



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Determinación de mutaciones en pacientes con
diagnóstico clínico de Síndrome
Linfoproliferativo Autoinmune**

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A

Giovanna Denisse Flores Mendoza

Asesora: Dra. Gabriela López Herrera

Co-asesora: M. en C. Maritere Dominguez Rojas

Cuautitlán Izcalli, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Determinación de mutaciones en pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune.

Que presenta la pasante: **Giovanna Denisse Flores Mendoza**

Con número de cuenta: **305125136** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Marzo de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
VOCAL	Dr. Andrés Romero Rojas	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
2do. SUPLENTE	M. en C. Tais Nopal Guerrero	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm*

Le dedico este trabajo a mi familia, porque no imagino haber logrado lo que he hecho hasta hoy sin ellos. Son mi ejemplo más grande de lealtad y amor.

AGRADECIMIENTOS

A mi mami por darme más lecciones que nadie, porque siendo tan diferentes me quiere y me acepta igual, por ser una estrella cuyo brillo algún día me gustaría alcanzar.

A mi tío por todos los debates, porque aunque se esté cayendo el mundo sé que puedo contar con él .

A mi tía por cuidarme siempre y enseñarme el valor de la meticulosidad y de hacer las cosas bien.

A mi hermana por todas las charlas académicas que tuvimos de vez en vez y por compartir universos de conejas, llamas y almohadas . . . fuiste mi primer amiga y a la que más quise y quiero.

A mi papi por demostrarme su cariño con paciencia y aceptación, por siempre tener una sonrisa para mi.

A la doctora Gaby, por ser una gran mentora y una excelente persona, se convirtió en mi *role model* en términos académicos y no académicos, gracias por aceptarme como alumna y enseñarme tanto.

A la maestra Maritere por la paciencia y el continuo estímulo para graduarme y porque siempre está buscando darle a sus alumnos lo mejor, es una gran profesora.

A la doctora Laura porque también fue mi profesora a ratos y por aportar la chispa de buen humor al laboratorio.

A la Caroline, por todo el apoyo moral, por todas las carcajadas y pato-aventuras, porque fue un placer haber compartido ese camino juntas.

A Sandra, mi por intentar descifrar el universo *a priori* conmigo, sin las mutuas visitas y constantes pláticas no hubiera sido igual de divertido este año.

A Edgar, por ser un buen vecino de mesa de trabajo y establecer un ambiente de convivencia vecinal ameno, por siempre aportar comentarios interesantes en prácticamente cualquier tema.

A mis compañeros Pamelix, Jess, las Lauras, Elizabeth, Julio y Dany por todas las travesuras y ocurrencias.

Y finalmente aunque no menos importante, al doctor Francisco Espinosa y a la doctora Sara Espinoza por el apoyo recibido para los congresos y por aceptarme en el laboratorio.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. MARCO TEÓRICO	4
A. GENERALIDADES DE LA APOPTOSIS.....	4
A.1. VÍA APOPTÓTICA DE FAS	6
B. GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE	9
B.1. APOPTOSIS EN EL SISTEMA INMUNE.....	16
C. INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS	19
C.1. DEFINICIÓN.....	19
C.2. CLASIFICACIÓN.....	19
C.3. EPIDEMIOLOGÍA	21
D. SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO AUTOINMUNE	22
D.1. DEFINICIÓN.....	22
D.2. HISTORIA.....	23
D.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	23
D.4. DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO	24
D.5. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS INTERNACIONALES	27
D.6. CLASIFICACIÓN DE ALPS BASADA EN EL DEFECTO GENÉTICO PRESENTE	28
III. JUSTIFICACIÓN.....	35
IV. OBJETIVOS.....	36
GENERAL	36
PARTICULARES	36
V. HIPÓTESIS.....	37
VI. METODOLOGÍA.....	38
A. SELECCIÓN DE PACIENTES Y PROCEDIMIENTO GENERAL	38
B. EVALUACIÓN DEL CRITERIO DIAGNÓSTICO DE LAS DOBLE-NEGATIVAS Y DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS.....	38
B.1. DETERMINACIÓN DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS Y DNDS.....	38
B.2. DETERMINACIÓN DE LEUCOCITOS TOTALES	39
B.3. ANÁLISIS DE DATOS	39

C.	TINCIÓN DE FAS	42
C.1.	<i>DETERMINACIÓN DE FAS</i>	42
C.2.	<i>ANÁLISIS DE DATOS</i>	42
D.	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DESTINADAS PARA SECUENCIACIÓN	43
D.1.	<i>PURIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCS)</i>	43
D.2.	<i>ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS T PARA INDUCIR LA EXPRESIÓN DE FASL</i>	43
D.3.	<i>EXTRACCIÓN DE RNA Y CONVERSIÓN A CDNA</i>	43
D.4.	<i>EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO DE SANGRE PERIFÉRICA</i>	45
E.	BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN, FAS Y FASLG	45
E.1.	<i>AMPLIFICACIÓN DE FAS Y FASLG A PARTIR DE CDNA</i>	45
E.2.	<i>AMPLIFICACIÓN DE FAS Y FASLG A PARTIR DE GDNA</i>	47
E.3.	<i>PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR</i>	48
E.4.	<i>CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR</i>	48
E.5.	<i>SECUENCIACIÓN</i>	50
VII.	RESULTADOS	52
A.	RESUMEN CLÍNICO DE LOS PACIENTES ANALIZADOS	52
B.	RESULTADOS DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS Y LAS CÉLULAS DNDS	54
C.	EXPRESIÓN DE FAS	64
D.	RESULTADOS DE PCR	64
E.	RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN	67
VIII.	DISCUSIÓN	70
IX.	CONCLUSIONES	78
X.	REFERENCIAS	79
	GLOSARIO DE TÉRMINOS	89
	ANEXO I : VALORES DE REFERENCIA CONSIDERADOS PARA LAS POBLACIONES Y	
	SUBPOBLACIONES LEUCOCITARIAS	91
	ANEXO II: REACTIVOS UTILIZADOS	92
	KITS Ó REACTIVOS COMERCIALES	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre las células tipo I y II.....	8
Tabla 2. Características distintivas de la inmunidad innata y la adaptativa.....	10
Tabla 3. Categorías principales de la clasificación internacional de inmunodeficiencias primarias.....	20
Tabla 4. Criterios diagnósticos de ALPS.....	27
Tabla 5. Clasificación revisada de ALPS.....	28
Tabla 6. Programa para realizar RT-PCR.....	44
Tabla 7. Primers empleados para amplificar los genes de <i>FAS</i> Y <i>FASLG</i>	46
Tabla 8. Programa empleado para amplificar <i>FAS</i> y <i>FASLG</i> a partir de cDNA.....	46
Tabla 9. Primers empleados para amplificar los genes de <i>FAS</i> y <i>FASLG</i>	47
Tabla 10. Programa para la purificación de los productos de PCR.....	48
Tabla 11. Programa para la amplificación de los productos de clonación.....	50
Tabla 12. Programa para la reacción de secuenciación.....	50
Tabla 13. Resumen de las características clínicas de los pacientes analizados.....	52
Tabla 14. Leucocitos totales en sangre periférica de pacientes y testigos.....	55
Tabla 15. Neutrófilos en sangre periférica de pacientes y testigos.....	56
Tabla 16. Monocitos en sangre periférica de pacientes y testigos.....	57
Tabla 17. Linfocitos totales en sangre periférica de pacientes y testigos.....	58
Tabla 18. Linfocitos B en sangre periférica de pacientes y testigos.....	59
Tabla 19. Células NK en sangre periférica de pacientes y testigos.....	60
Tabla 20. Linfocitos T CD4+ en sangre periférica de pacientes y testigos.....	61
Tabla 21. Linfocitos T CD8+ en sangre periférica de pacientes y testigos.....	62
Tabla 22. Células DNTs en sangre periférica de pacientes y testigos.....	63
Tabla 23. Resultado de la secuenciación de <i>FAS</i> del P1.....	67
Tabla 24. Resultados de secuenciación de <i>FAS</i> y <i>FASLG</i> del P2.....	68
Tabla 25. Resultados de secuenciación de <i>FAS</i> y <i>FASLG</i> del P6.....	69
Tabla 26. Valores de referencia de números absolutos de diferentes poblaciones leucocitarias correspondientes a distintas edades.....	91
Tabla 27. Valores de referencia de subpoblaciones linfocitarias para distintas edades.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los diferentes mecanismos apoptóticos.....	5
Figura 2. Esquema de maduración de los linfocitos T en el timo.....	12
Figura 3. Esquema de la maduración de los linfocitos B.....	14
Figura 4. Selección de regiones y análisis de las células DNTs.....	40
Figura 5. Selección de regiones y análisis de células T CD4+ y CD8+.....	40
Figura 6. Selección de regiones y análisis de células B totales.....	41
Figura 7. Selección de regiones y análisis de células NK.....	41
Figura 8. Selección de regiones para analizar la expresión de Fas	42
Figura 9. Histogramas de frecuencia para la expresión de Fas del P2 y el P6.....	64
Figura 10. Productos de la amplificación por PCR del cDNA de <i>FAS</i> con el par 1 de primers.....	65
Figura 11. Productos de amplificación por PCR del cDNA de <i>FAS</i> del P1 con el par 2 de primers.....	65
Figura 12. Productos de amplificación por PCR del cDNA de <i>FAS</i> del P2 y P6 con el par 2 de primers.....	66
Figura 13. Productos de amplificación por PCR del cDNA de <i>FASLG</i> del P2 y P6.....	66
Figura 14. Productos de amplificación por PCR de colonias obtenidas en el ensayo de clonación.....	66
Figura 15. Productos de amplificación por PCR de <i>FAS</i> a partir de DNA genómico del P1.....	67
Figura 16. Resumen del SNP rs2234978.....	69

