (G)	1HM/10HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS3+7C>G
<i>IL2RA</i>	rs2228150	C	C/T	T	0,0673 (T)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro28(p=)
<i>MBL2</i>	rs930507	C	C/G	G	0,2294 (G)	7HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu126(p=)
<i>MBL2</i>	rs1800450	C	C/T	T	0,1218 (T)	9HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly54Asp
<i>MBL2</i>	rs5030737	G	G/A	A	0,0284 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg52Cys
<i>SERPING1</i>	rs11229070	C	C/T	T	0,0078 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser406(p=)
<i>SERPING1</i>	rs4926	G	G/A	A	0,1699 (A)	3HM/13HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val480Met
<i>CIS</i>	rs12146727	G	G/A	A	0,1085 (A)	4HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg119His
<i>CIS</i>	rs7965055	C	C/T	T	0,0778 (T)	5HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Cys147(p=)
<i>CIS</i>	rs1143664	A	A/G	G	0,0801 (G)	5HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro389(p=)
<i>CIS</i>	rs138087323	G	G/C	C	0,00002 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu608Asp
<i>CIR</i>	rs75380747	G	G/T	T	0,0453 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ile412(p=)
<i>CIR</i>	rs1126605	C	C/T	T	0,1749 (T)	10HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu183Lys
<i>CIR</i>	rs1801046	G	G/A	A	0,2527 (A)	2HM/9HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser151Leu
<i>A2M</i>	rs200486795	T	T/G	G	0,00002 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser1411Arg
<i>A2M</i>	rs190813517	A	A/C	C	0,0005 (C)	2HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS26-9T>G
<i>A2M</i>	chr12:9.230.415	C	C/T	T	0,008257 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg1053Gln
<i>A2M</i>	rs669	T	T/C	C	0,2656 (C)	2HM/11HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ile1000Val
<i>A2M</i>	rs11609582	A	A/T	T	0,1410 (T)	1HM/9HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS20-4T>A
<i>A2M</i>	rs55761427	G	G/A	A	0,0082 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala844Val
<i>A2M</i>	rs2228222	G	G/A	A	0,0307 (A)	6HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Tyr432(p=)
<i>CTSG</i>	rs61737118	G	G/A	A	0,0293 (A)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Phe234(p=)
<i>CTSG</i>	rs45567233	T	T/C	C	0,1003 (C)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asn125Ser

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>IGHG2</i>	rs28371022	C	C/T	T	0,4363 (T)	4HM/17HZ	variante_sinónima	p.Thr316(p=)
<i>IGHG2</i>	rs1049810	T	T/C	C	ND	2HM/4HZ	variante_sinónima	p.Thr273(p=)
<i>IGHG2</i>	rs11160859	G	G/A	A	0,4611 (A)	7HM/14HZ	variante_sinónima	p.Val187(p=)
<i>IGHG2</i>	rs8009156	C	T/T	T	0,2894 (T)	1HM/7HZ	variante_missense	p.Val161Met
<i>IGHG2</i>	rs11627594	G	G/T	T	0,2917 (T)	1HM/18HZ	variante_missense	p.Pro72Thr
<i>IGHG2</i>	rs11557955	C	C/T	T	0,4597 (T)	8HM/16HZ	variante_sinónima	p.Pro54(p=)
<i>IGHA1</i>	rs1130951	C	C/T	T	0,0481 (T)	2HZ	variante_3_prima_UTR	3'UTR*4G>A
<i>IGHA1</i>	rs17349690	A	A/G	G	0,4420 (G)	5HM/18HZ	variante_sinónima	p.Asp259(p=)
<i>IGHA1</i>	rs1130510	G	G/A	A	0,4731 (A)	5HM/11HZ	variante_sinónima	p.Arg253(p=)
<i>IGHA1</i>	rs1129455	A	A/G	G	0,0007 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr203(p=)
<i>IGHA1</i>	rs117775520	G	G/A	A	0,0147 (A)	2HZ	variante_missense	p.Pro190Ser
<i>IGHA1</i>	rs1407	C	C/G	G	0,3315 (G)	3HM/10HZ	variante_missense	p.Glu176Asp
<i>ITGAM</i>	rs1143679	G	G/A	A	0,0879 (A)	1HM/9HZ	variante_missense	p.Arg77His
<i>ITGAM</i>	rs35314490	G	G/A	A	0,1213 (A)	1HM/12HZ	variante_intrónica	IVS6-4G>A
<i>ITGAM</i>	rs200610250	A	A/G	G	0,0002 (G)	1HZ	variante_missense	p.Lys247Glu
<i>ITGAM</i>	rs11861251	T	T/C	C	0,1044 (C)	5HZ	variante_missense	p.Met441Thr
<i>ITGAM</i>	rs8056264	C	C/T	T	0,0563 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu602(p=)
<i>ITGAM</i>	rs1143682	G	G/A	A	0,3929 (A)	1HM/14HZ	variante_sinónima	p.Thr834(p=)
<i>ITGAM</i>	rs1143683	C	C/T	T	0,1209 (T)	2HM/12HZ	variante_missense	p.Ala859Val
<i>ITGAM</i>	rs61758333	G	G/T	T	0,0009 (T)	1HZ	variante_missense	p.Met952Ile
<i>ITGAM</i>	rs1143678	C	C/T	T	0,1259 (T)	2HM/11HZ	variante_missense	p.Pro1147Ser
<i>VTN</i>	rs2227728	A	G/G	G	0,1273 (G)	1HM/4HZ	variante_sinónima	p.Asn448(p=)
<i>VTN</i>	rs704	G	G/A	A	0,4231 (G)	3HM/14HZ	variante_missense	p.Thr400Met
<i>VTN</i>	rs2227725	G	G/A	A	0,0214 (A)	1HM/4HZ	variante_intrónica	IVS5-10G
<i>VTN</i>	rs112887300	T	T/A	A	0,0046 (A)	1HZ	variante_missense	p.Glu126Val

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>CFD</i>	rs1629038	G	G/C	C	0,4460 (C)	9HM/9HZ	variante_intrónica	IVS2-9G>C
<i>C3</i>	rs17030	G	G/A	A	0,4922 (A)	5HM/15HZ	variante_sinónima	p.Pro1632(p=)
<i>C3</i>	rs11569565	G	G/A	A	0,0751 (A)	1HZ	variante_intrónica	IVS38-8C>T
<i>C3</i>	rs2277984	C	C/T	T	0,4853 (T)	6HM/15HZ	variante_intrónica	IVS36-4G>A
<i>C3</i>	rs113742728	C	C/G	G	0,0014 (G)	1HZ	variante_missense	p.Asp1457His
<i>C3</i>	rs7951	G	G/A	A	0,0865 (A)	2HM/4HZ	variante_sinónima	p.Ala1437(p=)
<i>C3</i>	rs2230209	G	G/T	T	0,0124 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro1251(p=)
<i>C3</i>	rs11569510	G	A/G	G	0,1131 (G)	1HM/9HZ	variante_intrónica	IVS26-8C>T
<i>C3</i>	rs2287845	A	A/G	G	0,2729 (G)	6HM/11HZ	variante_intrónica	IVS22+7C>T
<i>C3</i>	rs423490	G	G/A	A	0,1799 (A)	1HM/10HZ	variante_sinónima	p.Ala915(p=)
<i>C3</i>	rs428453	G	G/C	C	0,2729 (C)	7HM/10HZ	variante_sinónima	p.Val807(p=)
<i>C3</i>	rs406514	A	A/G	G	0,1804 (G)	1HM/10HZ	variante_intrónica	IVS17-8C>T
<i>C3</i>	rs142455019	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Tyr730(p=)
<i>C3</i>	rs2230205	C	C/T	T	0,2097 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr612(p=)
<i>C3</i>	rs2230204	C	C/T	T	0,3938 (T)	5HM/11HZ	variante_sinónima	p.Val564(p=)
<i>C3</i>	rs2230203	G	G/T	T	0,0797 (T)	8HZ	variante_sinónima	p.Pro518(p=)
<i>C3</i>	rs1047286	G	G/A	A	0,0856 (A)	8HZ	variante_missense	p.Pro314Leu
<i>C3</i>	rs2230201	C	C/T	T	0,2221 (T)	1HM/3HZ	variante_sinónima	p.Arg304(p=)
<i>C3</i>	rs11569571	G	G/A	A	0,0087 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Asn247(p=)
<i>C3</i>	rs2230199	G	G/C	C	0,0975 (C)	6HZ	variante_missense	p.Arg102Gly
<i>CALR</i>	rs201971744	A	A/G	G	0,0009 (G)	2HZ	variante_missense	p.Glu380Gly
<i>C5AR2</i>	rs36046934	G	G/A	A	0,0169 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala199(p=)
<i>ITGB2</i>	rs5030672	G	G/A	A	0,0082 (A)	1HZ	variante_missense	p.Arg586Trp
<i>ITGB2</i>	rs145507744	C	C/T	T	0,0002 (T)	1HZ	variante_missense	p.Glu576Lys
<i>ITGB2</i>	rs235326	G	G/A	A	0,2331 (A)	2HM/14HZ	variante_sinónima	p.Val441(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>ITGB2</i>	rs2230529	G	G/T	T	0,1928 (T)	2HM/13HZ	variante_sinónima	p.Val367(p=)
<i>ITGB2</i>	rs2230528	C	C/T	T	0,1896 (T)	1HM/11HZ	variante_sinónima	p.Gly273(p=)
<i>ITGB2</i>	rs35903905	C	C/T	T	0,0169 (T)	3HZ	variante_sinónima	p.Ser39(p=)
<i>ITGB2</i>	rs5030667	G	G/A	A	0,0160 (A)	5HZ	variante_sinónima	p.Leu11(p=)
<i>ITGB2</i>	rs11088969	C	C/A	A	0,1690 (A)	2HM/5HZ	variante_sinónima	p.Leu8(p=)
<i>CFP</i>	rs1048118	G	G/A	A	0,1814 (A)	6HM/5HZ	variante_sinónima	p.Asn428(p=)
<i>VSIG4</i>	rs144052171	C	T/T	T	0,0006 (T)	1HM	variante_missense	p.Arg308Gln
<i>VSIG4</i>	rs17315645	C	T/T	T	0,0175 (T)	1HM	variante_missense	p.Gly279Glu

HM: homocigosis; HZ: heterocigosis; MAF: Frecuencia alélica minoritaria; ND: No disponible; prot: proteína.

Anexo 4: Polimorfismos encontrados en genes relacionados con las células B, en donantes

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>PIK3CD</i>	rs2230735	A	A/G	G	0,0453 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr226(p=)
<i>PIK3CD</i>	rs28730669	G	G/C	C	0,0096 (C)	2HZ	variante_intrónica	IVS7-9G>C
<i>PIK3CD</i>	rs61755420	C	C/G	G	0,0128 (G)	1HZ	variante_missense	p.Ser312Cys
<i>PIK3CD</i>	rs151235777	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Tyr621(p=)
<i>PIK3CD</i>	rs139778709	G	G/A	A	0,0002 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Lys755(p=)
<i>PIK3CD</i>	rs139848768	C	C/T	T	0,0037 (T)	5HZ	variante_sinónima	p.Ser773(p=)
<i>PIK3CD</i>	rs11121484	C	C/T	T	0,2294 (T)	5HZ	variante_sinónima	p.Tyr936(p=)
<i>VCAM1</i>	rs2392221	C	C/T	T	0,1474 (T)	9HZ	variante_intrónica	IVS3-7C>T
<i>VCAM1</i>	chr1:101.194.80 2	C	C/T	T	0,008249 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Ser356(p=)
<i>VCAM1</i>	rs3176878	C	C/T	T	0,1218 (T)	6HZ	variante_sinónima	p.Asp693(p=)
<i>VCAM1</i>	rs3176879	A	A/G	G	0,1291 (G)	3HZ	variante_sinónima	p.Lys736(p=)
<i>IL6R</i>	rs2228144	G	G/A	A	0,1190 (A)	2HM/7HZ	variante_sinónima	p.Ala37(p=)
<i>IL6R</i>	rs2229237	C	C/T	T	0,0220 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.His70(p=)
<i>IL6R</i>	rs2228145	A	A/C	C	0,3196 (C)	1HM/11HZ	variante_missense	p.Asp358Ala
<i>IL6R</i>	rs151155578	A	A/G	G	0,00002 (G)	1HZ	variante_missense	p.Lys389Arg
<i>CHRNA2</i>	rs112585933	G	G/A	A	0,0004 (A)	1HZ	variante_missense	p.Gly412Asp
<i>CHRNA2</i>	rs144813907	C	C/T	T	0,0027 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Asp495(p=)
<i>FCRL3</i>	rs2282284	T	T/C	C	0,0536 (C)	2HZ	variante_missense	p.Asn721Ser
<i>FCRL3</i>	rs139081042	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_missense	p.Gly604Glu
<i>FCRL3</i>	rs200565232	C	C/T	T	0,00005 (T)	1HZ	variante_missense	p.Val581Met
<i>FCRL3</i>	rs115903952	G	G/T	T	0,0046 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ala312Asp
<i>FCRL3</i>	rs7522061	C	C/T	T	0,4876 (T)	5HM/9HZ	variante_missense	p.Asn28Asp
<i>FCRL3</i>	rs12140725	G	G/A	A	0,1735 (A)	1HM/5HZ	variante_intrónica	IVS3-8C>T

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>FCRL3</i>	rs113752575	C	C/T	T	0,0215 (T)	1HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-7delGinsA
<i>FCERIA</i>	rs41264475	C	C/A	A	0,0096 (A)	2HZ	variante_ missense	p.Asn247Lys
<i>CD32B</i>	rs144573139	G	G/A	A	0,0055 (A)	1HZ	variante_ sinónima	p.Gly73(p=)
<i>CD32B</i>	rs6665610	G	G/A	A	0,1504 (A)	8HZ	variante_ sinónima	p.Thr112(p=)
<i>CD32B</i>	rs182968886	G	G/A	A	0,0975 (A)	1HM/5HZ	variante_ sinónima	p.Leu204(p=)
<i>FASLG</i>	rs61756244	G	G/A	A	0,0458 (A)	1HZ	variante_ sinónima	p.Pro49(p=)
<i>MSH2</i>	rs2303426	G	G/C	C	0,3846 (C)	15HM/2HZ	variante_ intrónica	IVS1+9C>G
<i>MSH2</i>	rs35898375	G	G/A	A	0,0018 (A)	1HZ	variante_ sinónima	p.Lys113(p=)
<i>MSH2</i>	rs17217772	A	A/G	G	0,0188 (G)	1HZ	variante_ missense	p.Asn127Ser
<i>MSH2</i>	rs4987188	G	G/A	A	0,0092 (A)	1HZ	variante_ missense	p.Gly322Asp
<i>MSH2</i>	rs17224360	T	T/C	C	0,0073 (C)	3HZ	variante_ intrónica	IVS6-10T>C
<i>MSH2</i>	rs12998837	A	T/T	T	0,0650 (T)	1HM/4HZ	variante_ intrónica	IVS9-9A>T
<i>MSH2</i>	rs2303428	T	T/C	C	0,1282 (C)	4HZ	variante_ intrónica	IVS12-6T>C
<i>IGKVI-5</i>	rs376385014	A	A/G	G	0,0008 (G)	2HZ	variante_ sinónima	p.Tyr116(p=)
<i>IGKVI-5</i>	rs370810449	G	G/C	C	0,0007458 (G)	2HZ	variante_ missense	p.Gln112Glu
<i>IGKVI-5</i>	rs201861379	T	T/C	C	0,0747 (C)	3HZ	variante_ sinónima	p.Leu76(p=)
<i>IGKVI-5</i>	rs386648262	AGACGCCT T	AGACGCCTT/GGAGG CATC	GGAGGC ATC	ND	2HZ	variante_ missense	p.Lys72Asp
<i>IGKVI-5</i>	rs10865492	C	C/T	T	0,1519 (T)	1HM/3HZ	variante_ sinónima	p.Ala73(p=)
<i>ITGA4</i>	rs35419274	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_ missense	p.Val359Ile
<i>ITGA4</i>	rs1143674	G	G/A	A	0,4116 (A)	5HM/11HZ	variante_ sinónima	p.Thr615(p=)
<i>ITGA4</i>	rs35322532	T	T/A	A	0,0110 (A)	1HZ	variante_ missense	p.Ser634Thr
<i>ITGA4</i>	rs55705823	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_ missense	p.Thr785Ile
<i>ITGA4</i>	rs1143675	T	T/C	C	0,0023 (C)	1HZ	variante_ missense	p.Val824Ala
<i>ITGA4</i>	rs1143676	A	A/G	G	0,2587 (G)	2HM/10HZ	variante_ missense	p.Gln878Arg

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>ITGA4</i>	rs7562325	C	C/T	T	0,4130 (T)	5HM/12HZ	variante_sinónima	p.His961(p=)
<i>ITGA4</i>	rs202038203	T	T/A	A	0,0002 (A)	1HZ	variante_missense	p.Leu967Gln
<i>ITGA4</i>	rs2124443	G	A/A	A	0,0018 (A)	2HM	variante_sinónima	p.Leu993(p=)
<i>ITGA4</i>	rs61731209	C	C/T	T	0,0027 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Asn1026(p=)
<i>CASP8</i>	rs3769823	A	A/G	G	0,3484 (A)	1HZ	variante_missense	p.Lys14Arg
<i>CASP8</i>	rs17860422	C	C/T	T	0,0023 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Ser172(p=)
<i>CASP8</i>	rs1045485	G	C/C	C	0,0678 (C)	2HM/1HZ	variante_missense	p.Asp344His
<i>CASP8</i>	rs1045487	G	A/A	A	0,1488 (A)	1HM/2HZ	variante_sinónima	p.Gln379(p=)
<i>HDAC4</i>	rs61754649	G	G/A	A	0,0142 (A)	5HZ	variante_sinónima	p.Ser874(p=)
<i>HDAC4</i>	rs1063639	G	G/A	A	0,4199 (G)	4HM/11HZ	variante_sinónima	p.Pro855(p=)
<i>HDAC4</i>	rs61752234	T	T/C	C	0,0366 (C)	4HZ	variante_sinónima	p.Thr787(p=)
<i>HDAC4</i>	rs7585225	C	C/T	T	0,1777 (T)	1HM/9HZ	variante_intrónica	IVS15+10A>G
<i>HDAC4</i>	rs138463443	C	C/A	A	0,00005 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ala615Ser
<i>HDAC4</i>	rs148813865	C	C/T	T	0,0027 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Glu598(p=)
<i>HDAC4</i>	rs79199572	C	C/T	T	0,0234 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro522(p=)
<i>HDAC4</i>	rs10207474	T	T/C	C	0,0847 (C)	1HZ	variante_intrónica	IVS11+10A>G
<i>HDAC4</i>	rs35291459	C	C/T	T	0,0788 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Pro423(p=)
<i>HDAC4</i>	rs2290087	G	G/A	A	0,1378 (A)	5HM/7HHZ	variante_intrónica	IVS7-7T>C
<i>HDAC4</i>	rs2290092	C	C/T	T	0,1021 (T)	5HZ	variante_intrónica	IVS4+8G>A
<i>CD38</i>	rs1800051	A	A/C	C	0,0888 (C)	3HZ	variante_sinónima	p.Ile168(p=)
<i>NFKB1</i>	rs1609993	C	C/T	T	0,0417 (T)	6HZ	variante_sinónima	p.Aala381(p=)
<i>NFKB1</i>	rs138657975	A	A/G	G	0,0001 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala744(p=)
<i>NFKB1</i>	rs148268461	T	T/TA	A	0,1021 (A)	4HZ	variante_intrónica	IVS23+2_2749+3ins A
<i>IL2</i>	rs2069763	C	C/A	A	0,3443 (A)	14HZ	variante_sinónima	p.Leu38(p=)
<i>IL21</i>	rs4833837	A	A/G	G	0,1992 (G)	2HM/13HZ	variante_sinónima	p.Cys78(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>IL7R</i>	rs149235072	G	G/A	A	0,0009 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ser51(p=)
<i>IL7R</i>	rs1494558	C	C/T	T	0,3869 (T)	1HM/15HZ	variante_missense	p.Thr66Ile
<i>IL7R</i>	rs1494555	A	A/G	G	0,3260 (G)	1HM/14HZ	variante_missense	p.Ile138Val
<i>IL7R</i>	rs2228141	C	C/T	T	0,1346 (T)	10HZ	variante_sinónima	p.His165(p=)
<i>IL7R</i>	rs11567764	G	G/A	A	0,0394 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Lys187(p=)
<i>IL7R</i>	rs6897932	C	C/T	T	0,1909 (T)	3HM/13HZ	variante_missense	p.Thr244Ile
<i>IL7R</i>	rs41270321	A	A/C	C	0,0078 (C)	3HZ	variante_missense	p.Asn348Thr
<i>IL7R</i>	rs3194051	A	A/G	G	0,2257 (G)	10HZ	variante_missense	p.Ile356Val
<i>PIK3R1</i>	rs706713	C	C/T	T	0,4414 (T)	6HZ	variante_sinónima	p.Tyr73(p=)
<i>PIK3R1</i>	rs61749601	T	T/C	C	0,0156 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Ile207(p=)
<i>PIK3R1</i>	rs3730089	G	G/A	A	0,2175 (A)	2HM/7HZ	variante_missense	p.Met326Ile
<i>PIK3R1</i>	rs41268435	C	C/T	T	0,0046 (T)	2HZ	variante_3_prima_UTR	3'UTR*3C>T
<i>MEF2C</i>	chr5:88.025.128	A	A/G	G	0,04574 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu291(p=)
<i>MEF2C</i>	rs563149132	G	G/A	A	0,05988 (A)	1HZ	variante_intrónica	IVS10+4C>T
<i>IL13</i>	rs20541	G	G/A	A	0,2683 (A)	7HZ	variante_missense	p.Arg144Gln
<i>IL4</i>	rs2243251	A	A/G	G	0,0527 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu15(p=)
<i>IL4</i>	rs2243290	C	C/A	A	0,4066 (A)	1HM/7HZ	variante_intrónica	IVS3-9C>A
<i>HDAC9</i>	rs34096894	C	C/T	T	0,0408 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu194(p=)
<i>HDAC9</i>	rs35614472	A	A/T	T	0,0064 (T)	3HZ	variante_sinónima	p.Pro385(p=)
<i>HDAC9</i>	rs1178127	A	A/G	G	0,3301 (G)	10HZ	variante_sinónima	p.Pro624(p=)
<i>HDAC9</i>	rs41273078	C	C/G	G	0,0073 (G)	1HZ	variante_intrónica	IVS18-6C>G
<i>HDAC9</i>	rs138163349	T	T/C	C	0,0027 (C)	1HZ	variante_missense	p.Ile1001Thr
<i>HDAC9</i>	rs2389998	T	T/C	C	0,2312 (C)	6HM/5HZ	variante_sinónima	p.Phe1010(p=)
<i>IL6</i>	rs2069860	A	A/T	T	0,0018 (T)	1HZ	variante_missense	p.Asp162Val
<i>IL6</i>	rs13306435	T	T/A	A	0,0302 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp162Glu