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Distribución de los casos registrados que pertenecen a cada grupo de IDPs.	22
Gráfica 2. Leucocitos totales en la sangre de pacientes testigos.....	55
Gráfica 3. Neutrófilos en sangre periférica de pacientes y los testigos.....	56
Gráfica 4. Monocitos en sangre periférica de pacientes y testigos.....	57
Gráfica 5. Linfocitos totales en sangre periférica de pacientes y testigos.....	58
Gráfica 6. Linfocitos B en sangre periférica de pacientes y testigos.....	59
Gráfica 7. Células NK en sangre periférica de pacientes y testigos.....	60
Gráfica 8. Linfocitos T CD4+ en sangre periférica de pacientes y testigos.....	61
Gráfica 9. Linfocitos T CD8+ en sangre periférica de pacientes y testigos.....	62
Gráfica 10. Porcentaje de células DNTs de pacientes y testigos.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ALPS	<i>(Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome)</i> Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune
APC	<i>(Antigen Presenting Cell)</i> Célula Presentadora de Antígeno
APC*	<i>(Allophycocyanin)</i> Alofocianina
BCR	<i>(B-cell receptor)</i> Receptor de células B
BH	Homología de Bcl-2 (<i>Bcl-2 homology</i>)
CAD	<i>(Caspase-Activated DNase)</i> DNasa activada por caspasas
CD	<i>(Cluster of differentiation / designation)</i> Grupo de diferenciación o designación
cDNA	<i>(complementary DNA)</i> DNA complementario
CDR	<i>(Cystein Rich Domain)</i> Dominio rico en Cisteína
cFLIP	<i>(cellular FLICE-like Inhibitory Protein)</i> Proteína Inhibidora celular tipo FLICE
CMV	<i>(Cytomegalovirus)</i> Citomegalovirus
DC	<i>(Dendritic cell)</i> Célula dendrítica
DD	<i>(Death Domain)</i> Dominio de muerte
DED	<i>(Death Effector Domain)</i> Dominio efector de muerte
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DNTs	<i>(Double-negative T cells)</i> Células T doble-negativas
EBV	<i>(Epstein-Barr virus)</i> Virus de Epstein-Barr
ECD	<i>(Extracellular Domain)</i> Dominio extracelular
ECD	<i>(Extracellular domain)</i> Dominio extracelular

FADD	<i>(Fas Associated Death Domain)</i> Dominio de Muerte Asociado a Fas
FITC	<i>(Fluorescein isothiocyanate)</i> Isotiocianato de fluoresceína
gDNA	<i>(genomic DNA)</i> DNA genómico
HIV	<i>(Human immunodeficiency virus)</i> Virus de inmunodeficiencia humana
ICAD	<i>(Inhibitor of Caspase-Activated DNase)</i> Inhibidor de la DNasa activada por caspasas
ICD	<i>(Intracellular domain)</i> Dominio intracelular
IDP	Inmunodeficiencia Primaria
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IVGG	<i>(Intra-venous gammaglobulin)</i> gamaglobulina intravenosa
LAGID	Grupo Latinoamericano de Inmunodeficiencias Primarias (<i>Latin American Group of Primary Immunodeficiencies</i>)
LASID	Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias Primarias (<i>Latin American Society of Primary Immunodeficiencies</i>)
mRNA	<i>(messenger RNA)</i> RNA mensajero
NCBI	<i>(National Center for Biotechnology Information)</i> Centro Nacional para la Información de Biotecnología
NFAT	<i>(Nuclear Factor of Activated T cells)</i> Factor nuclear de células T activadas
NIH	<i>(National Institute(s) of Health)</i> Instituto Nacional de Salud
NK	<i>(Natural Killer)</i> Célula asesina natural
PAMP	<i>(Pathogen Associated Molecular Patterns)</i> Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	<i>(Polymerase Chain Reaction)</i> Reacción en cadena de la polimerasa

PE	<i>(Phycoerythrin)</i> Ficoeritrina
PerCP	<i>(Peridinin-chlorophyll protein)</i> Proteína clorofila peridina
PHA	<i>(Phytohemagglutinin)</i> Fitohemaglutinina
PLAD	<i>(Pre-Ligand Assembly Domain)</i> Dominio de asociación previa al ligando
PMN	Polimorfonucleares
SCID	<i>(Severe Combined Immunodeficiency)</i> Inmunodeficiencia Combinada Severa
sFasL	Ligando de Fas soluble
SLE	<i>(Systemic Lupus Erythematosus)</i> Lupus Eritematoso Sistémico
SNP	<i>(Single Nucleotide Polymorphism)</i> Polimorfismo de Nucleótido Simple
TCR	<i>(T-cell receptor)</i> Receptor de células T
TNF	<i>(Tumor Necrosis Factor)</i> Factor de Necrosis Tumoral
TRAIL	<i>(TNF related apoptosis inducing ligand receptor)</i> Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
TRAILR	<i>(TNF related apoptosis inducing ligand receptor)</i> Receptor del ligando-inductor de apoptosis relacionado con TNF
SCF	<i>(Stem Cell Factor)</i> Factor de Células Troncales

RESUMEN

El Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune es una inmunodeficiencia primaria sobre la cual se desconocen muchos aspectos, entre los que se encuentran ciertos datos epidemiológicos y buena parte de la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, se han establecido tres defectos genéticos asociados directamente a ésta que son mutaciones en *FAS*, *FASLG* o *CASP-10*, así como criterios internacionales para el diagnóstico de la enfermedad. En el presente trabajo se hace uso de dichos criterios, particularmente el de la elevación de las células T doble-negativas, para seleccionar pacientes con diagnóstico de probable enfermedad linfoproliferativa con el objetivo de buscar mutaciones asociadas con el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune y así caracterizar mejor a los pacientes mexicanos con esta enfermedad. Adicionalmente, una vez establecido el defecto, se comenzaría la búsqueda de portadores en la familia del paciente si ésta así lo permitía para posteriormente dar asesoría genética a la misma. Sin embargo, ninguna mutación fue encontrada en dos de los genes con mayor incidencia reportada, *FAS* y *FASLG*, esto no descarta, empero, una mutación somática en *FAS* o una mutación en *CASP-10* por lo que el proceso diagnóstico aun está incompleto. Finalmente, se propone la implementación de un ensayo de apoptosis mediado por Fas como un tamizaje que nos indique los defectos genéticos probables en el paciente (*FAS* de línea germinal o somático, *CASP-10* o *FASLG*) y empezar la búsqueda correspondiente. Así mismo, evaluar las DNTs de los padres de los pacientes también sería una manera de localizar al probable portador del defecto en los casos de mutaciones de línea germinal, sin embargo, no se sugiere como sustituto de la búsqueda directa por medio de técnicas de biología molecular, sino simplemente como una herramienta para dirigir la búsqueda.

I. INTRODUCCIÓN

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) son un grupo heterogéneo de desórdenes hereditarios del sistema inmune que representan un reto en su diagnóstico y tratamiento debido al traslape de los síntomas y las similitudes entre las diversas enfermedades [1]. La IDP en la que se centra el presente trabajo es el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune o ALPS por sus siglas en inglés (*Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome*). Esta enfermedad consiste en un desorden hereditario de la homeostasis linfocitaria relacionado con defectos en la apoptosis que típicamente involucra genes en la vía de Fas. A pesar de que se han descrito una cantidad considerable de aspectos acerca de la enfermedad gracias a modelos animales y a los propios pacientes, la caracterización completa aun se encuentra distante, empezando por el hecho de que existe un grupo de pacientes diagnosticados con ALPS de los cuales se desconoce el defecto genético, pues no se trata de los clásicos defectos en *FAS*, *FASLG* o *CASP-10*.

Los intensos estudios a nivel mundial que han contribuido al entendimiento de los defectos inmunitarios y los genes involucrados en las IDPs también se han manifestado en avances significativos sobre el diagnóstico y manejo de estas condiciones [2], sin embargo, en los países en desarrollo existen recursos limitados para su diagnóstico, además de que muchos profesionales de la salud de primer contacto no han sido correctamente orientados para identificar posibles casos de IDPs, lo que complica bastante no sólo la situación del paciente sino también la obtención de datos epidemiológicos de la población en general de una determinada región que puedan eventualmente derivar en la implementación de programas de salud.

En México, la baja prevalencia aparente de estas enfermedades se debe precisamente al subdiagnóstico por médicos poco familiarizados con ellas y a la inaccesibilidad de los estudios necesarios para el diagnóstico en la mayor parte de los hospitales [3].

Sin embargo, recientemente ha ido aumentando la difusión sobre las IDPs y por lo tanto ha ido creciendo el número de médicos e instituciones de salud capaces de identificarlas y canalizar a los pacientes con sospecha clínica a centros especializados para su diagnóstico y tratamiento. En este sentido, la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias (UIID) del Instituto Nacional de Pediatría funciona como sitio a nivel nacional de referencia para el diagnóstico de las mismas, cuya misión es ofrecer un diagnóstico oportuno, preciso y de calidad a pacientes con IDPs a través de la investigación básica, clínica y epidemiológica así como formar recursos humanos de alta especialidad y la difusión del conocimiento sobre este grupo de enfermedades a nivel nacional.

En consecuencia, sus aportaciones al registro nacional de IDPs son bastante significativas y esto suma importancia a la búsqueda de mutaciones en los pacientes que ahí reciben. En el caso particular de ALPS, que no es una de las IDPs más frecuentes, no se cuenta con un registro de pacientes mexicanos con defectos genéticos identificados, por lo que el presente trabajo pretende contribuir a la construcción de un registro de los defectos genéticos en pacientes mexicanos con ALPS.

II. MARCO TEÓRICO

A. Generalidades de la apoptosis

Desde las primeras descripciones sobre la muerte celular programada a mediados de los 60s, se fueron realizando varios intentos para clasificar a las diversas subrutinas de muerte celular basándose en las características morfológicas observadas. Así, el término apoptosis fue usado por primera vez en un documento ahora clásico de Kerr, Wyllie y Currie publicado en 1972 [4] para describir una forma de muerte celular morfológicamente distintiva. Mientras que en 1973, Schweichel y Merkel propusieron una clasificación de varias modalidades de muerte celular que incluían la muerte celular tipo I asociada con heterofagia (actualmente conocida como apoptosis), muerte celular tipo II asociada con autofagia y muerte celular tipo III que no estaba asociada a ningún tipo de digestión (ahora conocida como necrosis) [5].

Los primeros registros de muerte celular necesariamente dependieron de las características morfológicas, sin embargo, el constante aumento de los recursos tecnológicos disponibles fue permitiendo caracterizar el proceso de muerte celular y se demostró la heterogeneidad funcional y bioquímica de los morfotipos de muerte celular aparentemente similares. Así, desde el punto de vista morfológico, la apoptosis se acompaña de redondeamiento celular, retracción de pseudopodos, reducción de volumen celular (picnosis), condensación de la cromatina, fragmentación nuclear (cariorraxis), clásicamente poca o ninguna modificación ultraestructural de los organelos celulares, abultamiento de la membrana celular o blebbing (con mantenimiento de la integridad hasta las fases finales del proceso) y engullimiento por los fagocitos residentes (*in vivo*), por lo que se recomienda usar el término apoptosis

exclusivamente a los eventos de muerte celular que ocurren mientras se manifiestan varias de estas características morfológicas.

Por otro lado, se reconocen varios subtipos de apoptosis que aunque son morfológicamente similares, pueden ser iniciados por diferentes rutas bioquímicas. Sobre esto, el Comité de Nomenclatura de muerte celular del año 2012 divide a la apoptosis como sigue [5]:

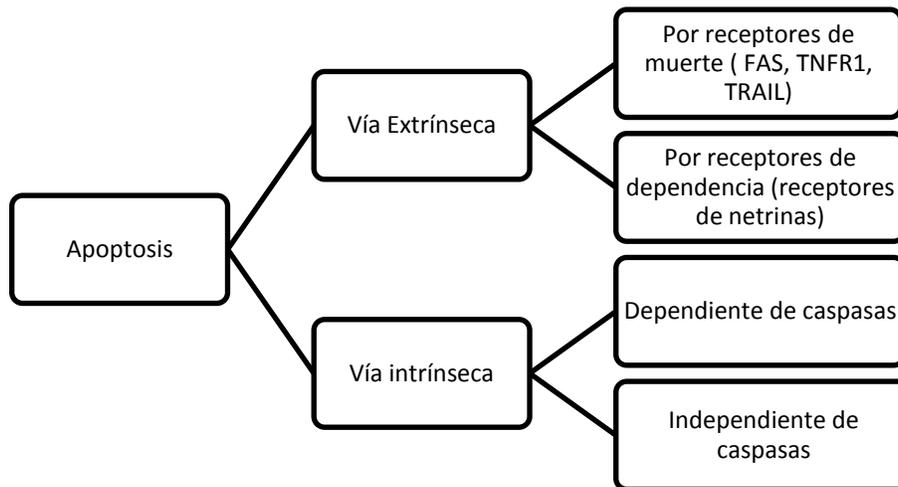


Figura 1. Clasificación de los diferentes mecanismos apoptóticos
Modificado de Galluzi, et al *Cell Death and Differentiation*. **19:** 107-120 (2012)

En el presente trabajo únicamente se revisará la modalidad de apoptosis vía extrínseca mediada por receptores de muerte (DR) y más específicamente mediada por Fas, también conocido como antígeno de apoptosis-1 (APO-1, APT; TNSF6R ó CD95).

A.1. Vía apoptótica de Fas

De modo general la vía consiste en la unión de Fas con su ligando (FasL) que ocasiona el reclutamiento de ciertas proteínas para la formación de un complejo supramolecular llamado DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) donde las caspasas iniciadoras -8 y -10 se activan para posteriormente inducir de manera directa que las caspasas efectoras inicien la fase ejecutora de la apoptosis en una forma independiente de la mitocondria; o bien se activen mediadores de la vía mitocondrial de la apoptosis, definiéndose así dos tipos de células (tipo I y tipo II) según el programa que siga la célula en cuestión, como se explicará más adelante.

Los primeros pasos en la vía mediada por Fas no se han caracterizado claramente [6], sin embargo, se sabe que uno de los eventos iniciales en la vía es la homotrimerización espontánea de moléculas de Fas. Esto ocurre debido a la autoasociación de un dominio extracelular llamado PLAD (*Pre-Ligand Assembly Domain*) [5,7]. La unión de Fas con su ligando ocasiona diversos eventos, tales como la estabilización de dichos trímeros, la localización de Fas en balsas lipídicas debido a una palmitoilación en la Cisteína 199 [8], y la inducción de un cambio conformacional que permite el reclutamiento de un complejo multiproteico dinámico por medio del dominio de muerte ó DD (*Death Domain*). El DD comprende una secuencia conservada de aproximadamente 80 aminoácidos ubicada en el extremo carboxilo-terminal de Fas que comparten todos los receptores de muerte ó DR (*Death Receptors*) y algunas proteínas adaptadoras. El complejo supramolecular resultante llamado DISC, constituye una plataforma que regula la activación de la caspasa 8 ó 10 [5].

De manera simple se maneja que el DISC consiste en receptores de Fas oligomerizados con moléculas adaptadoras FADD (*Fas- Associated Protein with a Death Domain*) unidas, que a su vez ensamblan otros elementos como las procaspasas-8 y -10, y proteínas reguladoras tales como las distintas isoformas de cFLIP (*cellular FLICE-like Inhibitory Protein*). Las interacciones entre estos componentes del DISC están basados en contactos homotípicos: el DD de Fas interactúa con el DD de FADD mientras que el dominio efector de muerte ó DED (*Death Effector Domain*) de FADD lo hace con los DEDs en tandem que se encuentran

en el N-terminal de la pro-caspasa 8, 10 y el cFLIP [6]. Como ya se mencionó, la formación del DISC es un punto de control que puede determinar si la célula ejecutará su programa apoptótico o no, pues algunos de los elementos (por ejemplo cFLIP), pueden actuar como inhibidores de la apoptosis [9].

Brevemente, cFLIP es una proteína muy importante para la vía de Fas debido a su papel en la regulación de la apoptosis, aunque no es la única vía mediada por Fas en la que participa. Paradójicamente también tiene un lugar junto con la caspasa-8 en la señalización para la proliferación y supervivencia de ciertas células debida a la estimulación de Fas, sin embargo, este tema no se tratará en el presente trabajo. Respecto a su papel en la apoptosis, baste decir que la unión al DISC de la isoforma corta (cFLIP_s) siempre deriva en inhibición mientras que la unión de la isoforma larga (cFLIP_L) tiene papel dual [9,11] dependiendo de la estequiometría en la que se encuentre pues es pro-apoptótico sólo cuando su expresión es moderada y además hay una fuerte estimulación del receptor (Fas) o también cuando se encuentra en presencia de altas concentraciones de cFLIP_s [12].

Otro factor importante para el destino de la vía de Fas tiene que ver con su ligando. Se ha demostrado que el FasL unido a membrana es esencial para la actividad citotóxica, mientras que el CD95L soluble promueve vías no apoptóticas [13].

En un escenario en el que no exista inhibición a este nivel, la procaspasa-8 y -10 son activadas como resultado de la formación del DISC, y como consecuencia da inicio el programa de apoptosis. Después de este punto, se puede observar una divergencia en la vía apoptótica mediada por Fas, con lo que se han establecido dos tipos de células y vías de señalización [6]. En la **tabla 1** se listan algunas diferencias entre estos tipos.