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>IL6</i>	rs2069849	C	C/T	T	0,0559 (T)	4HZ	variante_sinónima	p.Phe201(p=)
<i>FAM126A</i>	rs3735231	T	T/C	C	0,3768 (C)	4HM/4HZ	variante_sinónima	p.Ser208(p=)
<i>CD72</i>	rs34791102	G	G/A	A	0,0517 (A)	3HZ	variante_missense	p.Pro234Leu
<i>CD72</i>	rs373358863	G	G/A	A	0,04118 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Tyr39(p=)
<i>PAX5</i>	chr9:36.840.581	G	G/A	A	0,0001306 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala384(p=)
<i>PAX5</i>	rs3780135	A	A/G	G	0,2138 (G)	1HM/5HZ	variante_sinónima	p.Tyr370(p=)
<i>PAX5</i>	rs35469494	C	C/T	T	0,0174 (T)	4HZ	variante_sinónima	p.Gly343(p=)
<i>PAX5</i>	rs34810717	C	C/T	T	0,0032 (T)	2HZ	variante_missense	p.Ala322Thr
<i>FAM120A</i>	rs10821135	T	T/C	C	0,4144 (C)	8HM/15HZ	variante_sinónima	p.His254(p=)
<i>FAM120A</i>	rs55747985	T	TA/TA	A	ND	1HM/1HZ	variante_intrónica	IVS4+3insA
<i>FAM120A</i>	rs77023914	C	C/T	T	ND	1HZ	variante_sinónima	p.His447(p=)
<i>FAM120A</i>	rs144836182	G	G/T	T	0,00005 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro530(p=)
<i>FAS</i>	rs2229521	A	A/G	G	0,0394 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr74(p=)
<i>FAS</i>	rs28362318	G	G/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Gln123(p=)
<i>FAS</i>	rs2234978	C	C/T	T	0,2358 (T)	2HM/11HZ	variante_sinónima	p.Thr214(p=)
<i>BLNK</i>	rs143028297	C	C/T	T	0,0408 (T)	1HZ	variante_missense	p.Gly249Arg
<i>BLNK</i>	rs17111459	C	C/G	G	0,0133 (G)	1HZ	variante_intrónica	IVS6-5G>C
<i>BLNK</i>	rs148612299	C	C/A	A	0,0055 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ala158Ser
<i>BLNK</i>	rs727852	G	G/A	A	0,4876 (A)	2HM/12HZ	variante_sinónima	p.Pro57(p=)
<i>BLNK</i>	rs11540858	C	C/T	T	0,0288 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Arg16(p=)
<i>IKK</i>	rs17880383	G	A/A	A	0,0394 (A)	1HM/5HZ	variante_sinónima	p.Ser486(p=)
<i>IKK</i>	rs2230804	T	T/C	C	0,4377 (C)	5HM/10HZ	variante_missense	p.Ile268Val

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>CD20</i>	rs2070770	C	C/T	T	0,0678 (T)	6HZ	variante_sinónima	p.Ile72(p=)
<i>CLCF1</i>	rs78755659	G	G/A	A	0,0082 (A)	2HZ	variante_missense	p.Pro151Ser
<i>CLCF1</i>	rs867193	A	A/T	T	0,0852 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro36(p=)
<i>ATM</i>	rs1800054	C	C/G	G	0,0055 (G)	1HZ	variante_missense	p.Ser49Cys
<i>ATM</i>	rs148590073	A	A/G	G	0,0014 (G)	1HZ	variante_missense	p.Ile124Val
<i>ATM</i>	rs3218674	C	C/T	T	0,0069 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Val245(p=)
<i>ATM</i>	rs28904919	C	C/T	T	0,0014 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ser333Phe
<i>ATM</i>	rs2227924	C	C/G	G	0,0137 (G)	1HZ	variante_missense	p.Leu546Val
<i>ATM</i>	rs2229019	C	C/T	T	0,0137 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Tyr731(p=)
<i>ATM</i>	rs1800056	T	T/C	C	0,0069 (C)	2HZ	variante_missense	p.Phe858Leu
<i>ATM</i>	rs3218673	C	C/T	T	0,0110 (T)	1HZ	variante_missense	p.Pro872Ser
<i>ATM</i>	rs3218687	A	A/G	G	0,0110 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu895(p=)
<i>ATM</i>	rs3092857	A	A/G	G	0,0110 (G)	1HZ	variante_missense	p.Met1040Val
<i>ATM</i>	rs1800057	C	C/G	G	0,0151 (G)	4HZ	variante_missense	p.Pro1054Arg
<i>ATM</i>	rs3092856	C	C/T	T	0,0197 (T)	1HZ	variante_missense	p.His1380Tyr
<i>ATM</i>	rs1800889	C	C/T	T	0,0183 (T)	3HZ	variante_sinónima	p.Pro1526(p=)
<i>ATM</i>	rs3092829	T	T/C	C	0,0179 (C)	3HZ	variante_intrónica	IVS36-8T>C
<i>ATM</i>	rs1801516	G	G/A	A	0,0788 (A)	1HM/4HZ	variante_missense	p.Asp1853Asn
<i>ATM</i>	rs4986839	A	A/C	C	0,0188 (C)	5HZ	variante_intrónica	IVS60+8A>C
<i>IL10RA</i>	rs4252301	G	G/C	C	0,0027 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Val7(p=)
<i>IL10RA</i>	rs4252249	G	G/A	A	0,1145 (A)	1HM/4HZ	variante_sinónima	p.Ala60(p=)
<i>IL10RA</i>	rs2256111	G	G/A	A	0,4757 (A)	6HM/13HZ	variante_sinónima	p.Ala153(p=)
<i>IL10RA</i>	rs3135932	A	A/G	G	0,0824 (G)	6HZ	variante_missense	p.Ser159Gly
<i>IL10RA</i>	rs2228055	A	A/G	G	0,1213 (G)	1HZ	variante_missense	p.Ile224Val
<i>IL10RA</i>	rs41354146	G	G/A	A	0,0105 (A)	1HZ	variante_missense	p.Val233Met

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>IL10RA</i>	rs2229113	G	G/A	A	0,1896 (A)	3HM/9HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg351Gly
<i>IL10RA</i>	rs2229114	C	C/T	T	0,0284 (T)	4HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser420Leu
<i>AICDA</i>	rs2028373	A	A/G	G	0,4826 (G)	8HM/9HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.His155(p=)
<i>AICDA</i>	rs5796316	C	C/CA	A	0,3758 (A)	1HM/7HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS3-5dupT
<i>IGHM</i>	rs12365	A	A/C	C	0,0256 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val215Gly
<i>IGHM</i>	rs1059216	T	T/C	C	0,2198 (C)	1HM/6HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser191Gly
<i>IGHM</i>	rs1136534	A	A/G	G	0,4551 (G)	11HM/8HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala107(p=)
<i>IGHM</i>	rs201981439	C	C/T	T	0,0135 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr21(p=)
<i>IL4R</i>	rs17548704	C	C/T	T	0,0060 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser36(p=)
<i>IL4R</i>	rs1805010	A	A/G	G	0,4512 (G)	1HM/14HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ile75Val
<i>IL4R</i>	rs3024570	G	G/A	A	0,0394 (A)	1HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS5-4G>A
<i>IL4R</i>	rs2234895	C	C/T	T	0,0476 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn167(p=)
<i>IL4R</i>	rs2234897	T	T/C	C	0,0137 (C)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Phe313(p=)
<i>IL4R</i>	rs1805011	A	A/C	C	0,2234 (C)	1HM/6HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu400Ala
<i>IL4R</i>	rs2234898	G	G/T	T	0,2221 (T)	1HM/6HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu414(p=)
<i>IL4R</i>	rs1805012	T	T/C	C	0,1016 (C)	6HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Cys431Arg
<i>IL4R</i>	rs2234900	T	T/C	C	0,2518 (C)	1HM/6HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu433(p=)
<i>IL4R</i>	rs1805015	T	T/C	C	0,2097 (C)	6HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser503Pro
<i>IL4R</i>	rs1801275	A	A/G	G	0,3452 (G)	2HM/9HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gln576Arg
<i>IL4R</i>	rs1805016	T	T/G	G	0,1181 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser752Ala
<i>IL4R</i>	rs3024679	T	T/C	C	0,0408 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro799(p=)
<i>IL4R</i>	rs2074570	T	T/C	C	0,0994 (C)	5HZ	variante_ <i>3_prima_UTR</i>	3'UTR*6T>C
<i>CD19</i>	rs2904880	G	G/C	C	0,1827 (C)	1HM/10HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val174Leu
<i>CD19</i>	rs35979293	G	G/T	T	0,2624 (T)	4HM/16HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro235(p=)
<i>CD19</i>	rs34763945	G	G/A	A	0,0256 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg515His

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>CD79B</i>	rs2070776	G	G/A	A	0,4006 (A)	3HM/14HZ	variante_sinónima	p.Cys123(p=)
<i>FCER2</i>	rs8102872	C	C/T	T	0,0055 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg284Gln
<i>FCER2</i>	rs2228138	G	G/A	A	0,3622 (A)	9HM/10HZ	variante_sinónima	p.Cys123(p=)
<i>FCER2</i>	rs4996973	A	A/G	G	0,3622 (G)	9HM/10HZ	variante_intrónica	IVS9-8T>C
<i>FCER2</i>	rs28364072	A	A/G	G	0,3622 (G)	9HM/10HZ	variante_intrónica	IVS9+7T>C
<i>FCER2</i>	rs72558007	C	C/T	T	0,0160 (T)	3HZ	variante_missense	p.Gly76Ser
<i>FCER2</i>	rs2228137	G	G/A	A	0,1635 (A)	1HM/12HZ	variante_missense	p.Arg62Trp
<i>FCER2</i>	rs2287866	A	A/G	G	0,1575 (G)	2HZ	variante_sinónima	p.Arg20(p=)
<i>CD320</i>	rs200607555	G	G/A	A	0,0014 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu253(p=)
<i>CALR</i>	rs201971744	A	A/G	G	0,0009 (G)	1HZ	variante_missense	p.Glu380Gly
<i>CD22</i>	rs61743666	C	C/T	T	0,0050 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu413(p=)
<i>CD22</i>	rs25677	C	C/T	T	0,0522 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Cys484(p=)
<i>CD22</i>	rs35715143	G	G/A	A	0,0188 (A)	1HZ	variante_missense	p.Gly551Arg
<i>CD22</i>	rs10406069	G	G/A	A	0,1442 (A)	1HM/5HZ	variante_missense	p.Gly745Asp
<i>CD22</i>	rs34826052	C	C/A	A	0,0559 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro768(p=)
<i>CD22</i>	rs79438722	C	C/T	T	0,0174 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Cys790(p=)
<i>CD22</i>	rs117891073	G	G/A	A	0,01561 (A)	1HZ	variante_intrónica	IVS11+10G>A
<i>TGFB1</i>	rs1800472	G	G/A	A	0,0137 (A)	3HZ	variante_missense	p.Thr263Ile
<i>TGFB1</i>	rs1800471	C	C/G	G	0,0462 (G)	3HZ	variante_missense	p.Arg25Pro
<i>TGFB1</i>	rs1800470	A	A/G	G	0,4446 (G)	7HM/9HZ	variante_missense	p.Leu10Pro
<i>FCGRT</i>	rs2878342	C	C/T	T	0,1268 (T)	4HZ	variante_sinónima	p.Arg194(p=)
<i>FCGRT</i>	rs3810194	T	T/C	C	0,1166 (C)	2HZ	variante_intrónica	IVS5+7T>C
<i>FCGRT</i>	rs201395293	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ala363Val
<i>FCAR</i>	rs1865096	G	G/A	A	0,2482 (A)	3HM/12HZ	variante_sinónima	p.Arg108(p=)
<i>FCAR</i>	rs11666735	G	G/A	A	0,0627 (A)	2HZ	variante_missense	p.Asp113Asn

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>FCAR</i>	rs61735069	T	T/C	C	0,0545 (C)	2HZ	variante_sinónima	p.Leu211(p=)
<i>FCAR</i>	rs79401710	C	C/T	T	0,0531 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Pro224(p=)
<i>FCAR</i>	rs16986050	A	A/G	G	0,1662 (G)	7HZ	variante_missense	p.Ser269Gly
<i>ADA</i>	rs244076	T	T/C	C	0,2212 (C)	1HM/5HZ	variante_sinónima	p.Val178(p=)
<i>ADA</i>	rs61737144	C	C/T	T	0,0298 (T)	1HM/1HZ	variante_sinónima	p.Val130(p=)
<i>ADA</i>	rs11555566	T	T/C	C	0,0430 (C)	3HZ	variante_missense	p.Lys80Arg
<i>ADA</i>	rs73598374	C	C/T	T	0,0440 (T)	3HZ	variante_missense	p.Asp8Asn
<i>CD40</i>	rs1883832	C	C/T	T	0,2436 (T)	3HM/9HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-1T>C
<i>CHRNA4</i>	rs1044397	C	T/T	T	0,3956 (T)	1HM	variante_sinónima	p.Ala553(p=)
<i>CHRNA4</i>	rs200605749	C	C/T	T	0,00002 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg354His
<i>CHRNA4</i>	rs1044393	G	G/A	A	0,2147 (A)	9HZ	variante_sinónima	p.Asp213(p=)
<i>CHRNA4</i>	rs2273506	G	G/A	A	0,0962 (A)	10HZ	variante_sinónima	p.Leu63(p=)
<i>CHRNA4</i>	rs79739740	C	C/T	T	0,0229 (T)	3HZ	variante_sinónima	p.Leu17(p=)
<i>IL10RB</i>	rs2834167	A	A/G	G	0,3457 (G)	3HM/5HZ	variante_missense	p.Lys47Glu
<i>VPREB1</i>	rs11089978	T	T/C	C	0,1030 (C)	1HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-10T>C
<i>VPREB1</i>	rs9619852	G	G/A	A	0,0554 (A)	3HZ	variante_sinónima	p.Leu23(p=)
<i>VPREB1</i>	rs1320	G	G/A	A	0,0298 (A)	2HZ	variante_missense	p.Asp76Asn
<i>VPREB1</i>	rs5995719	C	C/T	T	0,1493 (T)	10HZ	variante_sinónima	p.Ser121(p=)
<i>VPREB1</i>	rs5995720	G	G/A	A	0,1511 (A)	9HZ	variante_missense	p.Glu132Lys
<i>IGLL1</i>	rs75088277	G	G/A	A	0,0343 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro183(p=)
<i>IGLL1</i>	rs111903752	A	A/T	T	0,0449 (T)	1HZ	variante_missense	p.Met162Lys
<i>IGLL1</i>	rs73157031	G	G/A	A	0,1346 (A)	5HZ	variante_missense	p.Thr148Ile
<i>IGLL1</i>	rs116041505	G	G/T	T	0,0266 (T)	2HZ	variante_missense	p.Thr95Lys
<i>IGLL1</i>	rs116275804	G	G/A	A	0,0229 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.Asn92(p=)
<i>MIF</i>	rs201099096	G	G/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Glu86(P=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>MIF</i>	rs2070766	C	C/G	G	0,1900 (G)	6HZ	variante_intrónica	IVS2-6C>G
<i>CD40LG</i>	rs1126535	T	C/C	C	0,1911 (C)	3HM/2HZ	variante_sinónima	p.Leu50(p=)
<i>CD40LG</i>	rs148594123	G	A/A	A	0,0084 (A)	1HM	variante_missense	p.Gly219Arg

HM: homocigosis; HZ: heterocigosis; MAF: Frecuencia alélica minoritaria; ND: No disponible; prot: proteína.

Anexo 5: Polimorfismos encontrados en genes de la vía del complemento y las células B, en las parejas donante-receptor con TC

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>PIK3CD</i>	rs150205370	G	G/A	A	0,000008 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val98Ile
<i>PIK3CD</i>	rs2230735	A	A/G	G	0,0453 (G)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr226(p=)
<i>PIK3CD</i>	rs28730668	G	G/A	A	0,0220 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val296Ile
<i>PIK3CD</i>	rs28730669	G	G/C	C	0,0096 (C)	5HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS7-9G>C
<i>PIK3CD</i>	rs61755420	C	C/G	G	0,0128 (G)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser312Cys
<i>PIK3CD</i>	rs151235777	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Tyr621(p=)
<i>PIK3CD</i>	rs139778709	G	G/A	A	0,0002 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Lys755(p=)
<i>PIK3CD</i>	rs139848768	C	C/T	T	0,0037 (T)	7HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser773(p=)
<i>PIK3CD</i>	rs11121484	C	T/T	T	0,2294 (T)	2HM/8HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Tyr936(p=)
<i>MASP2</i>	rs1782455	G	A/A	A	0,2926 (G)	40HM/13HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser493(p=)
<i>MASP2</i>	rs12085877	C	C/T	T	0,0247 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg439His
<i>MASP2</i>	rs2273346	A	G/G	G	0,0897 (G)	1HM/2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val377Ala
<i>MASP2</i>	rs12711521	C	A/A	A	0,3745 (C)	37HM/14HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp371Tyr
<i>MASP2</i>	rs12142107	C	T/T	T	0,1007 (T)	1HM/2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala297(p=)
<i>MASP2</i>	rs61735598	C	C/T	T	0,0165 (T)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr294(p=)
<i>MASP2</i>	rs139962539	G	G/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr294Met
<i>MASP2</i>	rs7536030	G	G/A	A	0,0701 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Tyr243(p=)
<i>MASP2</i>	rs72550853	C	C/T	T	0,0105 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro204(p=)
<i>MASP2</i>	rs144247267	T	T/C	C	0,0055 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.His157Arg
<i>MASP2</i>	rs138386377	G	G/A	A	0,0060 (A)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala136(p=)
<i>MASP2</i>	rs56392418	G	G/A	A	0,0321 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro126Leu
<i>MASP2</i>	rs72550870	T	T/C	C	0,0174 (C)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp120Gly
<i>CIQA</i>	rs172378	A	G/G	G	0,4148 (A)	11HM/26HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gly92(p=)
<i>CIQA</i>	rs180679721	A	A/C	C	0,0005 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ile99Leu

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>C1QA</i>	rs149050968	C	C/T	T	0,0037 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Ile175(p=)
<i>C1QC</i>	rs80083522	C	C/T	T	0,2926 (T)	3HM/13HZ	variante_sinónima	p.Pro42(p=)
<i>C1QB</i>	rs35477594	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_missense	p.Gly75Arg
<i>FCN3</i>	rs28357092	AG	AG/A	-	0,0151 (-)	5HZ	variante_frameshift	p.Leu117SerfsTer65
<i>C8A</i>	rs116201358	C	C/A	A	0,0050 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ala36Glu
<i>C8A</i>	rs34047108	A	A/G	G	0,0096 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala36(p=)
<i>C8A</i>	rs652785	C	C/A	A	0,3278 (A)	9HM/35HZ	variante_missense	p.Gln93Lys
<i>C8A</i>	rs139141074	C	C/T	T	0,0003 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg107Cys
<i>C8A</i>	rs150404785	G	G/A	A	0,0014 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp129Asn
<i>C8A</i>	rs116129675	C	C/G	G	0,0050 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu197(p=)
<i>C8A</i>	rs17114555	G	G/A	A	0,0234 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp458Asn
<i>C8A</i>	rs386631447	GC	GC/TT	TT	ND	9HZ	variante_missense	p.Arg485Leu
<i>C8A</i>	rs1754533	T	T/C	C	0,1030 (C)	9HZ	variante_sinónima	p.Pro501(p=)
<i>C8A</i>	rs1342440	G	G/C	C	0,1035 (C)	8HZ	variante_missense	p.Glu561Gln
<i>C8A</i>	rs41285938	C	C/T	T	0,0050 (T)	1HZ	variante_missense	p.Pro575Ser
<i>C8A</i>	rs17300936	C	T/T	T	0,0728 (T)	2HM/6HZ	variante_missense	p.Pro575Leu
<i>C8B</i>	rs202139453	G	G/A	A	0,0009 (A)	1HZ	variante_3_prima_UTR	3'UTR*10C>A
<i>C8B</i>	rs139498867	C	C/A	A	0,0037 (A)	4HZ	variante_missense	p.Asp382Tyr
<i>C8B</i>	rs12085435	G	G/A	A	0,0421 (A)	11HZ	variante_missense	p.Pro261Leu
<i>C8B</i>	rs1013579	C	T/T	T	0,0192 (C)	50HM/6HZ	variante_missense	p.Gly117Arg
<i>C8B</i>	rs12067507	C	C/T	T	0,0412 (T)	11HZ	variante_missense	p.Glu108Lys
<i>C8B</i>	rs72670382	A	A/G	G	0,0156 (G)	3HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-8T>C
<i>VCAMI</i>	rs2392221	C	C/T	T	0,1474 (T)	1HM/13HZ	variante_intrónica	IVS3-7C>T
<i>VCAMI</i>	chr1:101.194.802	C	C/T	T	0,008249 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Ser356(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>VCAM1</i>	rs3783613	G	G/C	C	0,0348 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly413Ala
<i>VCAM1</i>	rs3176878	C	C/T	T	0,1218 (T)	1HM/12HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asp693(p=)
<i>VCAM1</i>	rs3176879	A	A/G	G	0,1291 (G)	2HM/4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Lys736(p=)
<i>IL6R</i>	rs2228144	G	G/A	A	0,1190 (A)	2HM/16HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala37(p=)
<i>IL6R</i>	rs2229237	C	C/T	T	0,0220 (T)	6HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.His70(p=)
<i>IL6R</i>	rs2228145	A	C/C	C	0,3196 (C)	5HM/19HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp358Ala
<i>IL6R</i>	rs2228146	G	G/A	A	0,0531 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val385Ile
<i>IL6R</i>	rs151155578	A	A/G	G	0,00002 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Lys389Arg
<i>CHRNA2</i>	rs3926124	A	A/G	G	0,0957 (G)	2HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS2+9A>G
<i>CHRNA2</i>	rs55857552	G	G/A	A	0,0013 (A)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala411(p=)
<i>CHRNA2</i>	rs112585933	G	G/A	A	0,0004 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly412Asp
<i>CHRNA2</i>	rs144813907	C	C/T	T	0,0027 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asp495(p=)
<i>FCRL3</i>	rs2282284	T	T/C	C	0,0536 (C)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asn721Ser
<i>FCRL3</i>	rs944627	G	G/A	A	0,0339 (A)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro660Leu
<i>FCRL3</i>	rs4319323	T	T/C	C	0,0325 (C)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro643(p=)
<i>FCRL3</i>	rs139081042	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly604Glu
<i>FCRL3</i>	rs200565232	C	C/T	T	0,00005 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val581Met
<i>FCRL3</i>	rs115903952	G	G/T	T	0,0046 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala312Asp
<i>FCRL3</i>	rs71630672	G	G/A	A	0,0009 (A)	1HZ	<i>stop_gained</i>	p.Gln121Ter
<i>FCRL3</i>	rs7522061	T	C/C	C	0,4876 (T)	13HM/17HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asn28Asp
<i>FCRL3</i>	rs12140725	G	A/A	A	0,1735 (A)	2HM/7HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS3-8C>T
<i>FCRL3</i>	rs113752575	C	C/T	T	0,0215 (T)	3HZ	variante_ <i>5_prima_UTR</i>	5'UTR-7delGinsA
<i>FCERIA</i>	rs41264475	C	C/A	A	0,0096 (A)	4HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asn247Lys
<i>CRP</i>	chr1:159.683.371	C	C/G	G	0,008302 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala207Pro
<i>CRP</i>	rs1800947	C	C/G	G	0,0412 (G)	1HM/6HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu184(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>CRP</i>	rs77832441	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr59Met
<i>CD32B</i>	rs5017568	G	G/A	A	ND	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gln63(p=)
<i>CD32B</i>	rs144573139	G	G/A	A	0,0055 (A)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gly73(p=)
<i>CD32B</i>	rs6665610	G	G/A	A	0,1504 (A)	15HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr112(p=)
<i>CD32B</i>	rs182968886	G	A/A	A	0,0975 (A)	2HM/10HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu204(p=)
<i>CD32B</i>	rs145835719	C	C/A	A	0,0705 (A)	1HM	variante_ <i>intrónica</i>	IVS4+6C>A
<i>FASLG</i>	rs61756244	G	G/A	A	0,0458 (A)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro49(p=)
<i>CFH</i>	rs141336681	T	T/G	G	0,0005 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser58Ala
<i>CFH</i>	rs800292	G	G/A	A	0,4345 (A)	6HM/15HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val62Ile
<i>CFH</i>	rs35814900	G	G/A	A	0,0105 (A)	2HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS2-7G>A
<i>CFH</i>	rs1061147	C	C/A	A	0,2958 (A)	15HM/19HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala307(p=)
<i>CFH</i>	rs1061170	T	T/C	C	0,2784 (C)	15HM/19HZ	variante_ <i>missense</i>	p.His402Tyr
<i>CFH</i>	rs2274700	G	G/A	A	0,4368 (A)	8HM/22HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala473(p=)
<i>CFH</i>	rs143237092	G	G/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly650Val
<i>CFH</i>	rs3753396	A	A/G	G	0,2331 (G)	1HM/17HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gln672(p=)
<i>CFH</i>	rs35292876	C	C/T	T	0,0041 (T)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.His878(p=)
<i>CFH</i>	rs515299	G	G/T	T	0,0517 (T)	1HM/3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser890Ile
<i>CFH</i>	rs1065489	G	G/T	T	0,2326 (T)	1HM/15HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu936Asp
<i>CFH</i>	rs534399	G	G/T	T	0,0746 (T)	1HM/3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val1007Leu
<i>CFH</i>	rs34362004	C	C/T	T	0,0041 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr1017Ile
<i>CFH</i>	rs513699	T	T/C	C	0,2585 (C)	7HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS19-5T>C
<i>CFH</i>	rs61822181	C	C/T	T	0,2657 (T)	12HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr1046(p=)
<i>CFH</i>	rs35274867	A	A/T	T	0,0128 (T)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asn1050Tyr
<i>CFH</i>	rs113347629	T	T/C	C	ND	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn1050(p=)
<i>CFHR3</i>	rs400344	C	T/T	T	0,4112 (C)	16HM/20HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser159(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
CFHR3	rs138675433	C	T/T	T	0,2230 (T)	1HM	variante_ <i>missense</i>	p.Pro241Ser
CFHR3	chr1:196.762.487	CAT	C/C	-	0,001246 (-)	1HM	variante_ <i>frameshift</i>	p.Ile280LysfsTer7
CFHR1	rs111236855	T	C/C	C	0,0247 (C)	1HM	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn149(p=)
CFHR1	rs425757	C	T/T	T	0,3649 (T)	7HM/2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.His157Tyr
CFHR1	rs113811987	C	G/G	G	0,3127 (G)	4HM/2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Leu159Val
CFHR1	rs388862	G	C/C	C	0,3013 (C)	3HM/2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu175Gln
CFHR1	rs3201739	A	G/G	G	0,3196 (G)	6HM	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr196(p=)
CFHR1	rs12406079	G	A/A	A	0,1136 (A)	6HM/7HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro223(p=)
CFHR1	rs4230	G	G/T	T	0,4954 (T)	15HM/16HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Arg302(p=)
CFHR1	rs414628	A	A/T	T	0,4258 (T)	12HM/14HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Arg314(p=)
CFHR4	rs145744152	T	T/C	C	0,0060 (C)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asp75(p=)
CFHR4	rs7417769	G	G/A	A	0,3700 (A)	8HM/24HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asn209Ser
CFHR4	rs181498339	A	A/T	T	0,0032 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gln388Leu
CFHR4	rs75774768	C	C/A	A	0,0018 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Arg411(p=)
CFHR4	rs371009491	G	G/A	A	0,03311 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser506(p=)
CFHR4	rs150845796	A	A/T	T	0,0975 (T)	8HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro509(p=)
CFHR4	rs10494745	G	G/A	A	0,0527 (A)	1HM/11HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly552Glu
CFHR2	rs61746417	G	G/A	A	0,0238 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr71(p=)
CFHR2	rs4085749	C	C/T	T	0,3347 (T)	1HM/16HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Cys140(p=)
CFHR2	rs41310132	A	A/G	G	0,0082 (G)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Tyr264Cys
CFHR5	rs12097550	C	C/T	T	0,0105 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro46Ser
CFHR5	rs147791058	G	G/T	T	0,0055 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser128(p=)
CFHR5	rs140215003	T	T/C	C	0,0050 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr143(p=)
CFHR5	rs57960694	G	G/A	A	0,0353 (A)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly145Glu
CFHR5	rs139017763	G	G/A	A	0,0073 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly278Ser