Tabla 1. Diferencias entre las células tipo I y II

CÉLULAS TIPO I	CÉLULAS TIPO II
<ul style="list-style-type: none"> • Se liberan grandes cantidades de caspasa-8 del DISC. Estas cantidades son suficientes para cortar y activar directamente a las caspasas efectoras como la -3 y la -7. Lo anterior debido a un más eficiente reclutamiento de FADD por el DD de CD95 [14]. • La permeabilización de la membrana externa de la mitocondria y la liberación de factores apoptóticos mitocondriales pueden ocurrir en estas células pero no son indispensables para la ejecución de la apoptosis iniciada por la vía externa[5]. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hay una menor formación de DISC y por tanto menores niveles de caspasa-8 [6]. Esta cantidad es insuficiente para procesar a la caspasa-3 , sin embargo, es suficiente para cortar a la proteína de dominio BH3 único (BH3-only protein), Bid [14,15] resultando en la generación de un fragmento permeabilizador de la mitocondria conocido como tBid (por <i>truncated Bid</i>) [5] que induce la liberación de factores mitocondriales que finalmente aumentan la señal apoptótica [14].

Todas las vías de señalización apoptóticas convergen en una maquinaria común de destrucción celular orquestada por las caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y -7) que desmantela las diversas estructuras celulares a través del corte sobre sus sustratos proteicos. Colectivamente estos eventos proteolíticos producen los cambios morfológicos celulares característicos de la apoptosis y algunos ejemplos se citan a continuación: empezando por los componentes del citoesqueleto, las caspasas una vez activadas cortan a la mayoría de éstos lo que probablemente causa el redondeamiento y el fenómeno de *blebbing*. Por otro lado, la fragmentación nuclear recae en la desintegración de la lámina nuclear que es iniciada por las caspasas efectoras al cortar a las láminas A, B, y C lo que debilita su estructura permitiendo dicha fragmentación. Las caspasas también tienen como blancos a proteínas encargadas de la homeostasis dentro de la célula como algunas proteínas que actúan en la transcripción por ejemplo: el factor nuclear de células T activadas o NFAT (*Nuclear Factor of activated T cells*) y el factor nuclear-κB o NFκB (*Nuclear*

Factor-κB); o en la traducción como los factores de iniciación eIF2a, eIF3 y eIF4. La gran mayoría de los sustratos de las caspasas efectoras pierden su actividad al ser procesados por estas, sin embargo, unos pocos la ganan a través de activación proteolítica, un ejemplo de esto es el corte sobre el inhibidor de la DNasa activada por caspasas o ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNase*) que permite que la CAD (*caspase-activated DNase*) pueda entonces catalizar la ruptura inter-nucleosomal [16].

La ingestión por fagocitosis de las células apoptóticas es el último componente de la apoptosis. La asimetría de los fosfolípidos y la externalización de la fosfatidilserina es el evento distintivo de esta fase [17].

B. Generalidades del Sistema Inmune

El sistema inmune es el conjunto de células y moléculas que actuando conjunta y coordinadamente defienden al organismo de agresiones externas causadas por microorganismos y las internas causadas por células o sustancias nocivas originadas por envejecimiento, traumatismos, degeneración maligna o procesos metabólicos [18].

La protección que confiere el sistema inmune puede ser lograda debido al cumplimiento de cuatro puntos principales. El primero es el llamado "reconocimiento inmunológico" que es llevado a cabo tanto por las células de la inmunidad innata, que proveen una respuesta inmediata y por los linfocitos del sistema inmune adaptativo como se verá más adelante. El segundo punto lo comprenden las funciones inmunes efectoras que son llevadas a cabo por elementos tales como el sistema del complemento, anticuerpos, y las capacidades destructivas de los linfocitos y los demás leucocitos. El tercer punto se trata de la regulación inmune o la habilidad del sistema inmune para autorregularse de tal manera que no produzca daño al propio organismo. Las fallas en dicha regulación conducen a alergias y a enfermedades autoinmunes. El cuarto punto es una característica particular del sistema inmune adaptativo y es la habilidad de generar memoria inmunológica, lo que implica que habiéndose expuesto a un antígeno previamente, un individuo puede efectuar una

respuesta inmediata y con más fuerza en subsecuentes exposiciones al mismo antígeno [19].

Aunque se hace referencia al sistema inmune en general, en vertebrados se suele dividir en "dos sistemas inmunes" o dos ramas de la inmunidad debido a sus características distintivas: el de la inmunidad innata y el de la inmunidad adaptativa, sin embargo, ambos colaboran para proteger y mantener la homeostasis del cuerpo [20]. En la **tabla 2** se resumen las características distintivas de la inmunidad innata y la adaptativa.

Tabla 2. Características distintivas de la inmunidad innata y la adaptativa

	Inmunidad Innata	Inmunidad Adaptativa
Receptores	Invariantes	Variables
Distribución	No clonal	Clonal
Memoria	No	Sí
Especificidad	Limitada y baja	Altamente diversa; mejora en el transcurso de la respuesta inmune
Cinética de respuesta	Rápida	Retardada
Principales componentes	Barreras, fagocitos, moléculas de reconocimiento de patrones	Linfocitos, receptores antígeno-específicos, anticuerpos

Modificado de "Kuby Immunology" sexta edición (2007) [20], y de "Innate versus Adaptive Immunity: A Paradigm Past Its Prime?" [21]

El sistema innato es ampliamente reconocido por usar un número reducido de receptores codificados de línea germinal que reconocen un conjunto limitado de antígenos conservados. Este sistema responde a los antígenos rápidamente y no genera memoria [21].

Entre los componentes de la inmunidad innata están las barreras físicas (piel, mucosas), diversas células (PMN, Macrófagos, NKs), factores solubles (lisozima, complemento, ácidos grasos) y una variedad de moléculas que la complementan (receptores de PAMPs, colectinas, citocinas) [18]. En contraste, la inmunidad adaptativa tiene un vasto repertorio de receptores variables. Este sistema responde con una cinética relativamente retardada pero posee una respuesta de memoria efectiva [21].

El sistema inmune adaptativo consiste en linfocitos y sus productos. Emplea como sistema de reconocimiento a un repertorio amplio y variado de receptores antigénicos distribuidos clonalmente en linfocitos T y B, lo que quiere decir que cada clona T o B reconocerá a un único dominio o epítipo antigénico a través de su receptor, llamado BCR para linfocitos B y TCR para linfocitos T. El BCR está formado por una molécula de inmunoglobulina insertada en la membrana plasmática (mlg) junto con otras proteínas transmembranales de señalización llamadas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$. El TCR, por otro lado consiste en un heterodímero de una cadena α (llamada $TCR\alpha$) y una cadena β (llamada $TCR\beta$), aunque también existe un número reducido de células que portan un TCR diferente que consta de una cadena γ y una δ . Al igual que el BCR, el TCR se encuentra en complejo con otras proteínas transmembranales (CD3, CD4/CD8) que le permiten transducir señales en respuesta al encuentro con el antígeno para el que es específico. La existencia de centenares de millares de clones diferentes brinda un repertorio adecuado para el reconocimiento de diferentes antígenos. Este amplísimo repertorio linfocitario se desarrolla durante un proceso denominado ontogenia que transcurre en los llamados órganos linfoides primarios que para los linfocitos T es en el timo y para los linfocitos B en la médula ósea y en el bazo [18]. El desarrollo de los linfocitos T es paralelo al desarrollo de los linfocitos B en varias maneras, incluyendo el re-arreglo ordenado y escalonado de sus receptores de reconocimiento de antígeno, las pruebas secuenciales para que el re-arreglo génico sea exitoso y la formación eventual de un receptor antigénico completo y funcional [19].

Los linfocitos T se desarrollan a partir de progenitores hematopoyéticos pluripotenciales de la médula ósea que viajan al timo donde pasan a través de una serie de fases hasta llegar a ser linfocitos T maduros. Cuando estas células entran al timo, carecen de las moléculas de superficie características de los linfocitos T, pero debido a las interacciones con las células estromales de dicho órgano, se inicia la fase de diferenciación hacia el linaje de células T que las dota de ciertos marcadores de superficie propios de dicho linaje, sin embargo, aun no expresan ninguno de los 3 marcadores que definen a los linfocitos T maduros: CD3, CD4 o CD8. Debido a la ausencia de CD4 y CD8, a éstas células se les conoce como timocitos doble negativos (DN). Los timocitos DN se subdividen en 4 (ver **Figura 2**) de acuerdo a su

diferente expresión de las siguientes moléculas: CD44 (que es una molécula de adhesión), CD25 (la cadena α del receptor de la IL-2) y Kit (el receptor del factor de células madre ó SCF por *Stem Cell Factor*, que estimula la proliferación de células troncales)[19].