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
CFHR5	rs35662416	G	G/A	A	0,0156 (A)	3HZ	variante_missense	p.Arg356His
CFHR5	rs144438200	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_missense	p.Gly471Glu
CFHR5	rs16840956	T	T/G	G	0,0027 (G)	1HZ	variante_missense	p.Leu529Arg
CFHR5	rs143140599	T	T/A	A	0,0060 (A)	2HZ	stop_gained	p.Cys568Ter
IL10	rs200783164	G	G/T	T	0,0009 (T)	1HZ	variante_missense	p.Leu71Met
C4BPA	rs12072216	C	C/G	G	0,0147 (G)	1HZ	variante_missense	p.Pro4Ala
C4BPA	rs55867570	C	C/A	A	0,0270 (A)	4HZ	variante_missense	p.Pro4Gln
C4BPA	rs1126618	C	C/T	T	0,1516 (T)	1HM/15HZ	variante_sinónima	p.Gly225(p=)
C4BPA	rs4844573	T	T/C	C	0,4679 (C)	11HM/6HZ	variante_missense	p.Ile300Thr
C4BPA	rs116700161	G	G/A	A	0,0014 (A)	1HZ	variante_missense	p.Gly423Glu
C4BPA	rs150551566	G	G/C	C	0,0018 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Val535(p=)
CD55	rs28371628	G	G/A	A	0,0151 (A)	1HZ	variante_intrónica	IVS8+8G>A
CR2	rs61759494	C	C/G	G	0,0069 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro208(p=)
CR2	rs200395047	G	G/A	A	0,0005 (A)	2HZ	variante_missense	p.Arg358Lys
CR2	rs772909129	G	G/A	A	ND	1HZ	variante_missense	p.Arg520His
CR2	rs34349246	C	C/T	T	0,0183 (T)	4HZ	variante_sinónima	p.Thr539(p=)
CR2	rs1048971	G	G/A	A	0,4020 (A)	11HM/27HZ	variante_sinónima	p.Leu592(p=)
CR2	rs17615	G	G/A	A	0,2683 (A)	7HM/26HZ	variante_missense	p.Ser639Asn
CR2	rs4308977	T	T/C	C	0,2972 (C)	7HM/23HZ	variante_missense	p.Ser663Pro
CR2	rs17616	G	G/A	A	0,2674 (A)	7HM/25HZ	variante_missense	p.Arg671His
CR2	rs61735651	T	T/C	C	0,0646 (C)	11HZ	variante_sinónima	p.Ile776(p=)
CR2	rs140808707	G	G/A	A	0,0008 (A)	1HZ	variante_missense	p.Arg885His
CR2	rs138062179	C	C/T	T	0,0014 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ser1016Leu
CR2	rs17618	A	A/G	G	0,0430 (G)	8HZ	variante_missense	p.Ile1052Val
CR2	rs17617	A	A/C	A	0,0723 (C)	5HM/15HZ	variante_missense	p.Ala1062Glu

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
CRI	rs4844600	G	G/A	G	0,2024 (A)	3HM/14HZ	variante sinónima	p.Glu60(p=)
CRI	rs536471861	C	C/T	T	0,03313 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg74Cys
CRI	rs11587944	C	C/T	T	0,0064 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg105Cys
CRI	rs199777103	C	C/T	T	0,0002 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg277Cys
CRI	rs56170518	C	T/T	T	0,00008 (T)	1HZ	variante sinónima	p.Pro1218(p=)
CRI	rs114610598	T	T/G	G	0,0165 (G)	1HZ	variante intrónica	IVS28-7T>G
CRI	rs2274567	A	A/G	G	0,2230 (G)	1HM/17HZ	variante missense	p.His1658Arg
CRI	rs3737002	C	C/T	T	0,2660 (T)	5HM/17HZ	variante missense	p.Thr1858Met
CRI	rs12144461	C	C/T	T	0,0064 (T)	1HZ	variante sinónima	p.Val1868(p=)
CRI	rs61734513	T	T/C	C	0,0032 (C)	2HZ	variante sinónima	p.Cys1902(p=)
CRI	rs17259045	A	A/G	G	0,0591 (G)	4HZ	variante_missense	p.Asn1990Ser
CRI	rs41274768	G	G/A	A	0,0165 (A)	2HZ	variante_missense	p.Val2011Met
CRI	rs17047660	A	A/G	G	0,0572 (G)	1HZ	variante_missense	p.Lys2040Glu
CRI	rs17047661	A	A/G	G	0,1525 (G)	1HM/4HZ	variante missense	p.Arg2051Gly
CRI	rs4844609	T	T/A	A	0,0078 (A)	2HZ	variante_missense	p.Thr2060Ser
CRI	chr1:207.782 .930	C	C/A	A	0,04275 (A)	1HZ	variante sinónima	p.Ile2064(p=)
CRI	rs6691117	A	A/G	G	0,3892 (G)	4HM/23HZ	variante missense	p.Ile2065Val
CRI	rs113247278	G	G/A	A	0,0018 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp2254Asn
CRI	rs3811381	C	C/G	G	0,1964 (G)	2HM/17HZ	variante missense	p.Pro2277Arg
CRI	rs2296160	G	G/A	A	0,2115 (A)	7HM/12HZ	variante missense	p.Thr2419Ala
CRI	rs115510609	G	G/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_missense	p.Arg2476Gln
CD46	rs12126088	A	A/G	G	0,0064 (G)	1HZ	variante sinónima	p.Leu139(p=)
CD46	rs35366573	C	C/T	T	0,0078 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ala353Val
COLEC11	rs76490827	A	A/G	G	0,0060 (G)	1HZ	variante sinónima	p.Ser40(p=)
COLEC11	rs10170348	G	G/A	A	0,1516 (A)	2HZ	variante sinónima	p.Lys53(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
COLEC11	rs34347618	T	T/C	C	0,0339 (C)	5HZ	variante sinónima	p.Arg95(p=)
COLEC11	rs7567833	A	G/G	G	0,1919 (G)	6HZ	variante missense	p.His233Arg
COLEC11	rs140226372	C	C/T	T	0,00002 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ser262Leu
MSH2	rs2303426	G	G/C	C	0,3846 (C)	9HM/12HZ	variante intrónica	IVS1+9C>G
MSH2	rs35898375	G	G/A	A	0,0018 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.Lys113(p=)
MSH2	rs17217772	A	A/G	G	0,0188 (G)	2HZ	variante_missense	p.Asn127Ser
MSH2	rs4987188	G	G/A	A	0,0092 (A)	3HZ	variante_missense	p.Gly322Asp
MSH2	rs17224360	T	T/C	C	0,0073 (C)	4HZ	variante_intrónica	IVS6-10T>C
MSH2	rs12998837	A	A/T	T	0,0650 (T)	1HM/8HZ	variante intrónica	IVS9-9A>T
MSH2	rs61756466	T	T/C	C	0,0032 (C)	2HZ	variante_sinónima	p.Leu556(p=)
MSH2	rs2303428	T	T/C	C	0,1282 (C)	9HZ	variante intrónica	IVS12-6T>C
IGKV1-5	rs376385014	A	A/G	G	0,0007751 (G)	2HZ	variante_sinónima	p.Tyr116(p=)
IGKV1-5	rs370810449	G	G/C	C	0,0007458 (C)	2HZ	variante_missense	p.Gln112Glu
IGKV1-5	rs201861379	T	T/C	C	0,0747 (C)	7HZ	variante sinónima	p.Leu76(p=)
IGKV1-5	rs386648262	AGACGC CTT	AGACGCCTT/ GGAGGCATC	GGAGGCA TC	ND	5HZ	variante missense	p.Lys72Asp
IGKV1-5	rs10865492	C	C/T	T	0,1519 (T)	1HM/13HZ	variante sinónima	p.Ala73(p=)
IGKV1-5	rs201626492	A	A/G	G	0,0014 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu55(p=)
ITGA4	rs35419274	G	G/A	A	0,0005 (A)	4HZ	variante_missense	p.Val359Ile
ITGA4	rs1143674	G	G/A	A	0,4116 (A)	9HM/24HZ	variante sinónima	p.Thr615(p=)
ITGA4	rs35322532	T	T/A	A	0,0110 (A)	2HZ	variante_missense	p.Ser634Thr
ITGA4	rs55705823	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_missense	p.Thr785Ile
ITGA4	rs1143675	T	T/C	C	0,0023 (C)	1HZ	variante_missense	p.Val824Ala
ITGA4	rs1143676	A	G/A	G	0,2587 (G)	4HM/21HZ	variante missense	p.Gln878Arg
ITGA4	rs7562325	T	T/C	C	0,4130 (T)	9HM/24HZ	variante sinónima	p.His961(p=)
ITGA4	rs202038203	T	T/A	A	0,0002 (A)	1HZ	variante_missense	p.Leu967Gln

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>ITGA4</i>	rs2124443	G	A/A	A	0,0018 (A)	2HM	variante_sinónima	p.Leu993(p=)
<i>ITGA4</i>	rs61731209	C	C/T	T	0,0027 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Asn1026(p=)
<i>CASP8</i>	rs3769824	T	T/C	C	0,0298 (C)	2HZ	variante_iniciadora_codon	p.Met1Thr
<i>CASP8</i>	rs3769823	G	G/A	A	0,3484 (A)	8HM/25HZ	variante_missense	p.Lys14Arg
<i>CASP8</i>	rs534884641	CG	CG/C	-	0,0002 (T)	1HZ	variante_frameshift	p.Asp129IlefsTer4
<i>CASP8</i>	rs17860422	C	C/T	T	0,0023 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Ser172(p=)
<i>CASP8</i>	rs1045485	G	G/C	C	0,0678 (C)	3HM/5HZ	variante_missense	p.Asp344His
<i>CASP8</i>	rs779189628	A	A/G	G	0,000008 (G)	1HZ	variante_missense	p.Gln350Arg
<i>CASP8</i>	rs1045487	G	G/A	A	0,1488 (A)	1HM/5HZ	variante_sinónima	p.Gln379(p=)
<i>HDAC4</i>	rs61754649	G	G/A	A	0,0142 (A)	7HZ	variante_sinónima	p.Ser874(p=)
<i>HDAC4</i>	rs1063639	A	A/G	G	0,4199 (G)	14HM/24HZ	variante_sinónima	p.Pro855(p=)
<i>HDAC4</i>	rs61752234	T	T/C	C	0,0366 (C)	5HZ	variante_sinónima	p.Thr787(p=)
<i>HDAC4</i>	rs7585225	C	C/T	T	0,1777 (T)	1HM/16HZ	variante_intrónica	IVS15+10A>G
<i>HDAC4</i>	rs138463443	C	C/A	A	0,00005 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ala615Ser
<i>HDAC4</i>	rs148813865	C	C/T	T	0,0027 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Glu598(p=)
<i>HDAC4</i>	rs79199572	C	C/T	T	0,0234 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Pro522(p=)
<i>HDAC4</i>	rs10207474	T	T/C	C	0,0847 (C)	2HZ	variante_intrónica	IVS11+10A>G
<i>HDAC4</i>	rs35291459	C	C/T	T	0,0788 (T)	4HZ	variante_sinónima	p.Pro423(p=)
<i>HDAC4</i>	rs2290087	G	G/A	A	0,1378 (A)	5HM/14HZ	variante_intrónica	IVS7-7T>C
<i>HDAC4</i>	rs148880349	G	G/A	A	0,0006 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.His227(p=)
<i>HDAC4</i>	rs2290092	C	C/T	T	0,1021 (T)	12HZ	variante_intrónica	IVS4+8G>A
<i>MASPI</i>	rs850312	C	C/T	T	0,2119 (T)	5HM/18HZ	variante_sinónima	p.Leu617(p=)
<i>MASPI</i>	rs72549154	C	C/A	A	0,0473 (A)	6HZ	variante_missense	p.Arg576Met
<i>MASPI</i>	rs710452	G	G/A	A	0,0479 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro458(p=)
<i>MASPI</i>	rs3774268	G	G/A	A	0,1518 (A)	3HM/13HZ	variante_sinónima	p.Ser445(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>MASPI</i>	rs28945068	C	C/T	T	0,0087 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly426Glu
<i>MASPI</i>	rs113938200	C	C/T	T	0,0032 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp368Asn
<i>MASPI</i>	rs16861801	G	G/C	C	0,0009 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser167(p=)
<i>MASPI</i>	rs72549252	A	A/G	G	0,0018 (G)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asp139(p=)
<i>MASPI</i>	rs72549254	G	G/A	A	0,1644 (A)	1HM/15HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS1+4C>T
<i>CD38</i>	rs1800561	C	C/T	T	0,0018 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg140Trp
<i>CD38</i>	rs1800051	A	A/C	C	0,0888 (C)	4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ile168(p=)
<i>CD38</i>	rs950566	A	A/G	G	0,0110 (G)	1HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS5+5A>G
<i>NFKB1</i>	rs4648039	C	C/T	T	0,0087 (T)	2HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Tyr350(p=)
<i>NFKB1</i>	rs1609993	C	C/T	T	0,0417 (T)	1HM/11HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Aala381(p=)
<i>NFKB1</i>	rs190121351	T	T/C	C	0,0005 (C)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asp581(p=)
<i>NFKB1</i>	rs4648093	G	G/A	A	0,0243 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Thr585(p=)
<i>NFKB1</i>	rs138657975	A	A/G	G	0,0001 (G)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala744(p=)
<i>NFKB1</i>	rs777416263	C	C/T	T	0,00002 (T)	1HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS20+9C>T
<i>NFKB1</i>	rs148268461	T	T/TA	A	0,1021 (A)	7HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS23+2_2749+3insA
<i>CFI</i>	rs114013791	C	C/A	A	0,0037 (A)	2HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS12+5G>T
<i>CFI</i>	rs11098044	C	T/T	T	0,0331 (T)	3HM	variante_ <i>missense</i>	p.Ala300Thr
<i>CFI</i>	rs2298749	C	C/T	T	0,3205 (T)	5HM/24HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser268(p=)
<i>IL2</i>	rs2069763	C	C/A	A	0,3443 (A)	2HM/25HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu38(p=)
<i>IL21</i>	rs4833837	A	A/G	G	0,1992 (G)	4HM/24HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Cys78(p=)
<i>IL7R</i>	rs149235072	G	G/A	A	0,0009 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser51(p=)
<i>IL7R</i>	rs1494558	C	C/T	T	0,3869 (T)	6HM/26HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr66Ile
<i>IL7R</i>	rs1494555	A	A/G	G	0,3260 (G)	6HM/25HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ile138Val
<i>IL7R</i>	rs2228141	C	C/T	T	0,1346 (T)	17HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.His165(p=)
<i>IL7R</i>	rs11567764	G	G/A	A	0,0394 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Lys187(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
IL7R	rs6897932	C	C/T	T	0,1909 (T)	5HM/20HZ	variante_missense	p.Thr244Ile
IL7R	rs41270321	A	A/C	C	0,0078 (C)	3HZ	variante_missense	p.Asn348Thr
IL7R	rs3194051	A	A/G	G	0,2257 (G)	3HM/18HZ	variante_missense	p.Ile356Val
C9	rs754943606	G	G/A	A	0,00002 (C)	1HZ	stop_gained	p.Arg446Ter
C9	rs35460483	G	G/C	C	0,0151 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu355(p=)
C9	rs114751055	G	G/A	A	0,0060 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Phe212(p=)
C9	rs13361416	T	T/C	C	0,0302 (C)	1HZ	variante_missense	p.Ile203Val
C9	rs76184752	A	A/G	G	0,0060 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Asn178(p=)
C9	rs34882957	G	G/A	A	0,0032 (A)	1HZ	variante_missense	p.Pro167Ser
C9	rs476569	T	T/C	C	0,4636 (C)	11HM/29HZ	variante_intrónica	IVS1-10G>A
C9	rs700233	G	G/A	A	0,2949 (A)	10HM/19HZ	variante_missense	p.Arg5Trp
C7	rs34196526	G	G/A	A	0,0073 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.Gln61(p=)
C7	rs2271708	T	T/C	C	0,0234 (C)	1HZ	variante_missense	p.Cys128Arg
C7	rs1450656	T	T/C	C	0,3434 (C)	8HM/30HZ	variante_intrónica	IVS8-9C>T
C7	rs1063499	C	C/G	G	0,4881 (G)	18HM/26HZ	variante_missense	p.Ser389Thr
C7	rs150696042	G	G/A	A	0,0014 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.Glu447(p=)
C7	rs121964920	C	C/A	A	0,0014 (A)	1HZ	variante_missense	p.Arg521Ser
C7	rs13157656	A	A/C	C	0,1809 (C)	2HM/22HZ	variante_missense	p.Thr587Pro
C7	rs60714178	A	A/T	T	0,0810 (T)	1HM/13HZ	variante_missense	p.Thr598Ser
C6	rs200371424	T	T/C	C	0,0016 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Gln779(p=)
C6	rs41271067	T	T/C	C	0,0055 (C)	1HZ	variante_missense	p.Asp696Gly
C6	rs184169749	C	C/G	G	0,0005 (G)	1HZ	variante_missense	p.Asp667His
C6	rs144666796	C	C/T	T	0,0009 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg656Gln
C6	rs6866352	A	G/G	G	0,0009 (G)	4HM	variante_sinónima	p.Asp627(p=)
C6	rs62361567	A	A/G	G	0,0206 (G)	3HZ	variante_sinónima	p.Ser545(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
C6	chr5:41.176.606	TG	TG/T	-	0,000695 (-)	1HZ	variante_frameshift	p.Gln380SerfsTer7
C6	rs61734263	T	T/A	A	0,0055 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ser270(p=)
C6	rs61733159	T	T/G	G	0,0440 (G)	8HZ	variante_sinónima	p.Thr226(p=)
C6	rs1801033	T	T/G	G	0,4373 (G)	7HM/27HZ	variante_missense	p.Glu119Ala
C6	rs144491040	T	T/G	G	0,00002 (G)	1HZ	variante_missense	p.Asn74His
C6	rs200359838	T	T/G	G	0,00002 (G)	1HZ	variante_missense	p.Glu62Asp
PIK3R1	rs706713	C	C/T	T	0,4414 (T)	1HM/18HZ	variante_sinónima	p.Tyr73(p=)
PIK3R1	rs376498902	T	T/C	C	0,00002 (C)	1HZ	variante_intrónica	IVS2+9T>C
PIK3R1	rs61749601	T	T/C	C	0,0156 (C)	2HZ	variante_sinónima	p.Ile207(p=)
PIK3R1	rs3730089	G	G/A	A	0,2175 (A)	2HM/10HZ	variante_missense	p.Met326Ile
PIK3R1	rs3730090	C	C/T	T	0,0695 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Phe392(p=)
PIK3R1	rs3729981	T	T/C	C	0,0435 (C)	1HM/1HZ	variante_sinónima	p.Leu703(p=)
PIK3R1	rs41268435	C	C/T	T	0,0046 (T)	2HZ	variante_3_prima_UTR	3'UTR*3C>T
MEF2C	chr5:88.025.128	A	A/G	G	0,04574 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu291(p=)
MEF2C	rs563149132	G	G/A	A	0,05988 (A)	1HZ	variante_intrónica	IVS10+4C>T
IL13	rs55733734	C	C/T	T	0,0009 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr20(p=)
IL13	rs20541	G	G/A	A	0,2683 (A)	1HM/17HZ	variante_missense	p.Arg144Gln
IL4	rs2243251	A	A/G	G	0,0527 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu15(p=)
IL4	rs35648164	C	C/T	T	0,0050 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Asp111(p=)
IL4	rs2243290	C	C/A	A	0,4066 (A)	1HM/21HZ	variante_intrónica	IVS3-9C>A
C2	rs9332739	G	G/C	C	0,0302 (C)	3HZ	variante_missense	p.Glu318Asp
C2	rs1042663	G	G/A	A	0,0971 (A)	13HZ	variante_sinónima	p.Ala341(p=)
C2	rs9332730	G	G/C	C	0,0444 (C)	6HZ	variante_intrónica	IVS15+6G>C
C2	rs36221133	T	T/C	C	0,0137 (C)	2HZ	variante_missense	p.Val641Ala

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
CFB	rs4151667	T	T/A	A	0,0298 (A)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Leu9His
CFB	rs12614	C	C/T	T	0,1671 (T)	1HM/21HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg32Trp
CFB	rs641153	G	G/A	A	0,0983 (A)	13HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg32Gln
CFB	rs1048709	G	G/A	A	0,1735 (A)	1HM/12HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Arg150(p=)
CFB	rs4151669	G	G/A	A	0,0284 (A)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro168(p=)
CFB	rs113197809	C	T/T	T	0,0027 (T)	1HM	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser200(p=)
CFB	rs4151670	C	C/T	T	0,0137 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Tyr224(p=)
CFB	rs4151651	G	G/A	A	0,0133 (A)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gly252Ser
CFB	rs201659953	C	C/G	G	0,0007 (G)	1HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS7-10C>G
CFB	rs45600936	C	C/T	T	0,0064 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Arg379(p=)
CFB	rs2072634	C	C/T	T	0,0243 (T)	5HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Val455(p=)
CFB	rs149101394	A	A/G	G	0,0018 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Lys533Arg
CFB	rs4151659	A	A/G	G	0,0183 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Lys565Glu
CFB	rs45484591	A	A/C	C	0,0069 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu566Ala
PLG	rs73015965	A	A/G	G	0,0027 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Lys38Glu
PLG	rs4252070	G	G/A	A	0,0046 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Glu57Lys
PLG	rs143079629	G	G/A	A	0,0027 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg89Lys
PLG	rs4757	C	C/T	T	0,2509 (T)	9HM/24HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn110(p=)
PLG	rs143034754	G	A/A	A	0,0009 (A)	1HM	variante_ <i>missense</i>	p.Arg253His
PLG	rs14224	T	T/C	C	0,4501 (C)	13HM/27HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Cys257(p=)
PLG	rs4252187	G	G/A	A	0,0018 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg261His
PLG	rs1130656	C	C/T	T	0,3709 (T)	11HM/23HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Phe314(p=)
PLG	rs13231	A	A/G	G	0,1584 (G)	6HM/23HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gln361(p=)
PLG	rs4252119	C	C/T	T	0,0092 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg408Trp
PLG	rs4252120	T	T/C	C	0,1621 (C)	4HM/21HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS10+9T>C

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>PLG</i>	rs116573785	T	T/A	A	0,0201 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser460Arg
<i>PLG</i>	rs4252125	G	G/A	A	0,1621 (A)	8HM/25HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp472Asn
<i>PLG</i>	rs4252128	C	C/T	T	0,0096 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala494Val
<i>PLG</i>	rs4252129	C	C/T	T	0,0032 (T)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg523Trp
<i>PLG</i>	rs4252170	T	T/C	C	0,0824 (C)	5HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala694(p=)
<i>PLG</i>	rs11060	G	G/T	T	0,3114 (T)	8HM/30HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gly762(p=)
<i>HDAC9</i>	rs34096894	C	C/T	T	0,0408 (T)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu194(p=)
<i>HDAC9</i>	rs35614472	A	A/T	T	0,0064 (T)	3HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro385(p=)
<i>HDAC9</i>	rs35691757	C	C/T	T	0,0311 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser527(p=)
<i>HDAC9</i>	rs1178127	A	A/G	G	0,3301 (G)	1HM/24HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro624(p=)
<i>HDAC9</i>	rs41273078	C	C/G	G	0,0073 (G)	1HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS18-6C>G
<i>HDAC9</i>	rs138163349	T	T/C	C	0,0027 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ile1001Thr
<i>HDAC9</i>	rs2389998	T	T/C	C	0,2312 (C)	6HM/13HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Phe1010(p=)
<i>IL6</i>	rs2069860	A	A/T	T	0,0018 (T)	2HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp162Val
<i>IL6</i>	rs13306435	T	T/A	A	0,0302 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp162Glu
<i>IL6</i>	rs2069849	C	C/T	T	0,0559 (T)	6HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Phe201(p=)
<i>FAM126A</i>	rs3735231	T	T/C	C	0,3768 (C)	8HM/12HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser208(p=)
<i>CLU</i>	rs9331939	G	G/A	A	0,0041 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asp328(p=)
<i>CLU</i>	rs9331938	C	C/T	T	0,0046 (T)	3HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp328Asn
<i>CLU</i>	rs9331936	T	T/G	G	0,0618 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asn317His
<i>CLU</i>	rs150552076	G	G/A	A	0,00009 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr283Ile
<i>CLU</i>	rs7982	A	G/G	G	0,3489 (A)	31HM/17HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.His263(p=)
<i>CLU</i>	rs9331892	G	G/A	A	0,0485 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asp28(p=)
<i>CD72</i>	rs34791102	G	G/A	A	0,0517 (A)	5HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro234Leu
<i>CD72</i>	rs35185125	C	C/A	A	0,0124 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val50Leu

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
CD72	rs373358863	G	G/A	A	0,04118(T)	1HZ	variante_sinónima	p.Tyr39(p=)
PAX5	chr9:36.840.581	G	G/A	A	0,0001306 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala384(p=)
PAX5	rs3780135	A	A/G	G	0,2138 (G)	2HM/9HZ	variante_sinónima	p.Tyr370(p=)
PAX5	rs35469494	C	C/T	T	0,0174 (T)	8HZ	variante_sinónima	p.Gly343(p=)
PAX5	rs34810717	C	C/T	T	0,0032 (T)	2HZ	variante_missense	p.Ala322Thr
FAM120A	rs10821135	T	T/C	C	0,4144 (C)	11HM/27HZ	variante_sinónima	p.His254(p=)
FAM120A	rs55747985	T	TA/TA	A	ND	3HM/3HZ	variante_intrónica	IVS4+3insA
FAM120A	rs77023914	C	C/T	T	ND	5HZ	variante_sinónima	p.His447(p=)
FAM120A	rs144836182	G	G/T	T	0,00005 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro530(p=)
C5	rs41258306	T	T/C	C	0,0380 (C)	3HZ	variante_sinónima	p.Lys1602(p=)
C5	rs17612	T	T/G	G	0,0293 (G)	3HZ	variante_missense	p.Glu1437Asp
C5	rs12237774	C	C/T	T	0,1062 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala1422(p=)
C5	rs17610	C	C/T	T	0,0220 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ser1310Asn
C5	rs200624729	C	C/T	T	0,0004 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ala1155Thr
C5	rs115696235	T	T/C	C	0,0169 (C)	1HZ	variante_intrónica	IVS26+9A>G
C5	rs17611	C	C/T	T	0,4075 (T)	9HM/28HZ	variante_missense	p.Val802Ile
C5	chr9:123.776.258	C	C/T	T	0,04121(A)	1HZ	variante_missense	p.Arg717Gln
C5	rs25681	G	G/A	A	0,4084 (A)	8HM/29HZ	variante_sinónima	p.Tyr544(p=)
C5	rs2230214	G	G/A	A	0,0710 (A)	7HZ	variante_sinónima	p.Thr487(p=)
C5	rs10985126	T	T/C	C	0,2253 (C)	12HZ	variante_sinónima	p.Gly385(p=)
C5	rs17216529	C	C/T	T	0,1511 (T)	6HZ	variante_missense	p.Val145Ile
C5	rs140125346	T	T/G	G	ND	1HZ	variante_sinónima	p.Pro89(p=)
FCN2	rs17514136	A	A/G	G	0,1951 (G)	5HM/17HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-4A>G
FCN2	rs3128624	A	A/G	G	0,3608 (G)	11HM/26HZ	variante_intrónica	IVS2-9A>G

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>FCN2</i>	rs4520243	T	C/C	C	0,3585 (C)	11HM/26HZ	variante_sinónima	p.Arg74(p=)
<i>FCN2</i>	rs17549193	C	T/T	T	0,2418 (T)	5HM/17HZ	variante_missense	p.Thr236Met
<i>FCN2</i>	rs7851696	G	G/T	T	0,1493 (T)	2HM/9HZ	variante_missense	p.Ala258Ser
<i>IL2RA</i>	rs12722698	G	G/A	A	0,0137 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ile251(p=)
<i>IL2RA</i>	rs2228149	G	G/A	A	0,0641 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.His172(p=)
<i>IL2RA</i>	rs11256369	C	C/G	G	0,1928 (G)	1HM/17HZ	variante_intrónica	IVS3+7C>G
<i>IL2RA</i>	rs201105599	T	T/A	A	0,00007 (A)	1HZ	variante_missense	p.Glu99Asp
<i>IL2RA</i>	rs2228150	C	C/T	T	0,0673 (T)	3HZ	variante_sinónima	p.Pro28(p=)
<i>MBL2</i>	rs35805975	G	G/A	A	0,0179 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.Asn136(p=)
<i>MBL2</i>	rs930507	C	C/G	G	0,2294 (G)	2HM/15HZ	variante_sinónima	p.Leu126(p=)
<i>MBL2</i>	rs1800450	C	C/T	T	0,1218 (T)	1HM/15HZ	variante_missense	p.Gly54Asp
<i>MBL2</i>	rs5030737	G	G/A	A	0,0284 (A)	5HZ	variante_missense	p.Arg52Cys
<i>FAS</i>	rs3218619	G	G/A	A	0,0343 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ala16Thr
<i>FAS</i>	rs2229521	A	A/G	G	0,0394 (G)	3HZ	variante_sinónima	p.Thr74(p=)
<i>FAS</i>	rs28362318	G	G/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Gln123(p=)
<i>FAS</i>	rs2234978	T	T/C	C	0,2358 (T)	7HM/18HZ	variante_sinónima	p.Thr214(p=)
<i>BLNK</i>	rs143028297	C	C/T	T	0,0408 (T)	1HZ	variante_missense	p.Gly249Arg
<i>BLNK</i>	rs17111459	C	C/G	G	0,0133 (G)	1HZ	variante_intrónica	IVS6-5C>G
<i>BLNK</i>	rs148612299	C	C/A	A	0,0055 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ala158Ser
<i>BLNK</i>	rs727852	G	G/A	A	0,4876 (A)	19HM/23HZ	variante_sinónima	p.Pro57(p=)
<i>BLNK</i>	rs11540858	C	C/T	T	0,0288 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Arg16(p=)
<i>BLNK</i>	rs7916154	T	T/C	C	0,0201 (C)	1HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-5A>G
<i>IKK</i>	rs17880383	G	G/A	A	0,0394 (A)	1HM/6HZ	variante_sinónima	p.Ser486(p=)
<i>IKK</i>	rs2230804	T	T/C	C	0,4377 (C)	24HM/19HZ	variante_missense	p.Ile268Val
<i>SERPING1</i>	rs35788383	C	C/T	T	0,0032 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu251(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>SERPING1</i>	rs11229070	C	C/T	T	0,0078 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Ser406(p=)
<i>SERPING1</i>	rs4926	G	G/A	A	0,1699 (A)	10HM/17HZ	variante_missense	p.Val480Met
<i>CD20</i>	rs2070770	C	C/T	T	0,0678 (T)	1HM/9HZ	variante_sinónima	p.Ile72(p=)
<i>CLCF1</i>	rs78755659	G	G/A	A	0,0082 (A)	2HZ	variante_missense	p.Pro151Ser
<i>CLCF1</i>	rs867193	A	T/T	T	0,0852 (T)	1HM/3HZ	variante_sinónima	p.Pro36(p=)
<i>ATM</i>	rs1800054	C	C/G	G	0,0055 (G)	2HZ	variante_missense	p.Ser49Cys
<i>ATM</i>	rs148590073	A	A/G	G	0,0014 (G)	1HZ	variante_missense	p.Ile124Val
<i>ATM</i>	rs2234997	T	T/A	A	0,0458 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp126Glu
<i>ATM</i>	rs3218707	G	G/C	C	0,0124 (C)	1HZ	variante_missense	p.Val182Leu
<i>ATM</i>	rs3218674	C	C/T	T	0,0069 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Val245(p=)
<i>ATM</i>	rs28904919	C	C/T	T	0,0014 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ser333Phe
<i>ATM</i>	rs138398778	C	C/T	T	0,00009 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg337Cys
<i>ATM</i>	rs2227924	C	C/G	G	0,0137 (G)	1HZ	variante_missense	p.Leu546Val
<i>ATM</i>	rs4986761	T	T/C	C	0,0050 (C)	1HZ	variante_missense	p.Ser707Pro
<i>ATM</i>	rs2229019	C	C/T	T	0,0137 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Tyr731(p=)
<i>ATM</i>	rs34231402	T	T/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_missense	p.Phe763Leu
<i>ATM</i>	rs3218695	C	C/A	A	0,0092 (A)	1HZ	variante_missense	p.Asp814Glu
<i>ATM</i>	rs1800056	T	T/C	C	0,0069 (C)	2HZ	variante_missense	p.Phe858Leu
<i>ATM</i>	rs3218673	C	C/T	T	0,0110 (T)	1HZ	variante_missense	p.Pro872Ser
<i>ATM</i>	rs3218687	A	A/G	G	0,0110 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu895(p=)
<i>ATM</i>	rs3092857	A	A/G	G	0,0110 (G)	1HZ	variante_missense	p.Met1040Val
<i>ATM</i>	rs1800057	C	C/G	G	0,0151 (G)	5HZ	variante_missense	p.Pro1054Arg
<i>ATM</i>	rs3092856	C	C/T	T	0,0197 (T)	1HZ	variante_missense	p.His1380Tyr
<i>ATM</i>	rs1800058	C	C/T	T	0,0092 (T)	1HZ	variante_missense	p.Leu1420Phe
<i>ATM</i>	rs1800889	C	C/T	T	0,0183 (T)	8HZ	variante_sinónima	p.Pro1526(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>ATM</i>	rs3092829	T	T/C	C	0,0179 (C)	4HZ	variante_intrónica	IVS36-8T>C
<i>ATM</i>	rs1801516	G	G/A	A	0,0788 (A)	1HM/10HZ	variante_missense	p.Asp1853Asn
<i>ATM</i>	rs659243	G	A/A	A	0,0000 (A)	4HM	variante_missense	p.Asn1983Ser
<i>ATM</i>	rs1800060	G	G/A	A	0,0046 (A)	1HZ	variante_missense	p.Val2079Ile
<i>ATM</i>	rs56815840	G	G/C	C	0,0046 (C)	1HZ	variante_missense	p.Ser2146Thr
<i>ATM</i>	rs143489373	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala2354(p=)
<i>ATM</i>	rs759069006	G	G/T	T	0,000008 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu2739(p=)
<i>ATM</i>	rs4986839	A	A/C	C	0,0188 (C)	5HZ	variante_intrónica	IVS60+8A>C
<i>IL10RA</i>	rs4252301	G	G/C	C	0,0027 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Val7(p=)
<i>IL10RA</i>	rs4252249	G	G/A	A	0,1145 (A)	2HM/8HZ	variante_sinónima	p.Ala60(p=)
<i>IL10RA</i>	rs4252250	C	C/G	G	0,0087 (G)	1HZ	variante_missense	p.Leu61Val
<i>IL10RA</i>	rs2256111	G	G/A	A	0,4757 (A)	11HM/25HZ	variante_sinónima	p.Ala153(p=)
<i>IL10RA</i>	rs3135932	A	A/G	G	0,0824 (G)	9HZ	variante_missense	p.Ser159Gly
<i>IL10RA</i>	rs2228054	G	A/A	A	0,1218 (A)	1HM/1HZ	variante_sinónima	p.Pro175(p=)
<i>IL10RA</i>	rs2228055	A	G/G	G	0,1213 (G)	1HM/2HZ	variante_missense	p.Ile224Val
<i>IL10RA</i>	rs41354146	G	G/A	A	0,0105 (A)	1HZ	variante_missense	p.Val233Met
<i>IL10RA</i>	rs2229113	G	G/A	A	0,1896 (A)	6HM/16HZ	variante_missense	p.Arg351Gly
<i>IL10RA</i>	rs2229114	C	C/T	T	0,0284 (T)	9HZ	variante_missense	p.Ser420Leu
<i>C1QTNF5</i>	rs148291350	C	C/T	T	0,0009 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg114Gln
<i>C1S</i>	rs12146727	G	G/A	A	0,1085 (A)	2HM/8HZ	variante_missense	p.Arg119His
<i>C1S</i>	rs7965055	C	C/T	T	0,0778 (T)	7HZ	variante_sinónima	p.Cys147(p=)
<i>C1S</i>	rs1143664	A	A/G	G	0,0801 (G)	8HZ	variante_sinónima	p.Pro389(p=)
<i>C1S</i>	rs138087323	G	G/C	C	0,00002 (C)	1HZ	variante_missense	p.Glu608Asp
<i>C1R</i>	rs75380747	G	G/T	T	0,0453 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Ile412(p=)
<i>C1R</i>	rs1126605	C	C/T	T	0,1749 (T)	17HZ	variante_missense	p.Glu183Lys

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
C1R	rs1801046	G	G/A	A	0,2527 (A)	5HM/20HZ	variante_missense	p.Ser151Leu
C1R	rs146478898	C	C/T	T	0,0018 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro8(p=)
AICDA	rs2028373	A	A/G	G	0,4826 (G)	11HM/18HZ	variante_sinónima	p.His155(p=)
AICDA	rs5796316	C	C/CA	A	0,3758 (A)	1HM/7HZ	variante_intrónica	IVS3-5dupT
A2M	rs200486795	T	T/G	G	0,00002 (G)	1HZ	variante_missense	p.Ser1411Arg
A2M	chr12:9.230.415	C	C/T	T	0,008257(A)	1HZ	variante_missense	p.Arg1053Gln
A2M	rs190813517	A	A/C	C	0,0005 (C)	2HZ	variante_intrónica	IVS26-9T>G
A2M	rs202210880	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg1031Gln
A2M	rs669	T	T/C	C	0,2656 (C)	7HM/22HZ	variante_missense	p.Ile1000Val
A2M	rs11609582	A	A/T	T	0,1410 (T)	1HM/15HZ	variante_intrónica	IVS20-4A>T
A2M	rs149774234	C	C/T	T	0,0027 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Glu443(p=)
A2M	rs2228222	G	G/A	A	0,0307 (A)	10HZ	variante_sinónima	p.Tyr432(p=)
A2M	rs201901298	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Val120(p=)
CTSG	rs61737118	G	G/A	A	0,0293 (A)	3HZ	variante_sinónima	p.Phe234(p=)
CTSG	rs45567233	T	T/C	C	0,1003 (C)	1HM/8HZ	variante_missense	p.Asn125Ser
CTSG	rs45567233	T	C/C	C	0,1003 (C)	1HM/7HZ	variante_missense	p.Asn125Ser
CTSG	rs61737120	G	G/A	A	0,0082 (A)	1HZ	variante_missense	p.Thr90Ile
CTSG	rs61737123	C	C/G	G	0,0101 (G)	1HZ	variante_missense	p.Gly15Ala
IGHG2	rs28371022	C	C/T	T	0,4363 (T)	8HM/35HZ	variante_sinónima	p.Thr316(p=)
IGHG2	rs1049810	T	T/C	C	ND	3HM/9HZ	variante_sinónima	p.Thr273(p=)
IGHG2	rs4983499	A	C/C	C	0,0855 (A)	3HZ	variante_missense	p.Ser257Ala
IGHG2	rs11160859	G	G/A	A	0,4611 (A)	13HM/26HZ	variante_sinónima	p.Val187(p=)
IGHG2	rs8009156	C	T/T	T	0,2894 (T)	3HM/13HZ	variante_missense	p.Val161Met
IGHG2	rs11627594	G	G/T	T	0,2917 (T)	3HM/36HZ	variante_missense	p.Pro72Thr
IGHG2	rs139934867	C	C/T	T	0,0046 (T)	1HZ	variante_missense	p.Val68Met

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
IGHG2	rs11557955	C	C/T	T	0,4597 (T)	14HM/33HZ	variante sinónima	p.Pro54(p=)
IGHG2	rs61983197	A	A/G	G	0,0244 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala45(p=)
IGHG2	rs199678915	C	C/G	G	0,0424 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Ser7(p=)
IGHA1	rs1130951	C	C/T	T	0,0481 (T)	2HZ	variante_3_prima_UTR	3'UTR*4G>A
IGHA1	rs182183329	C	C/T	T	0,0614 (T)	2HZ	variante_missense	p.Arg273His
IGHA1	rs17349690	A	A/G	G	0,4420 (G)	8HM/38HZ	variante sinónima	p.Asp259(p=)
IGHA1	rs1130510	G	G/A	A	0,4731 (A)	8HM/22HZ	variante sinónima	p.Arg253(p=)
IGHA1	rs1129455	A	A/G	G	0,0007331 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr203(p=)
IGHA1	rs117775520	G	G/A	A	0,0147 (A)	3HZ	variante_missense	p.Pro190Ser
IGHA1	rs1407	C	C/G	G	0,3315 (G)	6HM/22HZ	variante missense	p.Glu176Asp
IGHA1	rs1128917	T	T/C	C	0,0302 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Ser128(p=)
IGHA1	rs144145908	C	C/T	T	0,0426 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Gln69(p=)
IGHA1	rs374024965	C	T/T	T	0,0002/1 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ala25Thr
IGHM	rs368913002	G	G/A	A	0,0008 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro358(p=)
IGHM	rs12365	A	A/C	C	0,0673 (C)	1HZ	variante_missense	p.Gly215Val
IGHM	rs1059216	T	T/C	C	0,2198 (C)	1HM/10HZ	variante missense	p.Ser191Gly
IGHM	rs1136534	A	A/G	G	0,4551 (G)	18HM/18HZ	variante sinónima	p.Ala107(p=)
IGHM	rs375883362	G	G/A	A	0,0004 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Tyr65(p=)
IGHM	rs368782551	C	C/T	T	0,001297 (T)	1HZ	variante_missense	p.Asp36Asn
IGHM	rs201981439	C	C/T	T	0,0135 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr21(p=)
IL4R	rs17548704	C	C/T	T	0,0060 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Ser36(p=)
IL4R	rs1805010	A	A/G	G	0,4512 (G)	5HM/26HZ	variante missense	p.Ile75Val
IL4R	rs145184963	C	C/T	T	0,0055 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Asn79(p=)
IL4R	rs112497527	T	T/C	C	0,0096 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Asp97(p=)
IL4R	rs3024570	G	G/A	A	0,0394 (A)	2HZ	variante_intrónica	IVS5-4G>A

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>IL4R</i>	rs2234895	C	C/T	T	0,0476 (T)	3HZ	variante_sinónima	p.Asn167(p=)
<i>IL4R</i>	rs3024638	C	C/G	G	0,0266 (G)	3HZ	variante_sinónima	p.Thr256(p=)
<i>IL4R</i>	rs2234897	T	T/C	C	0,0137 (C)	3HZ	variante_sinónima	p.Phe313(p=)
<i>IL4R</i>	rs6413500	C	C/T	T	0,0009 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ser387Leu
<i>IL4R</i>	rs1805011	A	A/C	C	0,2234 (C)	2HM/14HZ	variante_missense	p.Glu400Ala
<i>IL4R</i>	rs2234898	G	G/T	T	0,2221 (T)	2HM/14HZ	variante_sinónima	p.Leu414(p=)
<i>IL4R</i>	rs1805012	T	T/C	C	0,1016 (C)	11HZ	variante_missense	p.Cys431Arg
<i>IL4R</i>	rs2234899	C	C/T	T	0,0343 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Cys431(p=)
<i>IL4R</i>	rs2234900	T	T/C	C	0,2518 (C)	3HM/13HZ	variante_sinónima	p.Leu433(p=)
<i>IL4R</i>	rs1805015	T	T/C	C	0,2097 (C)	13HZ	variante_missense	p.Ser503Pro
<i>IL4R</i>	rs1801275	A	A/G	G	0,3452 (G)	4HM/17HZ	variante_missense	p.Gln576Arg
<i>IL4R</i>	rs3024677	G	G/A	A	0,0293 (A)	3HZ	variante_missense	p.Val579Ile
<i>IL4R</i>	rs3024678	C	C/T	T	0,0069 (T)	1HZ	variante_missense	p.Pro675Ser
<i>IL4R</i>	rs1805016	T	G/G	G	0,1181 (G)	1HM/3HZ	variante_missense	p.Ser752Ala
<i>IL4R</i>	rs1805014	T	T/C	C	0,0087 (C)	1HZ	variante_missense	p.Ser786Pro
<i>IL4R</i>	rs3024679	T	T/C	C	0,0408 (C)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro799(p=)
<i>IL4R</i>	rs2074570	T	T/C	C	0,0994 (C)	6HZ	variante_3_prima_UTR	3'UTR*6T>C
<i>CD19</i>	rs142342927	G	G/A	A	0,0032 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.Ser127(p=)
<i>CD19</i>	rs2904880	G	G/C	C	0,1827 (C)	2HM/18HZ	variante_missense	p.Leu174Val
<i>CD19</i>	rs35979293	G	G/T	T	0,2624 (T)	10HM/26HZ	variante_sinónima	p.Pro235(p=)
<i>CD19</i>	rs34763945	G	G/A	A	0,0256 (A)	2HZ	variante_missense	p.Arg515His
<i>ITGAM</i>	rs1143679	G	G/A	A	0,0879 (A)	3HM/13HZ	variante_missense	p.Arg77His
<i>ITGAM</i>	rs35314490	G	G/A	A	0,1213 (A)	3HM/17HZ	variante_intrónica	IVS6-4G>A
<i>ITGAM</i>	rs35472514	C	C/G	G	0,1210 (G)	2HM/3HZ	variante_intrónica	IVS7+10C>G
<i>ITGAM</i>	rs200610250	A	A/G	G	0,0002 (G)	1HZ	variante_missense	p.Lys247Glu