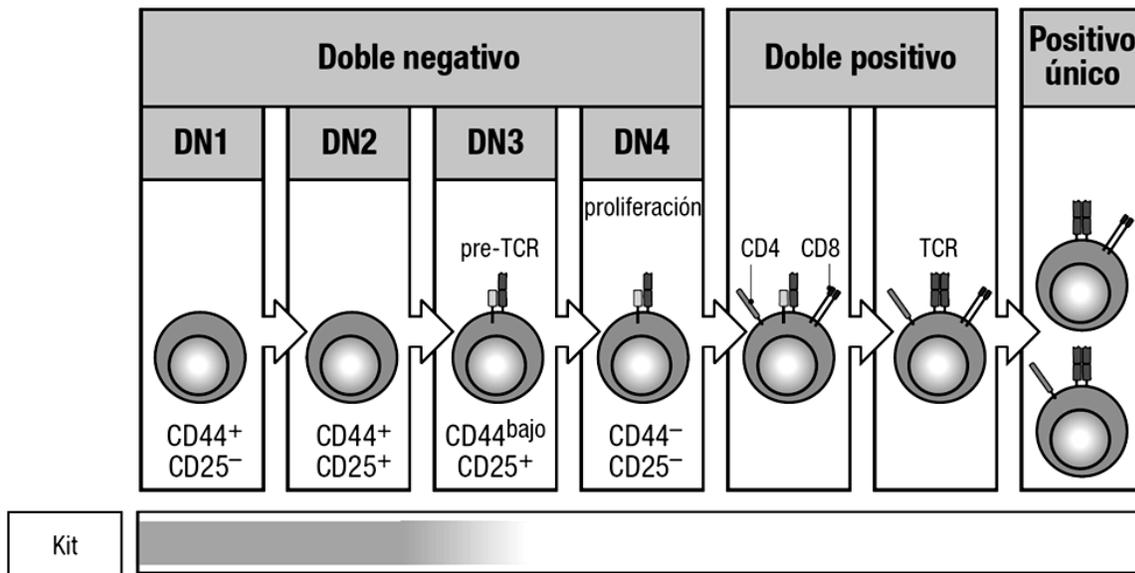


Figura 2. Esquema de maduración de los Linfocitos T en el timo.

Modificado de *Janeway's Immunobiology*. Séptima edición (2008) [19].

Cuando los linfocitos están en el estadio DN1, los genes que codifican para las dos cadenas del TCR están en la configuración de línea germinal y es hasta DN2 cuando comienzan los re-arreglos de la cadena β que continúan en el DN3. Aquellos timocitos que no pudieron re-arreglar exitosamente su cadena β se quedan en la etapa DN3 y mueren en breve. Durante DN3, los timocitos expresan la cadena β junto con una cadena α provisional del pre-receptor de células T, llamada pT α , que permite el ensamblado del pre-receptor de células T. Este pre-receptor es expresado junto con moléculas de CD3 lo que produce la proliferación durante el estadio DN4 junto con la suspensión de los re-arreglos en el gen de la cadena β y la posterior expresión de CD4 y CD8. Cuando los timocitos expresan CD4 y CD8 se les denomina doble-positivos (DP) y es en esta etapa en la que el gen de la cadena α se re-arregla para expresar ya el TCR $\alpha\beta$ definitivo. Los TCR de estos DP son puestos a prueba para comprobar su utilidad eligiendo sólo los que son capaces de reconocer

antígenos presentados por moléculas del MHC (selección positiva) y eliminando aquellos con una fuerte afinidad hacia los antígenos propios (selección negativa) para evitar que salgan a circulación, sin embargo, no es un proceso infalible y debido a esto se cuenta con mecanismos de deleción clonal y tolerancia en la periferia. Aquellas células que sobrevivieron a estos procesos se convierten en positivas simples o únicos, expresando sólo CD4 o CD8 [19].

Los linfocitos B provienen del mismo progenitor que los linfocitos T, sin embargo en la médula ósea dichos precursores reciben señales para su diferenciación a células B. La célula más temprana comprometida en el desarrollo del linaje de B es la célula pro-B y a partir de esta etapa comienza el re-arreglo del gen para la inmunoglobulina. El orden de las etapas del desarrollo de los linfocitos B son: la célula pro-B temprana, la célula pro-B tardía, célula pre-B grande, célula pre-B pequeña y célula B madura (**figura 3**). El primero de los loci en sufrir re-arreglos es el de la cadena pesada de la inmunoglobulina. La célula pro-B debe poner a prueba dicho re-arreglo para asegurar que el producto proteico sea funcional y esto lo hace incorporando esta cadena pesada a dos cadenas invariantes sustitutas que tienen semejanza con la cadena ligera para formar lo que se conoce como el pre-BCR. Este pre-BCR participa en la señalización que le indica a la célula pro-B que se ha efectuado un re-arreglo productivo y es entonces cuando se da la transición a célula pre-B, que además va acompañada de varias rondas de división celular. Las células pre-B grandes dan origen a varias células pre-B pequeñas con el mismo re-arreglo de la cadena pesada, sin embargo, cada célula pre-B pequeña puede hacer un diferente arreglo de los loci de la cadena ligera contribuyendo así a la diversidad de la especificidad antigénica. Una vez completado el re-arreglo, la cadena ligera se empareja con la cadena pesada μ y se asocian con las moléculas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ para formar un complejo de BCR funcional y entonces la célula pre-B se convierte en un linfocito B inmaduro. En este punto el receptor es puesto a prueba sobre su reactividad con antígenos propios de un modo análogo al de los linfocitos T ejerciendo selección positiva y selección negativa. A los linfocitos B inmaduros que no tienen una fuerte reactividad con los antígenos propios se les permite madurar y abandonar la médula ósea para incorporarse al torrente sanguíneo y ser llevados al bazo. Los linfocitos B

inmaduros que reconocen con alta afinidad antígenos propios pueden tener 3 destinos posibles: muerte por apoptosis, producción de un nuevo receptor por medio de un proceso de edición y la ignorancia inmunológica que significa que el receptor no se activa ya sea porque está secuestrado su antígeno, es decir fuera del alcance del receptor o se encuentra a muy baja concentración. Las células resultantes en este último caso pueden ser activadas bajo ciertas condiciones tales como inflamación o cuando los auto-antígenos alcanzan niveles inusualmente elevados [19].

Los linfocitos B inmaduros también son conocidos como células transicionales (T1 y T2) [22]. Las células T1 son las que migran de la médula ósea hacia el bazo y son extremadamente susceptibles a la selección negativa. Al final de esta etapa, las células transicionales comienzan a expresar un isotipo diferente de inmunoglobulina, la IgD. Las células T1 se desarrollan en el bazo para convertirse en T2 y posteriormente en linfocitos B maduros [23].

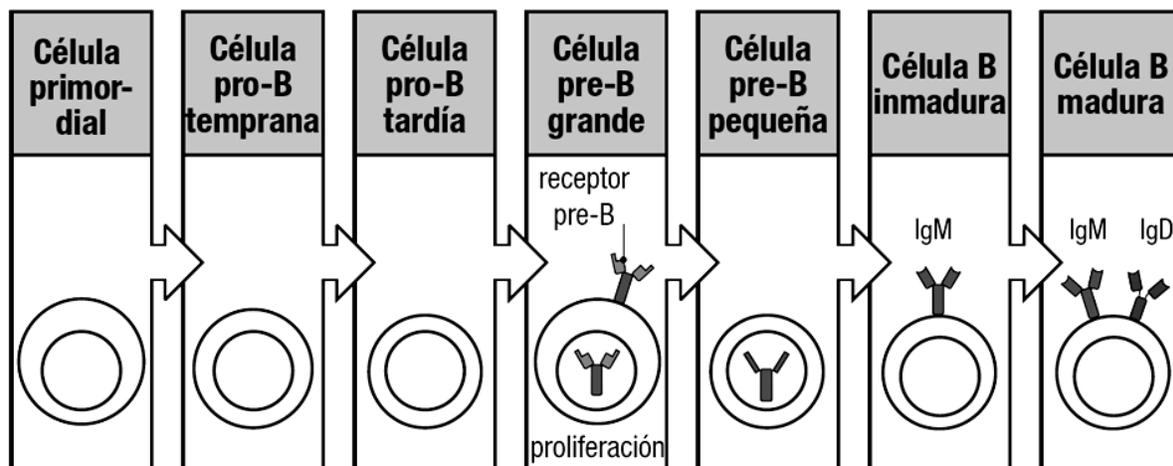


Figura 3. Esquema de la maduración de los linfocitos B.
Obtenido de *Janeway's Immunobiology*. Séptima edición (2008) [19].

A fin de facilitar el encuentro con su antígeno, el linfocito va a lugares especializados llamados órganos linfoides secundarios donde drenan y son llevados todos los antígenos que han superado las barreras naturales del organismo. El linfocito B o T que reconoció a su antígeno se activa, sufre un proceso denominado expansión clonal y genera una progenie compuesta por miles de células con idéntica especificidad antigénica. Al expandirse, una fracción mayoritaria de los integrantes del clon expandido mediarán funciones efectoras. Una fracción menor se diferenciará a células de memoria, las cuales permanecerán en el organismo por años y permitirán una respuesta rápida y eficiente frente a una re-exposición al mismo antígeno. Los linfocitos T y B presentan notables diferencias en el modo de reconocer a los antígenos. Los linfocitos B los reconocen en su conformación nativa y no requieren de la participación de células presentadoras de antígenos (APC). Por el contrario los linfocitos T no reconocen al antígeno nativo, sólo son capaces de reconocer péptidos derivados del llamado "procesamiento de antígeno" que son presentados a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I (para los linfocitos CD8+) o clase II (para los linfocitos CD4+)[24].