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
ITGAM	rs11861251	T	C/C	C	0,1044 (C)	1HM/13HZ	variante_missense	p.Met441Thr
ITGAM	rs8056264	C	C/T	T	0,0563 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Leu602(p=)
ITGAM	rs1143682	G	G/A	A	0,3929 (A)	4HM/30HZ	variante_sinónima	p.Thr834(p=)
ITGAM	rs1143683	C	C/T	T	0,1209 (T)	3HM/20HZ	variante_missense	p.Ala859Val
ITGAM	rs61758333	G	G/T	T	0,0009 (T)	1HZ	variante_missense	p.Met952Ile
ITGAM	rs1143678	C	C/T	T	0,1259 (T)	3HM/22HZ	variante_missense	p.Pro1147Ser
VTN	rs150241335	G	G/A	A	0,0001 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Ile465(p=)
VTN	rs2227728	A	A/G	G	0,1273 (G)	1HM/5HZ	variante_sinónima	p.Asn448(p=)
VTN	rs704	A	A/G	G	0,4231 (G)	11HM/26HZ	variante_missense	p.Thr400Met
VTN	chr17:26.694 .922	G	G/A	A	4,08e-05 (A)	1HZ	variante_missense	p.Arg380Cys
VTN	rs2227725	G	G/A	A	0,0214 (A)	1HM/5HZ	variante_intrónica	IVS5-10C
VTN	rs112887300	T	T/A	A	0,0046 (A)	1HZ	variante_missense	p.Glu126Val
CD79B	rs2070776	G	G/A	A	0,4006 (A)	2HM/32HZ	variante_sinónima	p.Cys123(p=)
CFD	rs1629038	G	G/C	C	0,4460 (C)	16HM/24HZ	variante_intrónica	IVS2-9G>C
C3	rs17030	G	G/A	A	0,4922 (A)	17HM/28HZ	variante_sinónima	p.Pro1632(p=)
C3	rs11569565	G	G/A	A	0,0751 (A)	3HZ	variante_intrónica	IVS38-8C>T
C3	rs2277984	C	C/T	T	0,4853 (T)	18HM/28HZ	variante_intrónica	IVS36-4G>A
C3	rs113742728	C	C/G	G	0,0014 (G)	1HZ	variante_missense	p.Asp1457His
C3	rs7951	G	G/A	A	0,0865 (A)	2HM/8HZ	variante_sinónima	p.Ala1437(p=)
C3	rs11569541	A	A/G	G	0,0041 (G)	1HZ	variante_missense	p.Ile1367Thr
C3	rs2230209	G	G/T	T	0,0124 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro1251(p=)
C3	rs11569510	A	A/G	G	0,1131 (G)	2HM/17HZ	variante_intrónica	IVS26-8C>T
C3	rs2287845	A	A/G	G	0,2729 (G)	11HM/24HZ	variante_intrónica	IVS22+7C>T
C3	rs423490	G	G/A	A	0,1799 (A)	2HM/20HZ	variante_sinónima	p.Ala915(p=)
C3	rs428453	C	C/G	G	0,2729 (C)	11HM/24HZ	variante_sinónima	p.Val807(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
C3	rs406514	G	A/A	A	0,1804 (G)	2HM/20HZ	variante intrónica	IVS17-8C>T
C3	rs142455019	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Tyr730(p=)
C3	rs2230205	C	T/T	T	0,2097 (T)	1HM/7HZ	variante sinónima	p.Thr612(p=)
C3	rs2230204	C	C/T	T	0,3938 (T)	8HM/20HZ	variante sinónima	p.Val564(p=)
C3	rs2230203	G	G/T	T	0,0797 (T)	1HM/14HZ	variante sinónima	p.Pro518(p=)
C3	rs11569422	C	C/G	G	0,0128 (G)	1HZ	variante_missense	p.Glu469Asp
C3	rs1047286	G	G/A	A	0,0856 (A)	1HM/14HZ	variante missense	p.Pro314Leu
C3	rs2230201	C	T/T	T	0,2221 (T)	2HM/9HZ	variante sinónima	p.Arg304(p=)
C3	rs2230200	G	G/A	A	0,0069 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Tyr261(p=)
C3	rs11569571	G	G/A	A	0,0087 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Asn247(p=)
C3	rs2230199	G	G/C	C	0,0975 (C)	1HM/13HZ	variante missense	p.Arg102Gly
FCER2	rs142442084	A	A/G	G	0,0004 (G)	1HZ	variante_missense	p.Ser316Pro
FCER2	rs8102872	C	C/T	T	0,0055 (T)	3HZ	variante_missense	p.Arg284Gln
FCER2	rs2228138	G	G/A	A	0,3622 (A)	13HM/22HZ	variante sinónima	p.Cys123(p=)
FCER2	rs1042429	C	C/T	T	0,0032 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Gly230(p=)
FCER2	rs4996973	A	A/G	G	0,3622 (G)	13HM/22HZ	variante intrónica	IVS9-8T>C
FCER2	rs28364072	A	A/G	G	0,3622 (G)	13HM/22HZ	variante intrónica	IVS9+7T>C
FCER2	rs72558007	C	C/T	T	0,0160 (T)	3HZ	variante_missense	p.Gly76Ser
FCER2	rs2228137	G	G/A	A	0,1635 (A)	2HM/19HZ	variante missense	p.Arg62Trp
FCER2	rs2287866	A	A/G	G	0,1575 (G)	6HZ	variante sinónima	p.Arg20(p=)
CD320	rs2227289	G	G/C	C	0,1172 (C)	1HM/1HZ	variante_sinónima	p.Thr279(p=)
CD320	rs200607555	G	G/A	A	0,0014 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu253(p=)
CD320	rs2336573	C	C/T	T	0,1172 (T)	1HM/1HZ	variante_missense	p.Gly220Arg
CD320	rs2232784	G	G/A	A	0,1168 (A)	1HM/1HZ	variante_sinónima	p.Ser161(p=)
CD320	rs2232783	C	C/A	A	0,1172 (A)	1HM/1HZ	variante_sinónima	p.Thr149(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
CD320	rs2232776	C	C/G	G	0,1172 (G)	1HM/1HZ	variante_intrónica	IVS1+10G>C
CD320	rs2232775	T	T/C	C	0,1470 (C)	1HM/1HZ	variante_missense	p.Gln8Arg
CD320	rs2232773	C	C/T	T	0,1177 (T)	1HM/1HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR.-2G>A
CALR	rs187996595	A	A/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr169(p=)
CALR	rs201971744	A	A/G	G	0,0009 (G)	2HZ	variante_missense	p.Glu380Gly
CD22	rs145621000	G	G/C	C	0,0023 (C)	3HZ	variante_sinónima	p.Leu325(p=)
CD22	rs61741013	G	G/A	A	0,0137 (A)	1HZ	variante_missense	p.Ala391Thr
CD22	rs61743666	C	C/T	T	0,0050 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Leu413(p=)
CD22	rs25677	C	C/T	T	0,0522 (T)	3HZ	variante_sinónima	p.Cys484(p=)
CD22	rs35715143	G	G/A	A	0,0188 (A)	2HZ	variante_missense	p.Gly551Arg
CD22	rs10406069	G	G/A	A	0,1442 (A)	2HM/13HZ	variante_missense	p.Gly745Asp
CD22	rs34826052	C	C/A	A	0,0559 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Pro768(p=)
CD22	rs79438722	C	C/T	T	0,0174 (T)	2HZ	variante_sinónima	p.Cys790(p=)
CD22	rs117891073	G	G/A	A	0,01561 (A)	1HZ	variante_intrónica	IVS13+10G>A
TGFBI	rs1800472	G	G/A	A	0,0137 (A)	8HZ	variante_missense	p.Thr263Ile
TGFBI	rs55659002	TG	TG/T	-	0,0139 (-)	4HZ	variante_intrónica	IVS4-8delC
TGFBI	rs202071274	T	T/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Thr137(p=)
TGFBI	rs1800471	C	C/G	G	0,0462 (G)	7HZ	variante_missense	p.Arg25Pro
TGFBI	rs1800470	G	A/A	A	0,4446 (G)	15HM/20HZ	variante_missense	p.Pro10Leu
C5AR2	rs138613140	C	C/T	T	0,0055 (T)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala43(p=)
C5AR2	rs36046934	G	G/A	A	0,0169 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.Ala199(p=)
FCGRT	rs200294618	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_missense	p.Arg185His
FCGRT	rs2878342	C	C/T	T	0,1268 (T)	7HZ	variante_sinónima	p.Arg194(p=)
FCGRT	rs3810194	T	T/C	C	0,1166 (C)	5HZ	variante_intrónica	IVS5+7T>C
FCGRT	rs201395293	C	C/T	T	0,0005 (T)	1HZ	variante_missense	p.Ala363Val

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>FCGRT</i>	rs768835093	G	G/A	A	0,00003 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala365Thr
<i>FCAR</i>	rs1865096	G	G/A	A	0,2482 (A)	5HM/21HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Arg108(p=)
<i>FCAR</i>	rs11666735	G	G/A	A	0,0627 (A)	6HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp113Asn
<i>FCAR</i>	rs61735069	T	T/C	C	0,0545 (C)	4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu211(p=)
<i>FCAR</i>	rs79401710	C	C/T	T	0,0531 (T)	4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro224(p=)
<i>FCAR</i>	rs61735070	G	G/A	A	0,0019 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro266(p=)
<i>FCAR</i>	rs16986050	A	A/G	G	0,1662 (G)	2HM/14HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser269Gly
<i>ADA</i>	rs183914222	G	G/A	A	0,0005 (A)	1HZ	variante_3_ <i>prima</i> _UTR	3'UTR*4C>T
<i>ADA</i>	rs244076	T	T/C	C	0,2212 (C)	3HM/10HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Val178(p=)
<i>ADA</i>	rs61737144	C	C/T	T	0,0298 (T)	1HM/4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Val130(p=)
<i>ADA</i>	rs11555566	T	T/C	C	0,0430 (C)	5HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Lys80Arg
<i>ADA</i>	rs73598374	C	C/T	T	0,0440 (T)	5HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Asp8Asn
<i>CD40</i>	rs1883832	C	C/T	T	0,2436 (T)	7HM/19HZ	variante_5_ <i>prima</i>_UTR	5'UTR.-1T>C
<i>CD40</i>	rs11569321	C	T/T	T	0,0325 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ser124Leu
<i>CD40</i>	rs7273698	C	T/T	T	0,0343 (T)	1HM	variante_ <i>sinónima</i>	p.Phe202(p=)
<i>CD40</i>	rs11086998	C	C/G	G	0,0211 (G)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro227Ala
<i>CHRNA4</i>	rs1044397	C	T/T	T	0,3956 (T)	1HM	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ala553(p=)
<i>CHRNA4</i>	rs2229960	G	G/A	A	0,1204 (A)	6HM	variante_ <i>sinónima</i>	p.Cys409(p=)
<i>CHRNA4</i>	rs2229959	A	A/C	C	0,2321 (C)	4HM/32HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Pro403(p=)
<i>CHRNA4</i>	rs781131183	T	T/C	C	0,00001 (C)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Gln399Arg
<i>CHRNA4</i>	rs200605749	C	C/T	T	0,00002 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Arg354His
<i>CHRNA4</i>	rs1044394	G	G/A	A	0,0804 (A)	4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Cys226(p=)
<i>CHRNA4</i>	rs1044393	A	G/G	G	0,2147 (A)	3HM/17HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asp213(p=)
<i>CHRNA4</i>	rs2273506	G	G/A	A	0,0962 (A)	1HM/17HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu63(p=)
<i>CHRNA4</i>	rs79739740	C	T/T	T	0,0229 (T)	1HM/4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu17(p=)

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>CHRNA4</i>	rs6089898	C	C/G	G	0,0008 (G)	1HZ	variante_sinónima	p.Ala8(p=)
<i>IL10RB</i>	rs80027572	G	G/A	A	0,0023 (A)	1HZ	variante_missense	p.Glu25Lys
<i>IL10RB</i>	rs2834167	A	A/G	G	0,3457 (G)	4HM/12HZ	variante_missense	p.Lys47Glu
<i>ITGB2</i>	rs17004713	G	G/A	A	0,0211 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Cys631(p=)
<i>ITGB2</i>	rs5030672	G	G/A	A	0,0082 (A)	2HZ	variante_missense	p.Arg586Trp
<i>ITGB2</i>	rs145507744	C	C/T	T	0,0002 (T)	1HZ	variante_missense	p.Glu576Lys
<i>ITGB2</i>	rs2230530	G	G/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_sinónima	p.Cys514(p=)
<i>ITGB2</i>	rs235326	G	G/A	A	0,2331 (A)	1HM/27HZ	variante_sinónima	p.Val441(p=)
<i>ITGB2</i>	rs141201564	G	G/A	A	0,0023 (A)	1HZ	variante_missense	p.Thr391Met
<i>ITGB2</i>	rs2230529	G	G/T	T	0,1928 (T)	4HM/23HZ	variante_sinónima	p.Val367(p=)
<i>ITGB2</i>	rs235330	T	A/A	A	0,0000 (T)	1HM	variante_missense	p.Gln354His
<i>ITGB2</i>	rs2230528	C	C/T	T	0,1896 (T)	4HM/19HZ	variante_sinónima	p.Gly273(p=)
<i>ITGB2</i>	rs17004715	G	G/A	A	0,0458 (A)	4HZ	variante_intrónica	IVS5+7C>T
<i>ITGB2</i>	rs35903905	C	C/T	T	0,0169 (T)	5HZ	variante_sinónima	p.Ser39(p=)
<i>ITGB2</i>	rs5030667	G	G/A	A	0,0160 (A)	6HZ	variante_sinónima	p.Leu11(p=)
<i>ITGB2</i>	rs11088969	C	C/A	A	0,1690 (A)	6HM/9HZ	variante_sinónima	p.Leu8(p=)
<i>VPREB1</i>	rs11089978	T	T/C	C	0,1030 (C)	1HZ	variante_5_prima_UTR	5'UTR-10T>C
<i>VPREB1</i>	rs9619852	G	G/A	A	0,0554 (A)	5HZ	variante_sinónima	p.Leu23(p=)
<i>VPREB1</i>	rs1320	G	G/A	A	0,0298 (A)	3HZ	variante_missense	p.Asp76Asn
<i>VPREB1</i>	rs5995719	C	C/T	T	0,1493 (T)	1HM/18HZ	variante_sinónima	p.Ser121(p=)
<i>VPREB1</i>	rs5995720	G	G/A	A	0,1511 (A)	1HM/15HZ	variante_missense	p.Glu132Lys
<i>IGLL1</i>	rs8138122	C	C/T	T	0,0403 (T)	1HZ	variante_missense	p.Arg189His
<i>IGLL1</i>	rs75088277	G	G/A	A	0,0343 (A)	2HZ	variante_sinónima	p.Pro183(p=)
<i>IGLL1</i>	rs111903752	A	A/T	T	0,0449 (T)	3HZ	variante_missense	p.Met162Lys
<i>IGLL1</i>	rs139571703	C	C/T	T	0,0353 (T)	2HZ	variante_missense	p.Gly159Ser

Gen	dbSNP	Referencia	Genotipo	Alelo	1kg_MAF	Pacientes (HM/HZ)	Efecto	HGVS-prot
<i>IGLL1</i>	rs145176864	G	G/A	A	0,0206 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Pro155Leu
<i>IGLL1</i>	rs73157031	G	G/A	A	0,1346 (A)	14HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr148Ile
<i>IGLL1</i>	rs114285337	C	C/T	T	0,0037 (T)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Gln103(p=)
<i>IGLL1</i>	rs115303391	G	G/A	A	0,0247 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Ser100(p=)
<i>IGLL1</i>	rs116041505	G	G/T	T	0,0266 (T)	4HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Thr95Lys
<i>IGLL1</i>	rs116275804	G	G/A	A	0,0229 (A)	4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn92(p=)
<i>IGLL1</i>	rs116760479	C	C/T	T	0,0206 (T)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Val33Met
<i>MIF</i>	rs201099096	G	G/A	A	0,0037 (A)	1HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Glu86(P=)
<i>MIF</i>	rs189811391	C	C/T	T	0,0064 (T)	1HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS2-9C>T
<i>MIF</i>	rs2070766	C	C/G	G	0,1900 (G)	1HM/11HZ	variante_ <i>intrónica</i>	IVS2-6C>G
<i>CFP</i>	rs1048118	G	G/A	A	0,1814 (A)	12HM/7HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Asn428(p=)
<i>VSIG4</i>	rs146489734	C	C/A	A	0,0065 (A)	1HZ	variante_ <i>missense</i>	p.Ala332Ser
<i>VSIG4</i>	rs144052171	C	T/T	T	0,0006 (T)	1HM	variante_ <i>missense</i>	p.Arg308Gln
<i>VSIG4</i>	rs17315645	C	T/T	T	0,0175 (T)	2HM	variante_ <i>missense</i>	p.Gly279Glu
<i>CD40LG</i>	rs1126535	T	C/C	C	0,1911 (C)	6HM/4HZ	variante_ <i>sinónima</i>	p.Leu50(p=)
<i>CD40LG</i>	rs148594123	G	A/A	A	0,0084 (A)	1HM	variante_ <i>missense</i>	p.Gly219Arg

HM: homocigosis; HZ: heterocigosis; MAF: Frecuencia alélica minoritaria; ND: No disponible; prot: proteína. Las filas en rojo señalan los polimorfismos seleccionados para el análisis por presentar una frecuencia > 7%.

DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS



ORIGINAL CLINICAL SCIENCE

Polymorphisms in genes related to the complement system and antibody-mediated cardiac allograft rejection

Grecia M. Marrón-Liñares, BSc,^{a,1} Lucía Núñez, BPharm, PhD,^{a,1}
María G. Crespo-Leiro, MD, PhD,^b Eduardo Barge-Caballero, MD, PhD,^b
Jorge Pombo, MD,^c María Jesús Paniagua-Martin, MD, PhD,^b
Natalia Suarez-Fuentetaja, BSc, PhD,^a Javier Cid, BSc,^d
Zulaika Grille-Cancela, BSc,^b Javier Muñiz-García, MD, PhD,^a Carmela D. Tan,^e
E. Rene Rodríguez, MD,^e José Manuel Vázquez-Rodríguez, MD, PhD,^b and
Manuel Hermida-Prieto, BSc, PhD^a

From the ^aGrupo de investigación en Cardiología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Servizo Galego de Saúde (SERGAS), Universidade da Coruña (UDC), A Coruña, Spain; ^bServicio de Cardiología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC)-Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCv), SERGAS, Universidade da Coruña (UDC), A Coruña, Spain; ^cServicio de Anatomía Patológica, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, A Coruña, Spain; ^dServicio de Inmunología, Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, A Coruña, Spain; and the ^eDepartment of Pathology, The Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio.

KEYWORDS:

complement genes;
antibody-mediated
rejection;
heart transplantation;
mannose binding
lectin;
properdin

BACKGROUND: Heart transplantation (HT) is a life-saving treatment for patients with end-stage heart failure. One of the main problems after HT is the humoral response termed antibody-mediated rejection (AMR). Complement activation plays a key role in AMR contributing to graft damage. The aim of this study was to analyze genetic variants in genes related to the complement pathways that could be associated with the development of AMR.

METHODS: Analysis of 51 genes related to the complement pathway was performed by next-generation sequencing in 46 HT recipients, 23 with and 23 without AMR. Statistical analysis was performed with SNPstats and R.

RESULTS: We identified 2 single nucleotide polymorphisms, 1 in the mannose-binding lectin 2 gene (p.Gly54Asp-*MBL2*) and 1 in the complement factor properdin gene (p.Asn428(p=)-*CFP*), that showed significant association with the absence and development of AMR, respectively. Moreover, the presence of the rare allele in p.Gly54Asp-*MBL2* control patients correlated with an immunodeficiency of mannose-binding lectin (6.24 ng/ml vs 207.50 ng/ml, $p < 0.01$), whereas the presence of the rare allele p.Asn428(p=)-*CFP* in patients with AMR correlated with higher levels of properdin protein (14.65 µg/ml vs 10.77 µg/ml, $p < 0.05$).

¹These authors have contributed equally to this work.

Reprint requests: Manuel Hermida-Prieto, BSc, PhD, Instituto de Investigación Biomédica de la Universidad de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC)-Universidad de A Coruña, As Xubias de Arriba 84, A Coruña 15006, Spain.
Telephone: +00 34 628 517 328. Fax: +00 34 981 17 63 98.
E-mail address: manuelhermidaprieto@gmail.com

CONCLUSIONS: AMR is a complex phenotype affected by many recipient factors. Variants in p.Gly54Asp-*MBL2* and p.Asn428(p=)-*CFP* genes, encoding mannose-binding lectin 2 and properdin, may influence the risk of AMR.

J Heart Lung Transplant ■■■■;■:■■■-■■■

© 2017 International Society for Heart and Lung Transplantation. All rights reserved.

Heart transplantation (HT) is a well-established life-saving treatment for patients presenting with end-stage cardiac failure. However, it has been established that approximately 15%–25% of patients who receive a transplant experience cell-mediated rejection episodes, and some develop antibody-mediated rejection (AMR).^{1,2} AMR in HT is associated with hemodynamic compromise, increased graft loss, cardiac allograft vasculopathy (CAV), and increased mortality.² The true incidence of AMR is unknown; however, values ranging from 3% to 85%, owing to diverse diagnostic criteria and variations in screening frequency, have been reported.^{3,4} Our research group reported an incidence of <3% when using the criteria of allograft dysfunction and C4d deposition in endomyocardial biopsy.⁵

Allograft rejection caused by antibodies can be mediated by different mechanisms, as opposed to T-cell rejection. Classically, antibody induces acute rejection through the fixation and activation of the complement cascade, resulting in tissue injury.^{4,6} Complement, which is a multicomponent system of receptors, regulators, and effector molecules, is a very powerful amplifier of the innate and adaptive immunity contributing to the pathogenesis of AMR.^{6,7}

More than 50 genes encoding proteins of complement components, receptors, and regulators have been described.⁸ The complement system consists of many proteins, mainly proteases, which create a cascade when triggered.⁹ There are 3 pathways of complement activation (Figure S1, available in the online version of this article at www.jhltonline.org): (1) the classical pathway, which is activated by antibodies bound to antigens and forming immune complexes; (2) the lectin pathway, which is activated by carbohydrates such as mannose-binding lectin (MBL); and (3) the alternative pathway, which is activated in the absence of antibodies by spontaneous hydrolysis of C3. Each pathway converges in the formation of a C3 convertase molecule, whose function is to cleave C3.