Los linfocitos T CD8+ poseen propiedades citotóxicas y su principal mecanismo de acción es la liberación-dependiente de calcio de gránulos líticos después del reconocimiento de antígenos en la superficie de la célula blanco (ya que todas las células nucleadas pueden presentar antígenos en moléculas del MHC-I), sin embargo, también hace uso de otro mecanismo que involucra Fas ligando (FasL) que se une a su receptor Fas en la célula blanco donde se activa el programa de apoptosis mediado por Fas.

Los linfocitos T CD4+, reconocen péptidos unidos a moléculas de MHC clase II (expresadas en las APCs) y tienen dos tipos funcionales: T_{H1} y T_{H2} [19]. Los linfocitos T_{H1} median la activación de los macrófagos y contribuyen además a la activación y expansión de los linfocitos T citotóxicos. Las células T_{H2} colaboran con los linfocitos B para su correcta activación, expansión y diferenciación a células plasmáticas. Los linfocitos T_{H1} y T_{H2} se diferencian en uno u otro sentido según el perfil de citocinas presentes en el órgano linfoide secundario donde se activan siendo vírgenes. La presencia de IL-12 y citocinas

relacionadas promueve el perfil T_H1, mientras que la presencia de IL-4 sobre todo cuando IL-12 es baja promueve un perfil T_H2 [24].

Finalmente se debe mencionar que hasta el momento se conocen al menos siete poblaciones principales que no conforman el criterio bimodal de inmunidad innata e inmunidad adaptativa: las células T natural killer (NKTs), las células T $\gamma\delta$, las células T

Recuadro 1. Familia de proteínas Bcl-2

Esta familia de proteínas se compone de moléculas pro y anti- apoptóticas [27] cuyo papel regulador se ubica principalmente a nivel mitocondria [28]. Otra característica compartida por los miembros de la familia es la analogía de secuencia dentro de sus segmentos α -hélice que es denotada como BH por *Bcl-2 homology* y que son numerados del 1 al 4. Los miembros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL, A1, y MCL-1) poseen los cuatro dominios BH y su mecanismo de acción es inhibir directamente a los miembros pro-apoptóticos. Los pro-apoptóticos, en cambio, pueden ser subdivididos de acuerdo al número de dominios BH que posean: están los multidominio (BAX, BAK, y BOK) que poseen los dominios BH1-3 y que actúan oligomerizándose y formando poros en la membrana externa de la mitocondria; y están los miembros con un sólo BH o "BH3-only" (BID, BAD, BIM, BIK, BMF, NOXA y PUMA) que poseen sólo el dominio BH3 [29] su mecanismo de acción es por medio de la unión a la maquinaria anti-apoptótica o interaccionando tanto con los miembros anti-apoptóticos como con los proapoptóticos multidominio [28].

Los miembros de esta familia residen en gran medida en las membranas subcelulares incluyendo la membrana exterior de las mitocondrias, el retículo endoplásmico, y la membrana nuclear [29].

CD8 $\alpha\alpha$, las células B1, las células B de zona marginal y subpoblaciones tanto de NKs como de eosinófilos [21]. Se sabe que comparten características tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa, pero la discusión de dichas poblaciones supera los objetivos del presente trabajo.

B.1. Apoptosis en el sistema inmune

La apoptosis es la forma más común de muerte celular en el sistema inmune. Es un proceso fundamental para la regulación de la maduración, de la selección del repertorio de receptores y de la homeostasis linfocitaria, por ello no es de extrañar que muy poca o un exceso de apoptosis resulte en enfermedades severas[25]. Aunque la apoptosis participa en el desarrollo de virtualmente todos los linajes celulares, juega un papel particularmente importante en el de los linfocitos [26].

Se han identificado una gran cantidad de moléculas involucradas en los procesos de selección positiva y negativa, sin embargo, existen todavía algunos vacíos en la caracterización de los mecanismos que los llevan a cabo. Un punto claro y en común que tienen los procesos de selección positiva y negativa en el desarrollo de linfocitos T y B es la importancia de la familia de proteínas Bcl-2 (ver **recuadro 1**).

La señalización vía TCR durante la selección positiva promueve la supervivencia del timocito porque uno de los fenómenos que desencadena es el aumento de la expresión del propio Bcl-2 que es una molécula anti-apoptótica [27].

En el caso de la selección negativa, es decir, del proceso de eliminación de células T y B inmaduras autorreactivas, se sabe que también se basa principalmente en la vía regulada por Bcl-2 y que es iniciada por la proteína pro-apoptótica BIM que es antagonista de Bcl-2 [30].

El papel de Fas en la selección negativa aun es controversial. Se sospechaba inicialmente que intervenía en la selección negativa de las células T debido a que Fas se expresa en los timocitos DP y FasL se expresa en las células estromales del timo [31], sin embargo, estudios con ratones que carecían de FADD o caspasa-8 selectivamente en las células linfoides de linaje T mostraron que la señalización vía receptores de muerte no es esencial para la eliminación de clones autorreactivos [30]. Del mismo modo, estudios realizados con ratones *lpr* (que carecen de la expresión de Fas), han mostrado que tienen una eliminación de clones de células B autorreactivas a este nivel equivalente a la de ratones silvestres [26].

Por otro lado, la apoptosis también está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis periférica del sistema inmune, pues también participa en el “encendido y apagado” de las respuestas celulares y humorales. Los linfocitos antígeno-específicos proliferan de manera extensiva durante una respuesta inmune, esto conlleva a un gasto energético importante para el organismo por lo que el proceso de activación debe ser estrictamente regulado y uno de estos puntos de control es la coestimulación pues cuando los linfocitos no reciben coestimulación o ésta es insuficiente, no se activan completamente

y sufren apoptosis. Las señales de coestimulación promueven las vías de activación, pero también, son potentes inductores de proteínas anti-apoptóticas tales como Bcl-XL, además de que promueve la producción de citocinas que incrementan la expresión de genes promotores de la supervivencia [36].

Adicionalmente, una vez que las funciones efectoras se han puesto en marcha, debe haber mecanismos para delimitar la respuesta en cuanto a su duración e intensidad. En el caso de las respuestas inmunes agudas se utiliza la apoptosis para eliminar a las células efectoras y así frenar la respuesta una vez que la fuente antigénica ha sido eliminada pues de otro modo las acciones efectoras de dichas células podrían repercutir negativamente en los tejidos sanos. En el caso de las infecciones crónicas con presencia antigénica persistente, la eliminación de linfocitos activados es crítica para lograr un estado de cohabitación entre el patógeno y el hospedero, de tal forma que los números de los patógenos se mantengan en niveles aceptables al mismo tiempo que se minimice la destrucción inadvertida de tejidos vitales [30].

La vasta mayoría de los linfocitos generados por activación y expansión derivada por su reconocimiento de su antígeno específico es eliminada por apoptosis. Tanto los linfocitos T como los B tras su activación se sensibilizan a la apoptosis inducida por Fas, sin embargo, se ha reportado que la remoción de las células efectoras antígeno-específicas al término de la respuesta inmune involucra tanto la muerte en respuesta a un DR como a la muerte por pérdida de señales extracelulares para la supervivencia (muerte por negligencia)[32].

Finalmente, la muerte celular por apoptosis también es empleada como mecanismo de defensa por los linfocitos T citotóxicos ó CTLs (*cytotoxic T lymphocytes*) y NKs para eliminar células infectadas por virus o células transformadas. Ambos tipos de células matan a sus blancos celulares ya sea por unión a un DR o por exocitosis de sus gránulos [33]. Durante la muerte inducida por los gránulos, se liberan moléculas de perforina y granzimas (serina proteasas) a la célula blanco donde inducen la muerte celular por vías dependientes de caspasas (como en el caso de la granzima B) o independientes de caspasas (granzima A). La segunda vía involucra la unión del DR en la célula blanco con su ligando expresado en la

célula citotóxica. Aunque Fas es el DR más importante y representativo de esta vía, también pueden iniciarla otros DRs como TNFR1 y TRAILR(*Tumor necrosis factor receptor 1 y TNF related apoptosis inducing ligand receptor*) [34].

C. Inmunodeficiencias primarias

C.1. Definición

Son desórdenes genéticos que afectan el desarrollo o la función (o ambos) de distintos componentes del sistema inmune, ocasionando que los individuos que las padecen no sólo sean vulnerables a contraer distintos tipos de infecciones que ponen en riesgo su vida [35] sino que también los predispone a inflamación sistémica y crónica, reacciones de hipersensibilidad, autoinmunidad y cáncer [36]. Gran parte de las inmunodeficiencias primarias (IDPs) conocidas son desórdenes monogénicos que siguen una herencia mendeliana simple; sin embargo, en algunas de ellas se reconoce un origen poligénico más complejo. La penetrancia de la enfermedad y la variabilidad en la expresión e interacciones entre factores genéticos y ambientales contribuyen también a la diversidad fenotípica de las IDPs [35].

La mayoría de las IDPs resultan de defectos heredados, sin embargo, se han descrito formas adquiridas [35,37]. Es importante notar que las IDPs son distintas de las inmunodeficiencias secundarias que pueden resultar de otras causas como infecciones virales o bacterianas, desnutrición o tratamiento con fármacos que inducen inmunosupresión [37].

C.2. Clasificación

La clasificación de las enfermedades tiene muchas aplicaciones que van desde la ayuda en el diagnóstico y la elección del tratamiento hasta cuestiones demográficas. Las IDPs son un grupo de enfermedades especialmente difícil de agrupar debido a que, por un lado, existe una gran variedad de desórdenes y por otro lado las características de cada una de ellas en

muchas ocasiones se traslapan [1]. Debido a esto, las IDPs se han organizado a lo largo de la historia de diferentes maneras, en muchas ocasiones sin un consenso . Aquí se hablará únicamente de la clasificación internacional, sin embargo, es importante tener en cuenta que existen diferentes propuestas de clasificación entre diversos autores y que cada una puede ser útil en distinta medida de acuerdo al fin que se persiga.

C.2.1 Clasificación del Comité Internacional de Expertos en Inmunodeficiencias Primarias

En 1970 la Organización Mundial de la Salud (OMS) convocó un comité con la tarea de clasificar y definir a las IDPs. Este comité de expertos se reunió en las oficinas principales de la OMS en Ginebra, Suiza y generaron una nomenclatura unificada para las IDPs conocidas en ese momento, identificándose catorce entidades diferentes. Un resumen de su reporte fue publicado en el *New England Journal of Medicine* [38] y el reporte completo apareció en la revista *Pediatrics* [39]. Desde entonces, la clasificación ha sido modificada conforme se descubren nuevas entidades y se describen con mayor detalle los mecanismos que envuelven a estas patologías. Todos estos avances se presentan y discuten en las reuniones efectuadas cada dos o tres años y se incluye la información reciente en cada modificación de la clasificación. La última reunión ocurrió en Nueva York en el 2011 y la clasificación general de las IDPs continuó contando con los 8 grupos principales que se habían estado manejando en las últimas publicaciones basándose en el componente inmune afectado y en el defecto genético (tabla 3).

Tabla 3. Categorías principales de la clasificación internacional de inmunodeficiencias primarias

GRUPO	NOMBRE
I	Inmunodeficiencias Combinadas
II	Síndromes bien definidos con inmunodeficiencia
III	Deficiencias predominantemente de anticuerpos
IV	Enfermedades con desregulación Inmune
V	Defectos congénitos del número, función o ambos de los fagocitos
VI	Defectos en la inmunidad innata
VII	Desórdenes autoinflamatorios
VIII	Deficiencias del complemento

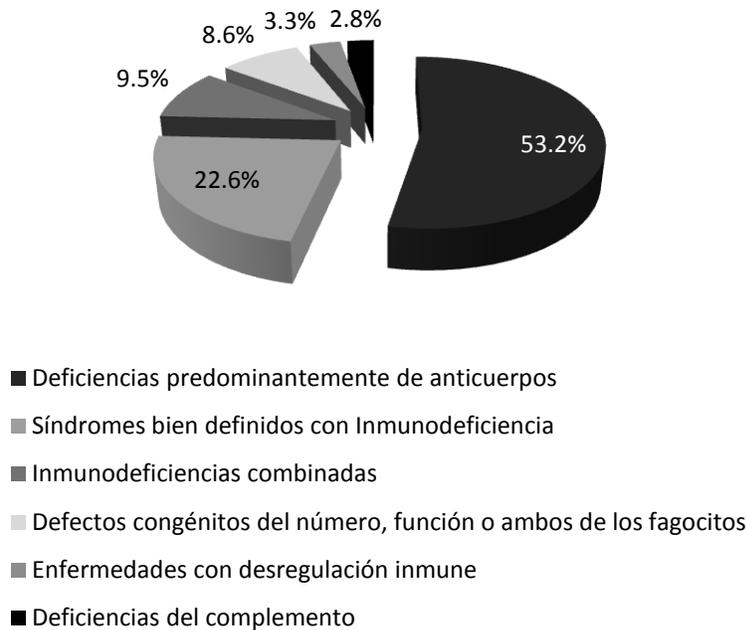
Modificado de Hertz-Al, et al "Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency"[40]

Debe enfatizarse que esta clasificación de IDPs fue hecha con la intención de proveer un marco de abordaje para ayudar al diagnóstico de los pacientes y no como un método riguroso de clasificación (quizá si así fuera, resultaría en una clasificación demasiado extensa y difícil de manejar en la práctica clínica), por lo tanto, las diferencias entre los grupos no son tan estrictas y hasta pueden resultar un tanto arbitrarias, de tal forma que alguna entidad podría pertenecer a más de una categoría, además de que la descripción de los síntomas encontrados en cada patología sólo es un resumen de los rasgos más comúnmente encontrados pero no es un representativo de todos los casos [40].

C.3. Epidemiología

La frecuencia de las IDPs en la población general es de 1:250,000 neonatos vivos. Su prevalencia global es desconocida actualmente pero se estima que puede variar de 1:5,000 a 1:500,000 dependiendo de la entidad clínica específica y de la población en estudio [36]. La mayoría de los países desarrollados han creado registros para estimar la prevalencia, incidencia y patrones de las IDPs, sin embargo, la obtención de información epidemiológica de estas enfermedades en los países en desarrollo se ha visto obstaculizada por los recursos limitados para su diagnóstico. Debido a esto en 1993 se creó el Grupo Latinoamericano de Inmunodeficiencias primarias (LAGID), que posteriormente se convirtió en sociedad (LASID) con el que se pretendía llevar un registro de los pacientes con IDPs, optimizar los recursos diagnósticos y terapéuticos y finalmente establecer líneas de investigación colaborativa [13]. Se han publicado dos reportes sobre los registros realizados en los países latinoamericanos participantes. En el segundo reporte [2] se consideraron 3,321 pacientes registrados con IDPs en 12 países de Latinoamérica incluyendo a México. La distribución en cuanto a la proporción de cada grupo de las IDPs mostró que un 53.2% de los casos registrados pertenecían al grupo de las inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos, 22.6% al grupo de los síndromes con inmunodeficiencia bien definidos, 9.5% a las inmunodeficiencias combinadas, 8.6% a los defectos del número, función o ambos en los fagocitos, 3.3% a enfermedades con desregulación inmune y un 2.8% al grupo de las deficiencias del complemento (gráfica 1).

Aunque las inmunodeficiencias primarias son generalmente consideradas raras, la evidencia muestra que son más comunes de lo que anteriormente se estimaba. Se piensa que un porcentaje del 70% al 90% de las inmunodeficiencias no se diagnostican [41]. En México se estima que cada año nacen más de 4,000 niños con inmunodeficiencias primarias y de estos aproximadamente 250 presentan las formas más severas [36].



Gráfica 1. Distribución de los casos registrados que pertenecen a cada grupo de IDPs.

Modificado de Leiva et al, ." Primary Immunodeficiency Diseases in Latin America: The Second Report of the LAGID1 Registry"[2]

D. Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune

D.1. Definición

Es una inmunodeficiencia primaria que consiste en un defecto genético que afecta a la homeostasis linfocitaria resultado de un desorden en la vía de apoptosis mediada por Fas [42]. Se encuentra en la clasificación de la IUIS dentro del grupo de las enfermedades con desregulación inmune en el apartado de los síndromes con autoinmunidad.

D.2. Historia

El Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune fue identificado como entidad clínica por Canale y Smith en 1967 y en ocasiones es llamado Síndrome de Canale-Smith [43].

En 1992 Sneller y colaboradores reconocieron que esta entidad clínica se asemejaba a dos cepas de ratones con fenotipos linfoproliferativos conocidos como *lpr* (de linfoproliferación) y *gld* (de enfermedad linfoproliferativa generalizada en inglés). A inicios de ese mismo año, se descubrió que el defecto molecular en los ratones *lpr* era una mutación que ocasionaba pérdida de la función en el receptor de muerte conocido como Fas. Posteriormente esta asociación fue validada en humanos cuando se determinó que el defecto subyacente en dos conjuntos de pacientes con enfermedad linfoproliferativa (desde entonces conocida como ALPS) era precisamente una falla en la apoptosis de linfocitos debida a una mutación en *FAS* [44].