Several polymorphisms and mutations in genes related to the complement system have been associated with different diseases, including renal, ocular, and infectious diseases.^{8,10–12} In the field of transplantation, most studies have focused on renal transplant outcomes. For example, the GGCG haplotype and 450 C/T polymorphism in *C5* and *C5a* genes were associated with lower renal allograft function¹³ and low risk for graft rejection,¹⁴ respectively, whereas a polymorphism in *CD46* was associated with acute renal allograft rejection.¹⁵ Moreover, mutations in complement genes may predict recurrence and graft outcome in renal transplant recipients with atypical hemolytic-uremic syndrome.^{16,17} However, other studies showed no association between polymorphisms in C3 and lectin complement

pathway genes and graft outcome.^{18–20} One limitation of these studies was that they analyzed <6 genes involved in the complement pathway.^{13–20} Recently, Ermini et al²¹ analyzed the relationship between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 47 complement genes and graft survival, serum creatinine, delayed graft function, and acute rejection in donors and recipients of renal transplants. They found 1 donor SNP, c.304+363T>C (rs4935047), in the non-coding region of the mannose-binding lectin 2 gene (*MBL2*) associated with worse graft outcome.

In HT, several genetic polymorphisms in cytokine genes have been associated with the risk of acute rejection.²² Despite the important role of complement in AMR, no study to our knowledge has described the role of variants in complement genes in AMR after HT. Thus, the aim of the present study was to investigate the association between variants in complement genes and the development of AMR after HT.

Methods

Patients

A retrospective case-control study was conducted in samples from a historical cohort of patients who received a HT at Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) from June 2000 until November 2016. The study was carried out on 46 HT recipients, 23 with and 23 without AMR. The 23 AMR cases were matched to 23 control patients by sex, age (± 5 years), and follow-up post-transplant.

The diagnostic criteria to define the cases of AMR were different according to whether the transplant date was before or after 2013. AMR in patients who underwent HT before 2013 ($n = 15$) was defined according to the following criteria: (1) allograft dysfunction (left ventricular ejection fraction <30% and/or heart failure), (2) no evidence of other causes of allograft dysfunction (acute cellular rejection or CAV), (3) evidence of complement activation on endomyocardial biopsy (C4d and/or C3d staining), and (4) favorable response to therapy addressing AMR (e.g., plasmapheresis, rituximab, steroid boluses). AMR in patients who underwent HT after 2013 ($n = 8$) was classified according to International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) categories pAMR1(I+), pAMR1(H+), pAMR2, and pAMR3²³ and inclusion criteria of having at least 1 positive endomyocardial biopsy (pAMR1 or higher). Control patients did not present with any distinguishing signs of AMR (pAMR0) or allograft dysfunction. Each control patient was followed a minimum of 6 months longer than the AMR event of the corresponding case. All HT recipients provided biological samples for DNA analysis.

All samples used for this work had been stored in the collection of samples for research of the advanced heart failure and cardiac transplant unit of CHUAC (“Colección de muestras para la investigación de insuficiencia cardiaca avanzada y trasplante

cardiaco” registered in the Instituto de Salud Carlos III as C_0000419, 2012/348). The study was approved by the local Ethics Committee (“Comité ético de investigación de Galicia,” reference: 2014/012) and conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained for sample collection and genetic screening tests.

Genetic study

Genomic DNA was isolated from clots and blood samples using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) following the manufacturer’s instructions and was stored at 4°C until use. The genetic analysis included 51 genes related to the complement pathway (Figure S1 and Table S1, available in the online version of this article at www.jhltonline.org). For this purpose, target resequencing was performed using TruSight One Sequencing Panel (Illumina, San Diego, CA), consisting of 4,813 genes, including the 51 genes selected. The sequence library was constructed using 50 ng of each genomic DNA, quantified with Qubit 2.0 (Life Technologies). The NextSeq500 platform (Illumina) was used to perform 151-bp paired-end sequencing according to manufacturer’s instructions. The sequencing reads were aligned to the human reference genome (hg19). The extracted variants, reported in variant call format output file, were evaluated for coverage and Qscore. In addition, coding and adjacent intronic regions of the 51 genes were visualized via Integrative Genomics Viewer to confirm the presence of the variants detected.

In silico tools

The potential effect of missense SNPs associated with AMR was predicted using in silico tools. Moreover, the minor allele frequency (MAF) of the SNPs detected by next-generation sequencing (NGS) was extracted from the Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) and/or the Exome Aggregation Consortium (ExAC).

Localization

Topologic placement of the mutations was done using the Swissprot database (<http://ca.expasy.org/uniprot/>) and the bibliography previously described. The Uniprot database provides generally accepted residue ranges corresponding with each domain region and specialized subregion. The Swiss-Pdb Viewer (v.4.10) was used to generate the models of the mutated protein structure by replacing the native amino acid for the variant.

Predicting damaging amino acid substitution

Three online tools were used to predict the pathogenicity of the missense variants: SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html), Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/20pph2/>), and PhDSNP (<http://snps.uib.es/phd-snp/phdsnp.html>). The ClinVar database was also consulted.

Sanger sequencing

Direct sequencing of 15 amplicons (Table S2, available in the online version of this article at www.jhltonline.org), containing at least 1 variant by NGS each, was performed to evaluate sensitivity [TP/(TP+FN)], specificity [TN/(TN+FP)], and accuracy [(TP+TN)/(TP+FP+FN+TN)] of the NGS technique. In

these formulas, TP means true-positive, TN means true-negative, FP means false-positive, and FN means false-negative.

Enzyme-linked immunosorbent assay measurements

Pre-transplant serum samples were used for the determination of functional MBL ($n = 9$, 5 samples from patients with AMR with the reference sequence in the position c.161 and 4 samples from control patients that carried the variant c.161G>A) and properdin ($n = 16$, 5 with AMR and variant c.1284C>T and 11 without AMR and with the reference sequence in the position c.1284) levels, using commercially available competitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay kits (MBL, Human, ELISA kit HK323-01, and Properdin, Human, ELISA kit HK334-01) from Hycult Biotech (Uden, Netherlands).

MBL measurable concentration range was 0.4–100 ng/ml. Serum samples were diluted 1:10 with MBL-binding buffer, and all measurements were made in duplicate. Properdin measurable concentration range was 0.3–20 ng/ml. Serum samples were diluted 1:2,000 with dilution buffer, and all measurements were made in triplicate. In both cases, the absorbance at 450 nm was measured in a spectrophotometer. The concentration of MBL varies among individuals from <5 to >5,000 ng/ml²⁴; the properdin concentration varies from 5 to 15 µg/ml.²⁵

Statistical analyses

Continuous variables are expressed as mean \pm SD. Discrete variables are shown as percentage. For the genetic analysis, multiple inheritance models (codominant, dominant, recessive, and log-additive) were first applied by using SNPStats software. In addition, the genetic analysis was redone using R software for SNPs with significant allele association with any of the multiple models. Differences in allele and genotype frequencies between the 2 groups were assessed by McNemar’s chi-square test using R. A p -value of 0.05 was used as a significance threshold.

For analysis of serum levels, values were expressed as median and interquartile range (IQR). To assess the significance of differences of protein serum levels, the Mann-Whitney U test for non-normally distributed values was performed using R software. $p < 0.05$ was considered statistically significant. The R package and commands used to perform the statistical analyses are presented in the supplementary data (available in the online version of this article at www.jhltonline.org).

Results

Baseline clinical characteristics

Of the 46 patients studied, 86.96% were men, and the mean age of recipients at time of transplantation was 50.1 years \pm 16.0 (Table 1). The mean follow-up post-transplant was 7.3 years \pm 3.6, and the most common heart disease in patients requiring HT was ischemic cardiomyopathy (39.1%). Table 1 displays the study population demographics, including immunosuppressive regimens. Furthermore, available data from the characterization of anti-HLA antibodies in both patients with AMR and control patients were included (Table S3, available in the online version of this article at www.jhltonline.org). Using the pathologic

Table 1 Clinical Characteristics of Patients

Variable	Total (n = 46 patients)	AMR (n = 23 patients)	Control (n = 23 patients)
Age, years, mean ± SD	50.1 ± 16.0	50.2 ± 16.5	50.0 ± 15.9
Male	87.0% (40)	87.0% (20)	87.0% (20)
Female	13.0% (6)	13.0% (3)	13.0% (3)
Primary heart disease			
Dilated cardiomyopathy	34.8% (16)	26.1% (6)	43.5% (10)
Ischemic cardiomyopathy	39.1% (18)	52.2% (12)	26.1% (6)
Valvular cardiomyopathy	10.9% (5)	8.7% (2)	13.0% (3)
Others	15.2% (7)	13.0% (3)	17.4% (4)
Time since transplant			
< 2 years	10.4% (5)	17.4% (4)	4.4% (1)
2–5 years	23.9% (11)	30.4% (7)	17.4% (4)
≥ 6 years	65.2% (30)	52.2% (12)	78.3% (18)
Time to AMR diagnosis after transplant, years, mean ± SD		3.5±0.6	
Cytomegalovirus status			
Donor +/recipient +	58.7% (27)	56.5% (13)	60.9% (14)
Donor –/recipient –	2.2% (1)	0	4.4% (1)
Donor +/recipient –	23.9% (11)	30.4% (7)	17.4% (4)
Donor –/recipient +	13.0% (6)	13.0% (3)	13.0% (3)
Unknown	2.2% (1)	0	4.4% (1)
Immunosuppression			
Cyclosporine	75.0% (36)	75.0% (18)	75.0% (18)
Plasmapheresis	32.6% (15)	65.2% (15)	0
Rituximab	32.6% (15)	65.2% (15)	0
Steroids	100% (46)	100% (23)	100% (23)
OKT3	6.5% (3)	12.5% (3)	0
Mycophenolate mofetil	91.3% (42)	87.0% (20)	95.7% (22)
Tacrolimus	56.5% (26)	65.2% (15)	47.4% (11)
Everolimus	32.6% (15)	26.1% (6)	39.1% (9)
Basiliximab	89.1% (41)	82.6% (19)	95.7% (22)
Sandimmune	14.6% (7)	20.8% (5)	8.3% (2)
Daclizumab	4.4% (2)	4.4% (1)	4.4% (1)

AMR, antibody-mediated rejection.

AMR classification in patients after 2013,²³ 4 patients were classified as pAMR(I+), and 4 patients were classified as pAMR2.

Genotype association with AMR

After sequencing all coding regions and the ±10 intronic pair bases in 51 genes related to the complement pathway (Figure S1, available in the online version of this article at www.jhltonline.org), 319 polymorphisms in 50 genes were found (Figure 1A and Table S4, available in the online version of this article at www.jhltonline.org). No SNPs were found in *CD59* gene. The mean coverage over all the genes related to the complement cascade was 72.7-fold ± 2.4 (Figure 1B). To determine the accuracy, specificity, and sensitivity of the NGS protocol, we followed 42 selected amplicons containing at least 1 variant by NGS. From 8,481 readable bases in the Sanger sequencing, we observed 8,445 TN calls and 33 TP calls. No FP calls and 3 FN calls were found, together resulting in a sensitivity of 91.7%, specificity of 100%, and accuracy of 99.7%. After manual inspection of the FN calls that only had been identified by

Sanger, we detected that all FN calls appeared in the *IGHA1* gene in the position chr14:106.173.808. However, in the 3 samples, Integrative Genomics Viewer allowed visualization of the variant in <10% readings. Thus, we postulated that these FN must be related to the quality of the sequence in this position.

A genetic association study was carried out to test for an association between AMR and polymorphisms in the complement cascade genes. First, an analysis with SNPstats was performed. The results showed that, from the 319 SNPs found, 8 variants (rs1048118-*CFP*, rs1800450-*MBL2*, rs11627594-*IGHG2*, rs1407-*IGHA1*, rs1130656-*PLG*, rs1450656-*C7*, rs17611-*C5*, rs25681-*C5*) were associated with AMR in at least 1 of the multiple inheritance models applied. Second, when the association function of R was applied, all 8 SNPs previously identified were significantly associated with AMR. However, when the McNemar chi-square test was done, only 2 SNPs were significantly associated with AMR: (1) the missense variant c.161G>A, p.Gly54Asp in *MBL2* gene, rs1800450 (Table 2), and (2) the synonymous variant c.1284C>T, p.Asn428(p=) in *CFP* gene, rs1048118 (Table 3).

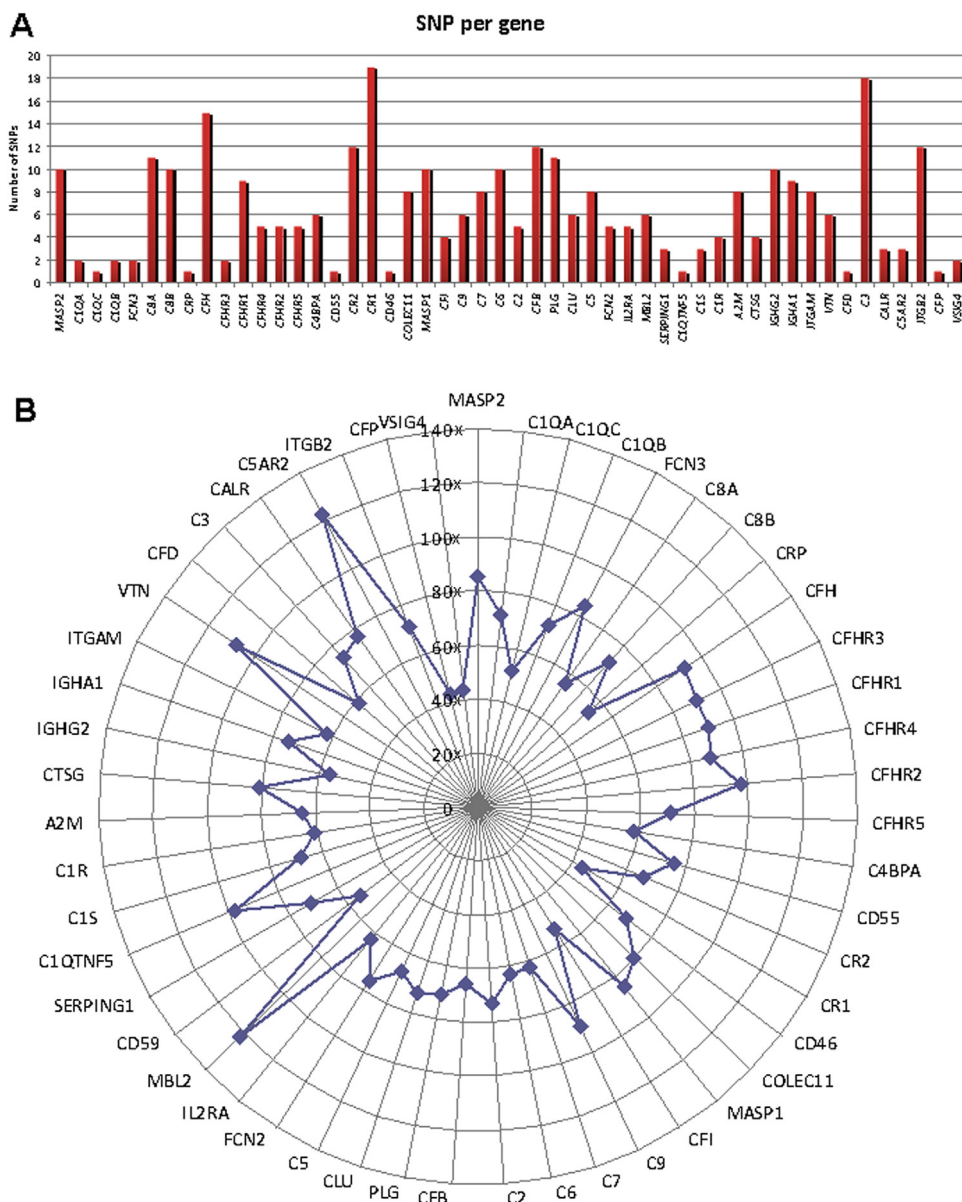


Figure 1 SNP distribution per gene and sequence coverage. (A) Bar graph showing the distribution of SNPs per gene. (B) Graph representing the sequence coverage of the genes related to the complement cascade analyzed in the study. Overall complement genes mean coverage is 72.7 ± 2.4 .

The polymorphism in *MBL2* gene is a guanine-to-adenine substitution on the c.161 nucleotide that produces the substitution of the 54 glycine for aspartic acid (p.Gly54Asp) (Figure 2A, B). The MAF (allele = A) described in dbSNP is 0.1389; however, in our patients the rare allele was significantly more frequent in the control patients than in the patients with AMR (Table 2). Although p.Gly54Asp is a polymorphism, 3 software predictions showed that this variant can present an impact in the function of the protein (Figure 2C). Moreover, in the ClinVar database, this allele is described as a pathogenic allele. The second SNP associated with AMR was presented in the *CFP* gene, which codes for properdin protein. It is a cytosine-to-thymine substitution on the c.1284 nucleotide that does not modify the 428 asparagine amino acid (p.Asn428(p=)) (Figure 3A, B). The MAF (allele = T) described in dbSNP is 0.2287; however, in our patients the

rare allele was significantly more frequent in patients who developed AMR than in control patients (Table 3).

Serum MBL levels in control patients vs patients with AMR correlated with described genotype

The median MBL serum level measured before HT in 4 patients who did not develop AMR and carried the variant p.Gly54Asp was 6.2 ng/ml (IQR 5.1–6.9 ng/ml) (Figure 2D). This value was significantly lower compared with the median MBL serum level measured before transplantation in 5 patients with AMR in whom the analyzed SNP was not present (207.5 ng/ml (IQR 84.8–290.9 ng/ml), $p < 0.01$). Thus, these findings confirm that control patients who carried the SNP rs1800450 present low MBL levels.

Table 2 Statistical Analysis of Variant p.Gly54Asp (rs1800450) in *MBL2* Gene in Control and AMR Groups

rs1800450	Model	Genotype	Control	AMR	OR (95% CI)	p-value	AIC	BIC	
SNPstats	Codominant	G/G	13 (56.5%)	21 (91.3%)	1.00	0.02 ^a	61.7	67.2	
		G/A	9 (39.1%)	2 (8.7%)	0.1 (0.03–0.7)				
		A/A	1 (4.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00–NA)				
	Dominant	G/G	13 (56.5%)	21 (91.3%)	1.00	0.006 ^a	60	63.7	
		G/A-A/A	10 (43.5%)	2 (8.7%)	0.12 (0.02–0.66)				
	Recessive	G/G-G/A	22 (95.7%)	23 (100%)	1.00	0.2	66.4	70	
		A/A	1 (4.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00–NA)				
	Overdominant	G/G-A/A	14 (60.9%)	21 (91.3%)	1.00	0.01 ^a	61.5	65.2	
		G/A	9 (39.1%)	2 (8.7%)	0.2 (0.03–0.8)				
	R (F(x) association)	Codominant	—	—	—	0.1 (0.03–0.7)	0.005 ^a	59.7	63.4
			G/G	13 (56.5%)	21 (91.3%)	1.00			
			G/A	9 (39.1%)	2 (8.7%)	0.1 (0.03–0.7)			
Dominant		G/G	13 (56.5%)	21 (91.3%)	1.00	0.005 ^a	60		
		G/A-A/A	10 (43.5%)	2 (8.7%)	0.1 (0.02–0.7)				
Recessive		G/G-G/A	22 (95.7%)	23 (100%)	1.00	1	66.4		
		A/A	1 (4.3%)	0 (0%)	0.00				
Overdominant		G/G-A/A	14 (60.9%)	21 (91.3%)	1.00	0.01 ^a	61.5		
		G/A	9 (39.1%)	2 (8.7%)	0.2 (0.03–0.8)				
Log-additive		—	—	—	—	0.1 (0.03–0.7)	0.02 ^a	59.7	
		—	—	—	—	0.1 (0.03–0.7)			
McNemar's test		Chi-square = 4.9 with 1 df					0.03 ^a		

AIC, Akaike information criterion; AMR, antibody-mediated rejection; BIC, Bayesian information criterion; CI, confidence interval; OR, odds ratio.
^aStatistical significance.

Serum properdin levels in patients with AMR correlated with described genotype

Median properdin serum levels of 5 patients with AMR who carried the variant rs1048118 was 14.7 µg/ml (IQR

12.0–36.4 µg/ml), whereas median serum levels of 11 control patients without the studied variant was 10.8 µg/ml (IQR 5.9–13.9 µg/ml). Thus, the genotype rs1048118 in patients with AMR was positively and significantly associated with higher concentrations of properdin ($p < 0.05$) (Figure 3C).

Table 3 Statistical Analysis of Variant rs1048118 in *CFP* Gene in Control and AMR Groups

rs1048118	Model	Genotype	Control	AMR	OR (95% CI)	p-value	AIC	BIC	
SNPstats	Codominant	C/C	21 (91.3%)	12 (52.2%)	1.00	0.007 ^a	59.7	65.2	
		C/T	0 (0%)	2 (8.7%)	NA (0.00–NA)				
		T/T	2 (8.7%)	9 (39.1%)	7.9 (1.5–42.6)				
	Dominant	C/C	21 (91.3%)	12 (52.2%)	1.00	0.002 ^a	58.4	62.1	
		C/T-T/T	2 (8.7%)	11 (47.8%)	9.6 (1.8–50.9)				
	Recessive	C/C-C/T	21 (91.3%)	14 (60.9%)	1.00	0.01 ^a	61.5	65.2	
		T/T	2 (8.7%)	9 (39.1%)	6.8 (1.3–36.0)				
	Overdominant	C/C-T/T	23 (100%)	21 (91.3%)	1.00	0.09	64.9	68.6	
		C/T	0 (0%)	2 (8.7%)	NA (0.00–NA)				
	R (F(x) association)	Log-additive	—	—	—	3.1 (1.3–7.4)	0.004 ^a	59.5	63.2
			C/C	21 (91.3%)	12 (52.2%)	1.00			
			C/T	0 (0%)	2 (8.7%)	0.00			
Codominant		C/C	21 (91.3%)	12 (52.2%)	1.00	0.009 ^a	59.7		
		C/T	0 (0%)	2 (8.7%)	0.00				
Dominant		T/T	2 (8.7%)	9 (39.1%)	7.9 (1.5–42.6)	0.002 ^a	58.4		
		C/C	21 (91.3%)	12 (52.2%)	1.00				
Recessive		C/T-T/T	2 (8.7%)	11 (47.8%)	9.6 (1.8–50.9)	0.01 ^a	61.5		
		C/C-C/T	21 (91.3%)	14 (60.9%)	1.00				
Overdominant		T/T	2 (8.7%)	9 (39.1%)	6.8 (1.3–36.0)	0.4889	64.9		
		C/C-T/T	23 (100%)	21 (91.3%)	1.00				
Log-additive		—	—	—	—	3.1 (1.3–7.4)	0.009 ^a	59.5	
	—	—	—	—	3.1 (1.3–7.4)				
McNemar's test	Chi-square equals 5.8 with 1 df					0.02 ^a			

AIC, Akaike information criterion; AMR, antibody-mediated rejection; BIC, Bayesian information criterion; CI, confidence interval; OR, odds ratio.
^aStatistical significance.

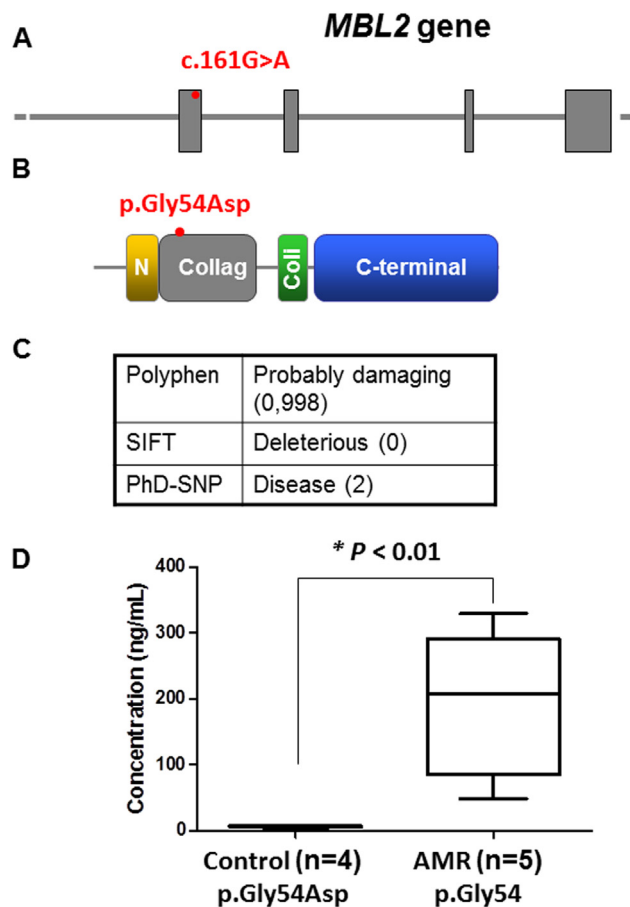


Figure 2 *MBL2* transcript, MBL primary domains, and MBL protein structure. (A) Schematic structure of the human *MBL2* gene showing relative position of the common polymorphism rs1800450 (c.161G>A). (B) Primary protein domains of MBL and the relative location of the common polymorphism rs1800450 (p.Gly54Asp). The N-terminal cysteine-rich domain (21–41) is shown in orange, the collagen-like domain (42–99) is shown in gray, the coiled coil structure (112–130) is shown in green, and the cytoplasmic tail (134–245) is shown in blue. Red spots (A, B) indicate the polymorphism position. (C) In silico predictions of the effect of p.Gly54Asp variant. (D) MBL serum levels according to *MBL2* genotype among 4 control patients who carried the variant p.Gly54Asp and 5 patients with AMR in which the analyzed SNP was not present.

Secondary association between p.Gly54Asp-*MBL2* and p.Asn428(p=)-*CFP* and CAV

Owing to the relationship between CAV and AMR,³ a secondary genetic association study was also carried out to test for an association between CAV and p.Gly54Asp-*MBL2* and p.Asn428(p=)-*CFP* genes, which are associated with AMR. CAV in transplant recipients were classified according to ISHLT categories (CAV1, CAV2, and CAV3).² Using the pathologic CAV classification,²⁶ 8 patients were classified as CAV1, 2 patients were classified as CAV2, and 2 patients were classified as CAV3. The correlation analysis, performed with SNPstats and R software, showed a nonsignificant association for SNP (*MBL2* [$p > 0.99$] and *CFP* [$p > 0.2$]) and CAV.

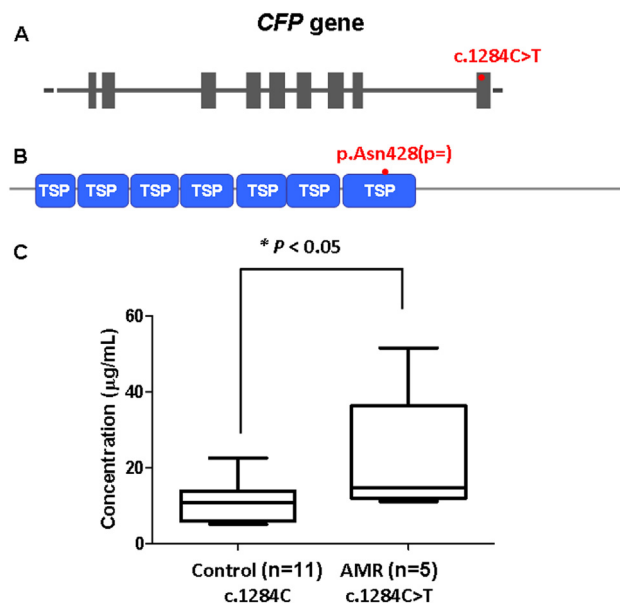


Figure 3 *CFP* transcript and properdin primary domains. (A) Schematic structure of the human *CFP* gene showing relative position of the common polymorphism rs1048118 (c.1284C>T). (B) Primary protein domains of properdin and the relative location of the common polymorphism rs1048118 (p.Asn428(p=)). Seven thrombospondin type-1 (TSP1) domains are shown in blue. Red spots (A, B) indicate the polymorphism position. (C) Properdin serum levels according to *CFP* genotype among 5 patients with AMR who carried the variant and 11 control patients without the studied variant.

Discussion

To our knowledge, the present study represents the largest and the most exhaustive study to date on the effect of variants on genes involved in the complement pathway related to AMR in HT recipients. We have identified 2 SNPs, p.Gly54Asp-*MBL2*, which is associated with absence of AMR, and p.Asn428(p=)-*CFP*, which is associated with the development of AMR. Moreover, the presence of the rare allele p.Gly54Asp-*MBL2* in control patients correlates with an immunodeficiency of MBL, whereas the presence of the rare allele p.Asn428(p=)-*CFP* in patients with AMR correlates with higher levels of properdin protein.

Protective role of p.Gly54Asp in *MBL2* gene from AMR

p.Gly54Asp is the first SNP significantly and negatively associated with AMR. The higher frequency of this variant in control patients correlates to lower concentration of MBL, which could be classified as MBL deficiency (<100 ng/ml). *MBL2* gene codes for MBL protein, which is the initiator of the complement lectin pathway and a key component of the activation of the innate immune system.²⁷ The polymorphism p.Gly54Asp presents an MAF between 0.1220 (dbSNP—1000 Genomes) and 0.1389 (ExAC), and the in silico tools used in this study predict a deleterious effect. It has been previously described that the presence of this

polymorphism in heterozygous individuals produces an MBL deficiency.²⁸ This effect is confirmed with our data showing low concentration (median = 6.2 ng/ml) of MBL in our control patients who carry the variant. However, most of the previous studies associated the presence of p.Gly54Asp with decreased host defense against various infectious agents.²⁷ In the field of transplantation, most studies related to p.Gly54Asp have focused on renal transplant outcomes. The results were inconclusive because some studies failed to find an association between genetic profile of the lectin pathway of complement activation and allograft outcome in renal transplants,^{19,21} whereas others showed a relationship with the incidence of acute rejection and graft outcome.^{29,30}

In HT, 2 studies described MBL deficiency related to development of CAV³¹ and acute graft rejection.³² However, neither study analyzed the presence or absence of the variant p.Gly54Asp in the patients. In this regard, another study highlighted that the relationship between MBL deficiency and disease is complex and depends on different genetic and environmental factors, and that could explain why the data obtained in different studies are sometimes contradictory.³³ The present study correlates the genotype p.Gly54Asp with MBL deficiency and indicates a protective effect from AMR, where the complement pathway plays a key role. However, we did not find significant association between this polymorphism and CAV.

Increased risk of AMR in patients with p.Asn428 (p=) in *CFP* gene

The p.Asn428(p=) in *CFP* gene (rs1048118) is the second SNP significantly and positively associated with AMR. This variant in patients with AMR correlates with higher concentration of properdin than in control patients. The *CFP* gene encodes the properdin protein, also known as factor P. Properdin stabilizes the active enzyme complex of the alternative pathway and is the only known positive regulator of complement activation.^{34,35} It has been shown that properdin deficiency results in an increased risk of infection; infection mortality rates of 33%–75% have been reported.³⁶ It has been hypothesized that higher levels of properdin, such as the levels shown in our AMR cohort, result in a higher capacity to activate the alternative pathway and may therefore represent activation of the alternative pathway in relevant situations, such as cardiovascular events,³⁷ type 2 diabetes mellitus,³⁸ and AMR. Human studies on the alternative pathway factor properdin in relation to transplantation are scarce. The most relevant article in this area focused on cellular rejection.³⁹ The authors showed that ISHLT grade 3A heart biopsy specimens (moderate rejection or 2R) contained significantly more transcripts than grade 0 or 1 biopsy specimens for properdin. Taking all these data together, we can hypothesize that high levels of properdin, owing to the presence of the rs1048118 SNP, could have an important role in the development of AMR or cellular rejection.

Limitations of the study

Limitations of this study include its retrospective single-center design, different criteria of AMR definition, and clinical differences between groups. Moreover, because of the relatively small sample size, we were unable to perform multivariate analysis.

Conclusions

AMR in HT is a complex entity. We have described variants of genes related to the complement system associated with this phenotype. Specifically, the variants *CFP* (p.Asn428 (p=)) and *MBL2* (p.Gly54Asp) are associated with an increase and a reduction of the associated risk of AMR, respectively.

Disclosure statement

None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of the presented manuscript or other conflicts of interest to disclose.

This study received financial support from Instituto de Salud Carlos III (PI13/02174) and it is part of the research activities of the Centro de investigación Biomédica en Red Enfermedades Cardiovasculares. Co-financed with FEDER Funds.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at www.jhltonline.org.

References

1. Tible M, Loupy A, Vernerey D, et al. Pathologic classification of antibody-mediated rejection correlates with donor-specific antibodies and endothelial cell activation. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:769-76.
2. Kobashigawa J, Crespo-Leiro MG, Ensminger SM, et al. Consensus Conference Participants. Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2011;30:252-69.
3. Colvin MM, Cook JL, Chang P, et al. Antibody-mediated rejection in cardiac transplantation: emerging knowledge in diagnosis and management: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2015;131:1608-39.
4. Rodriguez ER, Skojec DV, Tan CD, et al. Antibody-mediated rejection in human cardiac allografts: evaluation of immunoglobulins and complement activation products C4d and C3d as markers. *Am J Transplant* 2005;5:2778-85.
5. Crespo-Leiro MG, Veiga-Barreiro A, Doménech N, et al. Humoral heart rejection (severe allograft dysfunction with no signs of cellular rejection or ischemia): incidence, management, and the value of C4d for diagnosis. *Am J Transplant* 2005;5:2560-4.
6. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* 2005;5:807-17.
7. Baldwin WM 3rd, Kasper EK, Zachary AA, Wasowska BA, Rodriguez ER. Beyond C4d: other complement-related diagnostic approaches to antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2004;4:311-8.
8. Mayilyan KR. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. *Protein Cell* 2012;3:487-96.

9. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001;344:1058-66.
10. Degen SE, Jensenius JC, Thiel S. Disease-causing mutations in genes of the complement system. *Am J Hum Genet* 2011;88:689-705.
11. de Cordoba SR, Tortajada A, Harris CL, Morgan BP. Complement dysregulation and disease: from genes and proteins to diagnostics and drugs. *Immunobiology* 2012;217:1034-46.
12. Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Complement C3 and its polymorphism: biological and clinical consequences. *Pathology* 2014;46:1-10.
13. Jeong JC, Hwang YH, Kim H, et al. Association of complement 5 genetic polymorphism with renal allograft outcomes in Korea. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:3378-85.
14. Günesacar R, Opelz G, Erken E, Döhler B, Ruhstroth A, Süsal C. Complement C5a receptor gene 450 C/T polymorphism in renal transplant recipients: association of the CT genotype with graft outcome. *Tissue Antigens* 2015;85:104-7.
15. Park MS, Kim SK, Lee TW, et al. A promoter polymorphism in the CD46 complement regulatory protein gene is associated with acute renal allograft rejection. *Transplant Proc* 2016;48:809-12.
16. Bresin E, Ruruli E, Caprioli J, et al. European Working Party on Complement Genetics in Renal Diseases. Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:475-86.
17. Le Quintrec M, Zuber J, Moulin B, et al. Complement genes strongly predict recurrence and graft outcome in adult renal transplant recipients with atypical hemolytic and uremic syndrome. *Am J Transplant* 2013;13:663-75.
18. Ranghino A, Tognarelli G, Basso E, et al. A newly identified mutation in the complement factor I gene not associated with early post-transplant recurrence of atypical hemolytic-uremic syndrome: a case report. *Transplant Proc* 2013;45:2785-7.
19. Damman J, Kok JL, Snieder H, et al. Lectin complement pathway gene profile of the donor and recipient does not influence graft outcome after kidney transplantation. *Mol Immunol* 2012;50:1-8.
20. Bazzyar N, Azarpira N, Khatami SR, Galehdari H, Salahi H. Complement C3 gene polymorphism in renal transplantation (an Iranian experience). *Gene* 2012;498:254-8.
21. Ermini L, Weale ME, Brown KM, et al. Systematic assessment of the influence of complement gene polymorphisms on kidney transplant outcome. *Immunobiology* 2016;221:528-34.
22. Girnita DM, Brooks MM, Webber SA, et al. Genetic polymorphisms impact the risk of acute rejection in pediatric heart transplantation: a multi-institutional study. *Transplantation* 2008;85:1632-9.
23. Berry GJ, Burke MM, Andersen C, et al. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:1147-62.
24. Vekemans M, Robinson J, Georgala A, et al. Low mannose-binding lectin concentration is associated with severe infection in patients with hematological cancer who are undergoing chemotherapy. *Clin Infect Dis* 2007;44:1593-601.
25. Linton SM, Morgan BP. Properdin deficiency and meningococcal disease—identifying those most at risk. *Clin Exp Immunol* 1999;118:189-91.
26. Mehra MR, Crespo-Leiro MG, Dipchand A, et al. International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:717-27.
27. Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol Immunol* 2001;38:133-49.
28. Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1992;1:709-15.
29. Berger SP, Roos A, Mallat MJ, et al. Low pretransplantation mannose-binding lectin levels predict superior patient and graft survival after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2416-22.
30. Golshayan D, Wójtowicz A, Bibert S, et al. Swiss Transplant Cohort Study. Polymorphisms in the lectin pathway of complement activation influence the incidence of acute rejection and graft outcome after kidney transplantation. *Kidney Int* 2016;89:927-38.
31. Fiane AE, Ueland T, Simonsen S, et al. Low mannose-binding lectin and increased complement activation correlate to allograft vasculopathy, ischaemia, and rejection after human heart transplantation. *Eur Heart J* 2005;26:1660-5.
32. Fildes JE, Shaw SM, Walker AH, et al. Mannose-binding lectin deficiency offers protection from acute graft rejection after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:1353-6.
33. Pagowska-Klimek I, Cedzyński M. Mannan-binding lectin in cardiovascular disease. *Biomed Res Int* 2014;2014:616817.
34. Cortes C, Ohtola JA, Saggü G, Ferreira VP. Local release of properdin in the cellular microenvironment: role in pattern recognition and amplification of the alternative pathway of complement. *Front Immunol* 2013;3:412.
35. Leshner AM, Nilsson B, Song WC. Properdin in complement activation and tissue injury. *Mol Immunol* 2013;56:191-8.
36. Emonts M, Hazelzet JA, de Groot R, Hermans PW. Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *Lancet Infect Dis* 2003;3:565-77. [Erratum in: *Lancet Infect Dis* 2003;3:815].
37. Hertle E, Arts IC, van der Kallen CJ, et al. The alternative complement pathway is longitudinally associated with adverse cardiovascular outcomes. The CODAM study. *Thromb Haemost* 2016;115:446-57.
38. Somani R, Richardson VR, Standeven KF, Grant PJ, Carter AM. Elevated properdin and enhanced complement activation in first-degree relatives of South Asian subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2012;35:894-9.
39. Keslar K, Rodriguez ER, Tan CD, Starling RC, Heeger PS. Complement gene expression in human cardiac allograft biopsies as a correlate of histologic grade of injury. *Transplantation* 2008;86:1319-21.

29-Jan-2018

Dear Drs. Marrón-Liñares, Grecia; Núñez, Lucía; Crespo-Leiro, María; Álvarez-López, Eloy; Barge-Caballero, Eduardo; Barge-Caballero, Gonzalo; Couto-Mallon, David; Pradas-Irun, Concepcion; Muñiz-García, Javier; Tan, Carmela; Rodriguez, E. Rene; Vazquez-Rodriguez, Jose Manuel; Hermida-Prieto, Manuel:

The reviewers and the Editorial Team have re-evaluated your revised manuscript. We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Circulation Journal.

Manuscript ID: CJ-17-1320.R2

Title: Donors polymorphisms in genes related to B-cell biology associated to antibody-mediated rejection after heart transplantation.

We are currently reviewing it for style and we may be in touch with you again to ask for specific information.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Circulation Journal, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Toyoaki Murohara, M.D.

Editor-in-Chief, Circulation Journal

cj-eic3@j-circ.or.jp

Title: Donors polymorphisms in genes related to B-cell biology associated to antibody-mediated rejection after heart transplantation.

Authors: Grecia M Marrón-Liñares^{a#}, BSc; Lucía Núñez^{a#}, BPharm, PhD; María G Crespo-Leiro^b MD, PhD; Eloy Álvarez-López^a, BSc; Eduardo Barge-Caballero^b, MD, PhD; Gonzalo Barge-Caballero^b, MD; David Couto-Mallón^b, MD; Concepción Pradas-Irun^c, MD; Javier Muñiz^a, MD, PhD; Carmela Tan^d, MD; E. Rene Rodríguez^d, MD; José Manuel Vázquez-Rodríguez^b, MD, PhD; Manuel Hermida-Prieto^{a*} BSc, PhD.

^a Grupo de investigación Cardiovascular. Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas. Universidade da Coruña (UDC). Spain.

^b Servicio de Cardiología. Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas. Universidade da Coruña (UDC). CIBER-CV Spain.

^c Servicio de Cirugía Cardíaca. Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas.

^d Department of Pathology. The Cleveland Clinic. Cleveland, Ohio, USA.

The first two authors contribute equally to this study.

Short title: Variants in donors and AMR.

*** Corresponding author:**

Name: Manuel Hermida-Prieto

Address: Instituto de Investigación Biomédica de la Universidad de A Coruña (INIBIC). Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC)-Universidad de A Coruña. As Xubias de Arriba 84. A Coruña. 15006. Spain.

Phone: 00 34 628 517 328

Fax number: 00 34 981 17 63 98

E-mail: manuelhermidaprieto@gmail.com

*** Word count (Title page, abstract, text, references, table/figure legends):** 5406.

*** Total number of tables and figures:** 8 = 5 tables and 3 figures.

*** Total number of supplementary files:** 3 files.

Disclosures:

The authors declare no conflict interest.

Funding:

This work was supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III (PI13/02174) and it is part of the research activities of the “Centro de investigación Biomédica en Red Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV)”. Co-financed with FEDER Funds.

Abbreviations:

ADA, Adenosine deaminase.

AIC, Akaike information criteria.

AMR, Antibody-mediated rejection.

BIC, Bayesian information criteria.

CI, Confidence intervals.

dbSNP, Single Nucleotide Polymorphism Database.

DNA, Deoxyribonucleic acid.

EMB, Endomyocardial biopsy.

ExAc, The Exome Aggregation Consortium.

FN, False-negative.

FP, False-positive.

HT, Heart transplantation.

ISHLT, International Society for Heart & Lung Transplantation.

MAF, Minor allele frequency.

NGS, Next-generation sequencing.

ORs, Odds ratios.

SNP, Single nucleotide polymorphism.

TN, True-negative.

TP, True-positive.

Abstract:

Background: Heart transplantation (HT) is a well-established life-saving treatment for patients presenting with end-stage cardiac failure. Antibody-mediated rejection (AMR) represents one of the main problems after HT because of its diagnostic complexity and poor evidences supporting treatments. Complement cascade and B-cells play a key role in AMR contributing to graft damage. This project explore the importance of variants in genes related to complement pathway and B-cell biology in HT and AMR in donors and in donors-recipients pairs.

Methods and Results: Genetic variants in 112 genes (51 complement and 61 B-cell biology genes) were analyzed by next-generation sequencing in 28 pairs of donor-recipient, 14 recipients with and 14 recipients without AMR. Statistical analysis was performed with SNPStats, R, and EPIDAT3.1. We have identified one single nucleotide polymorphism (SNP) in donors in genes related with B-cell biology, p.Ile75Val-*IL4RA*, which correlates with the development of AMR. Moreover, in the analysis of discrepancies between recipient-donor genotypes, we have identified another SNP, in this case in *ADA* gene (p.Val178(p=)), which is related with B-cell biology, associated with the absence of AMR.

Conclusions: Donor polymorphisms and discrepancies between recipient-donor in genes related to the biology of B-cells, could have an important role in the development of AMR. Whereas no variants in donor or in donor-recipient pairs in complement pathways seems to have an impact in AMR.

Key words: Donor genotype, B-cell genes, Antibody mediated rejection, Heart transplantation.

Introduction:

Heart transplantation (HT) is a well-established life-saving treatment for patients presenting with end-stage cardiac failure (1). However, antibody-mediated rejection (AMR) represents one of the main problems for clinical management of HT because of its diagnostic complexity and poor evidences supporting treatments (2).

The molecular mechanism involved in AMR is still unknown, however an important role of the complement cascade and B-cells has been established (2,3). On one hand, complement activation triggers a strong inflammatory response, and also generates tissue-bound and soluble fragments that have been related to AMR (4). And on the other hand, B-cells are known to play an important role in immune responses by producing antibodies, presenting antigens to T cells, and secreting cytokines (5,6). In both pathways, there are more than 120 genes encoding proteins (isotypes and subunits, Figure 1) involved in complement activation, immunoglobulin gene rearrangement, maturation, activation and differentiation of B-cells (7,8).

There have been many attempts to associate solid organ allograft outcomes with specific genetic variants (9). However, most studies have been focused on recipient genotypes.

In fact, our group has recently found that polymorphisms in recipients in complement (10) and B-cell pathways (unpublished data) have been associated with AMR. In the last years, there has been an increasing interest in donors genotype associated to allograft outcome (11-15). Focusing on complement and B-cell pathways, there are, at least, 22 studies (Table 1) that analysed the association between donors or donors-recipients pair genotype with different solid organ transplant outcomes (14,16-36).

Sixteen out of the 22 studies revealed an association between single nucleotide polymorphisms and transplant outcomes demonstrated the importance of genetics in this field. However, most of the studies analysed the association between one or two genes

and different outcomes, where the complement and B-cells role is not always clear. Surprisingly, due to the importance of complement pathway or B-cell biology in AMR, none study was conducted to find an association between variants in these pathways in donor and AMR. Moreover, it is important to note that none of the complement studies were performed in HT and only five studies related to B-cell biology (27,29,31-33) were conducted in HT. Giving these findings, we examine the importance of the genes related to complement pathway and B-cell biology in HT and AMR in donors and in donor-recipients pairs.

Methods:

Patients:

14 patients with and 14 patients without AMR after HT and their corresponding donors were selected for the study (total patients included=56). The diagnostic criteria to define the cases of AMR were different according to whether the transplant date was before or after 2013. AMR in patients transplanted before 2013 (n=7) were defined according to the following criteria: a) allograft dysfunction (Left Ventricular Ejection Fraction <30% and/or heart failure), b) no evidence of other causes of allograft dysfunction (acute cellular rejection or cardiac allograft vasculopathy), c) evidence of complement activation on endomyocardial biopsy (EMB) (C4d and/or C3d staining) and/or d) favourable response to therapy addressing AMR (including plasmapheresis, rituximab, steroids boluses, IVIG, etc). AMR in patients transplanted after 2013 (n=7), were classified according to International Society for Heart & Lung Transplantation (ISHLT) categories (37,38), and inclusion criteria is having at least one positive EMB (pAMR1 or higher). Controls did not present any distinguishing signs of AMR (pAMR0), or allograft dysfunction. All samples were from the “Colección de muestras para la

investigación de insuficiencia cardiaca avanzada y trasplante cardiaco” registered in the Instituto de Salud Carlos III (C_0000419, 2012/348). The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of "*Investigación de Galicia*" (Reference: 2014/012).

Genetic analysis with targeted next-generation sequencing:

Genomic Deoxyribonucleic acid (DNA) from the patients with and without AMR and their corresponding donors (n=56) were extracted from clots and blood samples using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc. Hilden, Germany) as previously described (10). All samples were included in the next-generation sequencing (NGS) study using the TruSight One panel according to manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, USA). The TruSight One is a commercial NGS panel for the targeted genomic enrichment of 4.813 genes including 51 genes related with the complement pathway and 61 genes selected related to the biology of B-cells (Table S1_Supplemental material). The samples were paired-end sequenced on a NextSeq500 platform (Illumina) and mapped to the human genome reference sequence (GRCh37, hg19).

Databases and *in silico* tools used:

The potential effect of single nucleotide polymorphisms (SNP) associated with the presence of AMR was predicted using *in silico* tools as previously described (10). Moreover, the minor allele frequency (MAF) of the SNPs described was consulted on two different databases: Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) and/or The Exome Aggregation Consortium (ExAC).

a.) Localization of the variants: Topological placement of the mutations was done using the Swissprot database (<http://ca.expasy.org/uniprot/>) and the bibliography

previously published. The Uniprot database provides generally accepted residue ranges corresponding with each domain region and specialized subregion.

b.) Predicting Damaging Amino Acid Substitution: Five online tools were used to predict the pathogenicity of the missense variants: SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html), Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), PhDSNP (<http://snps.uib.es/phd-snp/phdsnp.html>), SNAP2 (<https://www.rostlab.org/services/snap/>), and MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>).

c.) Predicting Exonic splicing enhancer Variants: The effect of synonymous variants in the splice-enhancing sequences was evaluated using HSF (<http://www.umd.be/HSF/>).

Quality of NGS sequencing:

The mean coverage over all the genes related to the complement pathway or the biology of B-cells was as high as $83,7 \pm 2,5$ -fold. Direct sequencing of 24 different amplicons (Table S1_supplemental material), containing at least one variant by NGS each, was performed to evaluate sensitivity $[TP/(TP+FN)]$, specificity $[TN/(TN+FP)]$, and accuracy $[(TP+TN)/(TP+FP+FN+TN)]$ of the NGS technique. In these formulas, TP means true-positive, TN means true-negative, FP means false-positive, and FN means false-negative. After analyzing all the genes included on the study we obtained a sensitivity of 94,5%, a specificity of 100%, and an accuracy of 99,9%.

Statistical analysis:

For the association of genotypes of donors in genes related to complement and B-cell biology, multiple inheritance models (codominant, dominant, recessive, overdominant,

and log-additive) were applied using SNPStats software and the association function of R software. When these models showed a significant association, Fisher's exact test was performed with R. The strength of association between SNPs and AMR was estimated by the odds ratios (ORs), 95% confidence intervals (CIs), Akaike information criteria (AIC), Bayesian information criteria (BIC) and P-values, using both SNPStats and R software. Moreover, to identify genotypes of recipients-donors pairs in genes related to the complement pathway and B-cell biology potentially associated with the risk of humoral rejection, Fisher's exact test with EPIDAT 3.1 software was performed. Due to the exploratory nature of these analyses, P-values $\leq 0,02$ were required in order to limit the risk of spurious associations.

Results

Baseline clinical characteristics:

Baseline characteristics of donors and recipients included in the study are displayed in Table 2. In both groups of recipients, the most common transplant etiology was cardiomyopathy (71,4%). Using the pathologic AMR classification in patients after 2013 (n=7), based on a scale consisting of immunopathology and histological features (36,37), 4 patients were classified as pAMR(I+) and 3 patients were pAMR2. Table 2 *and Table S2 Supplemental material show* Cytomegalovirus (CMV) serology status, *immunosuppression regime and the AMR treatment.*

Association of genotypes of donors in complement genes with AMR

A total of 51 genes related to the complement were analyzed in 28 donors, 14 from patients with AMR and 14 from patients without AMR (Table S1_Supplemental material). Sequencing of all codifying and adjacent regions, from position -10 to +10, of

the genes select of 28 HT donors revealed 257 SNPs (***Table S3 Supplemental material***). After statistical analysis, none of the donor SNPs in complement pathway was associated to AMR.

Association of genotypes of donors in genes related to B-cell biology with AMR

61 genes related to B-cell biology were screened in 28 donors of 14 AMR patients and 14 controls (Table S1_Supplemental material). 222 SNPs were found in the analyzed genes (***Table S3 Supplemental material***), and one of these variants were significantly associated with AMR (Codominant P=0,01; Dominant P=0,002; Overdominant P=0,01; Log-additive P=0,002; Table 3). This polymorphism in *IL4R α* gene, an adenine to guanine substitution on the c.223 nucleotide that produces the substitution of the 75 lysine for valine (rs1805010; p.Ile75Val (Figure 2)), was more present in AMR donors than in control donors. We used an *in silico* software in order to predict an impact in the function of the protein, and it was predicted to be tolerated by all the bioinformatics tools used (SIFT=tolerated(1), POLYPHEN=benign(0,001) , PhDSNP=Neutral, Mutation Taster=Polymorphism (1,0), SNAP=Neutral (87%), values in parenthesis show the score of each *in silico* tool).

Association of genotypes of recipients-donors in genes related to the complement pathway and B-cell biology with AMR

The genotype of the most relevant genes in the complement pathway and in the biology of B-cell were analysed in 14 pairs of donors and recipients that developed AMR (n=28) and 14 pairs of donors and recipients that did not develop AMR (n=28). After the analysis of 112 genes, 662 SNPs were found in the studied population (***Table S3_Supplemental material***). Our first analysis compared the total number of

discrepancies between donor and recipient in the 662 SNPs found in AMR group and control group. The mean number of discrepancies in the AMR group was $103,6 \pm 3,3$ whereas in the control group was $108,7 \pm 8,4$; which is not statistically significant. Our second analysis compared the frequency of each SNP found in both populations in the donor_recipient pairs. For this purpose, SNPs with minor allele frequency less than $<7\%$, which means the presence of the alternative allele in less than 5 patients out of 56, were left out from further analysis ($n=402$, ***Table S3 Supplemental material***). Thus, we compared the distribution of genotype frequencies in 260 SNPs in donors and recipients as follows: 1.) D+/R+, 2.) D+/R-, 3.) D-/R+, and 4.) D-/R- in AMR and control group, where + means the presence of the variant while - means the reference nucleotide. After this analysis, only one SNP found in *ADA* gene (p.Val178(p=), rs244076) (Figure 3A), related to B-cells biology, presents a statistically significant distribution (Table 4, $P<0.02$). Moreover, the presence of this allele showed an inverse association with the appearance of AMR (D-/R- vs D+/R+ or D+/R- or D-/R+), with an odd ratio of 0.07 (CI 95%: 0.01-0.44, P-value=0.006). This variant could modify the exonic splicing enhancer as it is showed in Table 5, and thus, it could have an impact in protein expression.

Discussion:

This study is the first analysis of the effect of donor and recipient-donor pair variants, in genes involved in the complement pathway and B-cell biology, related to AMR in HT patients. We have identified one SNP, p.Ile75Val in *IL4R α* gene (rs1805010), in donors which correlates with the development of AMR. Moreover, in the analysis of discrepancies between recipient-donor pair, we have identified one SNP, p.Val178(p=) in *ADA* gene (rs244076) related with B-cell biology, associated with the absence of

AMR. Whereas no SNP in genes of the complement pathway, either in donor or in recipient-donor pairs, is associated to AMR. Thus, our data is in concordance with several studies that pointed the importance of donor genotypes in the allograft outcome (14,19-20,31). In fact, Biggins and colleagues (18) had published that *IL28B* and *DDX58* single nucleotide polymorphisms that are favourable when are present in the recipient, are unfavourable when are present in donor graft.

Association of donor variant p.Ile75Val in *IL4R α* gene with AMR:

In the last years, the number of studies focused, not only in recipients, but also in donors genotypes in genes related with complement and B-cell biology that could have an effect in transplant outcome have increased (Table 1). Twelve out of 22 studies reviewed (14,17-19,21,22,27,28,30,31,34,35) showed an influence of donor genotype in five different type of transplantation (Kidney=5, Liver=3, Heart=2, Lung=1, and Hematopoietic stem cell=1) with different end points studied (acute rejection=7, graft survival & outcomes=6, infections=3). The genes associated with transplantation outcomes were different interleukins (*IL4*, *IL6*, *IL10*, and *IL28B*) (18,19,28,30,31,34,39), different proteins of the complement cascade (*C3*, *C5*, *CD59*, and *MBL2*) (14,17,21,22) and two genes related to the activation of B-cells (*CCR5* and *DDX58*) (18,27).

Surprisingly, due to the importance of complement cascade and B-cell biology in AMR, none studied was carried out in the genes of these two pathways in HT with AMR. In this sense, in our patients, no SNPs in the complement cascade genes were associated with AMR. But, although no SNP in the interleukins genes were associated to AMR, the presence of the variant p.Ile75Val in *IL4R α* gene, which codifies for the interleukin-4 receptor subunit alpha (IL-4R α), in donors was associated to AMR.

IL-4R α mediated signaling on B-cells drives the production of type 2 antibody isotypes IgG1 and IgE through STAT6 in response to IL-4 stimulation (40). The extracellular variant p.Ile75Val, or p.Ile50Val relative to the mature peptide, in *IL4R α* gene found in our cohort associated to AMR has been described in several studies related with asthma, type 1 diabetes, hyper-IgE syndrome, and severe eczema (41-43). The p.Ile75Val polymorphism, named as rs180510 by dbSNP, has been described as a ‘gain-of-function’ mutation due to a sustained STAT6 phosphorylation (44). In fact, this variant was associated with an increase in the total serum IgE level in the atopic asthma related with its active role in isotype class-switch recombination (42). Thus, to find a possible role of *IL4R α* p.Ile75Val in AMR, we can speculate, based on all these studies, that donors with the allele Val75, associated to a ‘gain-of-function’, would present more IgE/IgG due to sustained STAT6 phosphorylation. This modification would in turn increase IL4 stimulation that skewing towards Th2 response by increasing B-cell activity (45). Moreover, the major production of IgG by B-cells could increase the activation of the complement pathway that could increase the risk of AMR (46). However, more research must be done to analyse this hypothesis and the role of donor p.Ile75Val variant in AMR.

Role of genotypes discrepancies between recipients-donors in genes related to the complement pathway and B-cell biology with AMR:

Despite several studies have described that discrepancies between recipients-donors genotypes in genes related with complement activation and B-cell biology could affect transplant outcome, the results were inconclusive because of low number of genes analysed and different outcomes studied (Table 1). Our study analysed 112 genes, in a more ambitious strategy, and we focus in AMR due to the importance of complement

cascade and B-cells in this entity. We do not find any SNP in complement genes related to AMR either in donor or in donor-recipient pair, in concordance with previously studies that failed to find an association with different outcomes analysed (acute rejection (20) and graft outcomes (16,23,24,26). Thus, complement genes related to AMR seems to be important in recipients, and not in donors, as we have previously published (10).

On the other hand, all the studies carried out in genes related to B-cells biology in transplantation showed a relationship with different outcomes studied: acute rejection (28,30-32,34-36), graft outcome (27,29,33,34) and infections (18,19). In this study, after analysing more than 316 SNPs in 61 genes we found an association between recipients-donors discrepancies in only one synonymous SNP, p.Val178(p=), in *ADA* gene related with the B-cell biology. Due to the more frequent presence of the alternative allele in the donor-recipient pair in the control group, this polymorphism could have a protective effect from AMR. Although it is a synonymous variant, cumulative evidence shown that silent SNPs can alter the final protein conformation (47,48). In our study the *in silico* analyses performed for p.Val178(p=) showed that it could modify the exonic splicing enhancer and possibly have an impact in protein expression. However, more research must be done to verify this hypothesis.

Most of the studies conducted in B-cell genes in transplantation found an association with interleukin genes or TNF- α (Table 1). Thus, this is the first description of a variant in *ADA* gene related to a transplantation outcome, the AMR. Adenosine deaminase (*ADA*) is a ubiquitously expressed metabolic enzyme that plays an integral role in numerous cellular processes and is encoded by *ADA* gene (49). *ADA* is well known for adenosine deaminase deficiency as a form of severe combined immunodeficiency (*ADA-SCID*) in which there is dysfunction of both B and T lymphocytes with

decreased production of immunoglobulins that results from mutations in the gene encoding ADA (49). Moreover, polymorphisms in *ADA* gene also have been related with other pathologies like autism, asthma, and rheumatoid arthritis (47,50,51). In fact, in the study of Sharma and colleagues (47), a significant association between the variant found, p.Val178(p=), and a poor response to rheumatoid arthritis has been described. Unfortunately they did not describe any mechanism by which the variant could affect the response.

Limitations: The main limitations of the present study are: a) relatively small sample size because of the unicentric study design, the low incidence of AMR and the availability of donor samples, and b) the modification over time in the routine diagnosis of AMR in the EMBs, which in our centre was not included in the routine protocol until 2013. However, the donor SNPs and also the discrepancies between recipients-donors in B-cell genes associated to AMR could introduce a new approach in the knowledge of the AMR and could open a new field of study.

Conclusions: Donor polymorphisms as well as discrepancies between in recipient-donor pairs in B-cell biology genes, could have an important role in the development of AMR. Whereas no variants in donor or in donor-recipient pairs in the complement pathways seems to have an impact in AMR.

Acknowledgments:

We thank Zulaika Grille-Cancela, Paula Blanco-Canosa, Drs. Natalia Suarez-Fuentetaja, and Nieves Domenech-García for their contributions with samples and database records.

And we thank Dr. Maria J Paniagua-Martin for the clinical follow-up of the patients and Jorge Pombo-Otero for the pathological classification of the patients.

References:

1. Tibl M, Loupy A, Vernerey D, Suberbielle C, Beuscart T, Cazes A, et al. Pathologic classification of antibody-mediated rejection correlates with donor-specific antibodies and endothelial cell activation. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32(8): 769 - 776.
2. Colvin MM, Cook JL, Chang P, Francis G, Hsu DT, Kiernan MS, et al. Antibody-mediated rejection in cardiac transplantation: emerging knowledge in diagnosis and management: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2015; 131: 1608 - 1639.
3. Banham GD, Clatworthy MR. B-cell biomarkers in transplantation--from genes to therapy. *Tissue Antigens* 2015; 85: 82- 92.
4. Stites E, Le Quintrec M, Thurman JM. The Complement System and Antibody-Mediated Transplant Rejection. *J Immunol* 2015; 195: 5525 - 5531.
5. Wortel CM, Heidt S. Regulatory B cells: Phenotype, function and role in transplantation. *Transpl Immunol*. 2017. In press. doi: 10.1016/j.trim.2017.02.004.
6. Suzuki JI, Isobe M, Morishita R, Nagai R. Characteristics of chronic rejection in heart transplantation: important elements of pathogenesis and future treatments. *Circ J* 2010; 74: 233 - 239.
7. Mayilyan KR. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. *Protein Cell* 2012; 3: 487 - 496.

8. Pieper K, Grimbacher B and Eible H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 959 - 971.
9. Oetting WS, Guan W, Schladt DP, Leduc RE, Jacobson PA, Matas AJ, et al. Donor polymorphisms of toll-like receptor 4 associated with graft failure in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2012; 18: 1399 - 1405.
10. Marrón-Liñares GM, Núñez L, Crespo-Leiro MG, Barge-Caballero E, Pombo J, Paniagua-Martin MJ, et al. Polymorphisms in genes related to the complement system and antibody mediated cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2017. In press. doi: 10.1016/j.healun.2017.07.006.
11. Dessing MC, Kers J, Damman J, Navis GJ, Florquin S, Leemans JC. Donor and recipient genetic variants in NLRP3 associate with early acute rejection following kidney transplantation. *Sci Rep* 2016; 6: 36315.
12. Mandegary A, Rahmanian-Koshkaki S, Mohammadifar MA, Pourgholi L, Mehdipour M, Etminan A, et al. Investigation of association between donors' and recipients' NADPH oxidase p22(phox) C242T polymorphism and acute rejection, delayed graft function and blood pressure in renal allograft recipients. *Transpl Immunol* 2015; 32: 46 - 50.
13. Hauser IA, Kruck S, Gauer S, Nies AT, Winter S, Bedke J, et al. Human pregnane X receptor genotype of the donor but not of the recipient is a risk factor for delayed graft function after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 91: 905 - 916.
14. Cervera C, Balderramo D, Suárez B, Prieto J, Fuster F, Linares L, et al. Donor mannose-binding lectin gene polymorphisms influence the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 1217 - 1224.

15. Buis CI, van der Steege G, Visser DS, Nolte IM, Hepkema BG, Nijsten M, et al. Heme oxygenase-1 genotype of the donor is associated with graft survival after liver transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 377 - 385.
16. Ermini L, Weale ME, Brown KM, Mesa IR, Howell WM, Vaughan R, et al. Systematic assessment of the influence of complement gene polymorphisms on kidney transplant outcome. *Immunobiology* 2016; 221: 528 - 534.
17. Budding K, van de Graaf EA, Kardol-Hoefnagel T, Broen JC, Kwakkel-van Erp JM, Oudijk EJ, et al. A Promoter Polymorphism in the CD59 Complement Regulatory Protein Gene in Donor Lungs Correlates With a Higher Risk for Chronic Rejection After Lung Transplantation. *Am J Transplant* 2016; 16: 987 - 998.
18. Biggins SW, Trotter J, Gralla J, Burton JR Jr, Bambha KM, Dodge J, et al. Differential effects of donor and recipient IL28B and DDX58 SNPs on severity of HCV after liver transplantation. *J Hepatol* 2013; 58: 969 - 976.
19. Firpi RJ, Dong H, Clark VC, Soldevila-Pico C, Morelli G, Cabrera R, et al. CC genotype donors for the interleukin-28B single nucleotide polymorphism are associated with better outcomes in hepatitis C after liver transplant. *Liver Int* 2013; 33: 72 - 78.
20. Bazayr N, Azarpira N, Khatami SR, Galehdari H, Salahi H. Complement C3 gene polymorphism in renal transplantation (an Iranian experience). *Gene* 2012; 498: 254 - 258.
21. Damman J, Daha MR, Leuvenink HG, van Goor H, Hillebrands JL, Dijk MC, et al. Association of complement C3 gene variants with renal transplant outcome of deceased cardiac dead donor kidneys. *Am J Transplant* 2012; 12: 660 - 668.

22. Jeong JC, Hwang YH, Kim H, Ro H, Park HC, Kim YJ, et al. Association of complement 5 genetic polymorphism with renal allograft outcomes in Korea. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 3378 - 3385.
23. Wahrmann M, Döhler B, Ruhstroth A, Haslacher H, Perkmann T, Exner M, et al. Genotypic diversity of complement component C4 does not predict kidney transplant outcome. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 367 - 376.
24. Dhillon N, Walsh L, Krüger B, Mehrotra A, Ward SC, Godbold J, et al. Complement component C3 allotypes and outcomes in liver transplantation. *Liver Transpl* 2010; 16: 198 - 203.
25. Varaganam M1, Yaqoob MM, Döhler B, Opelz G. C3 polymorphisms and allograft outcome in renal transplantation. *N Engl J Med* 2009; 360: 874 - 880.
26. Brown KM, Kondeatis E, Vaughan RW, Kon SP, Farmer CK, Taylor JD, et al. Influence of donor C3 allotype on late renal-transplantation outcome. *N Engl J Med* 2006; 354: 2014 - 2023.
27. Fildes JE, Walker AH, Howlett R, Bittar MN, Hutchinson IV, Leonard CT, et al. Donor CCR5 Delta32 polymorphism and outcome following cardiac transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 2247 - 2249.
28. Karabon L, Wysoczanska B, Bogunia-Kubik K, Suchnicki K, Lange A. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms of patients and donors of allogeneic sibling hematopoietic stem cell transplants associate with the risk of acute graft-versus-host disease. *Hum Immunol* 2005; 66: 700 - 710.
29. Densem CG, Hutchinson IV, Yonan N, Brooks NH. Donor and recipient-transforming growth factor-beta 1 polymorphism and cardiac transplant-related coronary artery disease. *Transpl Immunol* 2004; 13: 211 - 217.

30. Hoffmann S, Park J, Jacobson LM, Muehrer RJ, Lorentzen D, Kleiner D, et al. Donor genomics influence graft events: the effect of donor polymorphisms on acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2004; 66: 1686 - 1693.
31. Bijlsma FJ, van Kuik J, van Hoffen E, de Jonge N, Tilanus MG, Gmelig-Meyling FH, et al. Acute cardiac transplant rejection is associated with low frequencies of interleukin-4 producing helper T-lymphocytes rather than with interleukin-4 promoter or splice variants. *Hum Immunol* 2002; 63: 317 - 323.
32. Awad MR, Webber S, Boyle G, Sturchio C, Ahmed M, Martell J, et al. The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 625 - 630.
33. Holweg CT, Baan CC, Balk AH, Niesters HG, Maat AP, Mulder PM, et al. The transforming growth factor-beta1 codon 10 gene polymorphism and accelerated graft vascular disease after clinical heart transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 1463 - 1467.
34. Poole KL1, Gibbs PJ, Evans PR, Sadek SA, Howell WM. Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study. *Transpl Immunol* 2001; 8: 259 - 265.
35. Marshall SE1, McLaren AJ, McKinney EF, Bird TG, Haldar NA, Bunce M, et al. Donor cytokine genotype influences the development of acute rejection after renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 469 - 476.
36. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA, et al. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int* 1999; 56: 281 - 288.

37. Kobashigawa J, Crespo-Leiro MG, Ensminger SM, Reichenspurner H, Angelini A, Berry G, et al. Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30: 252 - 269.
38. Berry GJ, Burke MM, Andersen C, Bruneval P, Fedrigo M, Fishbein MC, et al. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32: 1147 - 1162.
39. Marshall SE, Welsh KI. The role of cytokine polymorphisms in rejection after solid organ transplantation. *Genes Immun* 2001; 2: 297 - 303.
40. Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J Exp Med* 1988; 167: 183 - 196.
41. Mirel DB, Valdes AM, Lazzeroni LC, Reynolds RL, Erlich HA, Noble JA. Association of IL4R haplotypes with type 1 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 3336 - 3341.
42. Choi WA, Kang MJ, Kim YJ, Seo JH, Kim HY, Kwon JW, et al. Gene-gene interactions between candidate gene polymorphisms are associated with total IgE levels in Korean children with asthma. *J Asthma* 2012; 49: 243 - 252.
43. Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Enomoto T, et al. Ile50Val variant of IL4RA α upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat Genet* 1998; 19: 119 - 120.
44. Ford AQ, Heller NM, Stephenson L, Boothby MR, Keegan AD. An atopy-associated polymorphism in the ectodomain of the IL-4R(α) chain (V50) regulates the persistence of STAT6 phosphorylation. *J Immunol* 2009; 183: 1607 - 1616.

45. Knutsen AP, Vijay HM, Kariuki B, Santiago LA, Graff R, Wofford JD, et al. Association of IL-4RA single nucleotide polymorphisms, HLA-DR and HLA-DQ in children with Alternaria-sensitive moderate-severe asthma. *Clin Mol Allergy* 2010; 8: 5.
46. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017. In press. doi: 10.2215/CJN.00700117.
47. Sharma S, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Singh P, et al. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19: 823 - 828.
48. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM. Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 9609 - 9612.
49. Whitmore KV, Gaspar HB. Adenosine Deaminase Deficiency - More Than Just an Immunodeficiency. *Front Immunol* 2016; 7: 314.
50. Bottini N, De Luca D, Saccucci P, Fiumara A, Elia M, Porfirio MC, et al. Autism: evidence of association with adenosine deaminase genetic polymorphism. *Neurogenetics* 2001; 3: 111 - 113.
51. Kim SH, Kim YK, Park HW, Kim SH, Kim SH, Ye YM, et al. Adenosine deaminase and adenosine receptor polymorphisms in aspirin-intolerant asthma. *Respir Med* 2009; 103: 356 - 363.

Figure legends

Figure 1: Complement pathway and B-cell development and activation. Summary of the main genes implicated in both pathways.

Figure 2: *IL4R α* transcript, *IL4R α* primary domains, and *IL4R α* protein structure.

A, Schematic representation of the human *IL4R α* gene, where grey boxes represent codifying exons and continuous grey line represents introns. The red spot shows the relative position of the common polymorphism rs1805010 (c.223A>G). **B**, Primary protein domains of *IL4R α* and the relative location of the common polymorphism rs1805010 (p.Ile75Val) (red spot). The Fibronectin type-III domain (FbIII_D: 26-232) is shown in green. **In C**, Crystal structure of *IL4R α* (PDB ID 1IAR). In detail, it is shown the change in the local environment from p.Ile75 (pink) to p.Val75 (yellow).

Figure 3: *ADA* transcript and primary domains. **A**, Schematic structure of the human *ADA* gene and **B**, primary protein domains of *ADA* showing relative position of the common polymorphism rs244076 (c.534A>G, p.Val178(p=)). Red spots indicate the polymorphism position.