D.3. Características clínicas

Las características clínicas más comunes de ALPS son: linfadenopatías, esplenomegalia y citopenias autoinmunes recurrentes [43]. El inicio de las manifestaciones de ALPS generalmente ocurre en la infancia temprana (de 0-5 años), alrededor de los 6-12 meses en la mayoría de los casos [45], sin embargo, no hay un límite de edad aparente [46]. En los casos más severos (como en mutaciones homocigotas de *FAS* y en algunos casos de heterocigotos) la linfoproliferación masiva es evidente al nacimiento, lo que indica que el proceso inició en el periodo prenatal [45]. Del mismo modo, las manifestaciones clínicas de ALPS son más severas en la infancia -paralelamente a la edad de expansión del repertorio de linfocitos- y tiende a mejorar en adolescentes y adultos [43].

La linfoproliferación causa principalmente la esplenomegalia y las linfadenopatías persistentes observadas en los pacientes y frecuentemente se acompaña de hepatomegalia. Ocasionalmente también presentan agrandamiento del timo visible por tomografía de tórax [45,47]. La linfadenopatía en ALPS típicamente es indolora a la

palpación y generalizada, e involucra especialmente el cuello y las regiones axilares [47]. El grado de esplenomegalia es variable, pero plantea un riesgo de ruptura por traumatismo además de que puede contribuir a las citopenias por secuestro [43]. Según la convención sobre criterios diagnósticos que se trata en la sección "Criterios diagnósticos internacionales", la linfadenopatía y/o esplenomegalia debe forzosamente persistir por más de 6 meses para ser considerada como criterio diagnóstico, además de que si se encuentra aislada, la linfadenopatía debe afectar mínimo 2 cadenas de ganglios [44].

La autoinmunidad asociada con ALPS sigue un típico curso de exacerbaciones y remisiones y cae básicamente en dos grupos: (1) autoinmunidad contra células sanguíneas y (2) un grupo menos común de características autoinmunes que no tienen por blanco ningún órgano hematopoyético [45].

La mayoría de los pacientes desarrollan anemia hemolítica positiva a la prueba de Coombs o una combinación de anemia y trombocitopenia autoinmune, un hallazgo menos frecuentemente es la neutropenia autoinmune [46].

Otras manifestaciones autoinmunes menos frecuentes, comprenden glomerulonefritis, síndrome de Guillian-Barré, uveítis, artritis, hepatitis y diabetes. También se han observado manifestaciones en la piel, tales como urticaria, varios tipos de rash cutáneo y vasculitis [45]. Este perfil autoinmune es una distinción clara de los ratones *lpr* y *gld* que uniformemente desarrollan glomerulonefritis, pero infrecuentemente desarrollan citopenias autoinmunes [46].

D.4. Diagnóstico por el laboratorio

Los hallazgos de laboratorio en ALPS incluyen linfocitosis con un perfil de citocinas Th2, así como niveles plasmáticos de IL-10, ligando de Fas soluble (sFasL) y vitamina B12 elevados. Los niveles de IL-10 han mostrado estar consistentemente elevados en pacientes con ALPS, por lo que se considera como un marcador confiable de la expresión de la enfermedad [43].

Los pacientes también presentan hipergamaglobulinemia con múltiples autoanticuerpos circulantes. La anemia es prácticamente universal. La eosinofilia y monocitosis son hallazgos frecuentes, sin embargo, los mecanismos a los que se deben son inciertos [43]. En un estudio [48] se analizó la relación entre el fenotipo clínico e inmunológico de los pacientes con ALPS que presentaban o no eosinofilia identificándose los primeros como un subgrupo que además de las características usuales de ALPS tenían números elevados de leucocitos de varios linajes, niveles altos de IgE, y una mayor mortalidad por complicaciones infecciosas. Los hallazgos patológicos en los ganglios linfáticos inicialmente descritos por Lim y sus colaboradores [49] son característicos e incluyen expansión del área paracortical debida a infiltración de las células DNTs policlonales y va acompañada de hiperplasia folicular (es decir, expansión de los folículos linfoides) y plasmacitosis policlonal. Una marcada infiltración de las DNTs puede llevar en algunos casos a la desaparición de la arquitectura de los ganglios y esto junto con la infiltración a la médula ósea y al bazo puede derivar en un diagnóstico erróneo de linfoma periférico de células T. [44]

Si existe la sospecha de ALPS con base en características clínicas, la evaluación de laboratorio especializada incluye: citometría de flujo para células $TCR\alpha\beta+CD4-CD8-$ y el ensayo de apoptosis en linfocitos [43]. Las células DNTs (fenotipo: $CD3+$, $CD8-$, $CD4-$ y $TCR\alpha\beta+$) son un subconjunto de células T normalmente presentes en porcentajes pequeños en sangre periférica pero que se encuentran elevadas en pacientes con ALPS. Se pensaba que esta elevación era un epifenómeno de la enfermedad, es decir, un fenómeno accesorio que no tenía gran implicación en el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, ahora se sospecha que las DNTs son parte de la patogénesis de ésta y que pueden conducir a la actividad anormal de los linfocitos B y la consecuente autoinmunidad [50,51]. La infiltración marcada de las DNTs puede en algunos casos llevar a la pérdida de la estructura de los ganglios linfáticos con infiltración al bazo y médula ósea provocando un diagnóstico erróneo de linfoma periférico de células T [44].

Las células DNTs de los pacientes con ALPS pero no de personas sin la enfermedad, expresan una isoforma de CD45 análoga al B220 murino que es un marcador normalmente

encontrado en linfocitos B pero no en linfocitos T, además de patrones de glucosilación inusuales en su superficie [42,52]. Adicionalmente, éstas células presentan un perfil anérgico *in vitro*, produciendo bajos niveles de IL-2 y proliferando pobremente en respuesta a varios estímulos para células T. Existen diversas hipótesis sobre su origen, una de ellas es que provienen de células T maduras que han perdido su expresión de CD4 o CD8. Pero también, se piensa que podrían ser una población distinta que se expande *in vivo* cuando la apoptosis mediada por Fas falla [42].

El ensayo de apoptosis es llevado a cabo con linfocitos del paciente y un testigo sano que son cultivados (por separado) en presencia de IL-2 y estimulados con fitohemaglutinina (PHA), para posteriormente adicionar un anticuerpo monoclonal dirigido contra Fas. Los linfocitos del testigo experimentan muerte celular en cantidad considerable, sin embargo, los linfocitos de pacientes con ALPS básicamente no mueren ante este estímulo.

En resumen, las pruebas de laboratorio que se han considerado importantes para el diagnóstico de ALPS comprenden la combinación de 3 determinaciones: porcentaje alto de células DNTs y niveles plasmáticos elevados de IL-10 y de sFasL. Estas determinaciones en conjunto son superiores al ensayo de apoptosis porque los pacientes con mutaciones somáticas en Fas y mutaciones en FasL no pueden ser detectados por esta prueba. En el caso de los pacientes con mutaciones somáticas, debido a que la mayoría de sus células no presentan mutación, se observa un resultado "normal" por el enmascaramiento producido por la población predominante, es decir, las células que no poseen la mutación [43]. En el caso de los que tienen defectos en FasL, el problema consiste en que la prueba usa un anticuerpo monoclonal en sustitución al ligando natural, por lo tanto, las células del paciente van a responder bien a éste pues se está evaluando la respuesta del receptor Fas al estímulo externo y no la capacidad de inducción de apoptosis de las moléculas de FasL que es donde se encuentra el defecto en estos pacientes. Por lo expuesto anteriormente, el ensayo de apoptosis ya no es considerado esencial para el diagnóstico de ALPS [44].

D.5. Criterios diagnósticos internacionales

En Septiembre del 2009, se llevó a cabo un taller en el Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos al que asistieron investigadores de diferentes países. Este taller tenía como objetivo discutir los avances clínicos y en ciencia básica sobre ALPS y otras enfermedades relacionadas. A partir de esto, se publicó un artículo en la revista *Blood* [44] que resumía sugerencias basadas en los temas discutidos durante la reunión sobre los criterios diagnósticos. En él, dividen los criterios diagnósticos en 2 requeridos y 6 accesorios, pero además de que dividen a los criterios accesorios en primarios y secundarios (Tabla 4). Para establecer un diagnóstico definitivo de ALPS deben cumplirse los dos criterios requeridos y un criterio accesorio primario, mientras que un diagnóstico probable puede ser considerado por la presencia de los criterios requeridos y cualquiera de los criterios accesorios secundarios.

Tabla 4. Criterios diagnósticos de ALPS

Requeridos
1. Esplenomegalia y /o linfadenopatía crónica (>6 meses) no maligna y no infecciosa
2. Células CD3+ TCRαβ+ CD4-CD8- (dobles negativas, DNTs) elevadas (>1.5% de linfocitos totales ó 2.5% de linfocitos CD3+) en el marco de conteos linfocitarios normales o elevados
Accesorios
Accesorios Primarios
1. Apoptosis defectuosa de Linfocitos (en 2 ensayos diferentes)
2. Mutación somática o de línea germinal en <i>FAS</i> , <i>FASLG</i> o <i>CASP10</i>
Accesorios Secundarios
1. Niveles plasmáticos elevados de FASL soluble (>200pg/mL) ó niveles plasmáticos de IL-10 elevados (>20pg/mL) ó niveles elevados de Vitamina B ₁₂ en plasma (>15ng/L) ó niveles de IL-18 elevados en plasma (>500pg/mL)
2. Hallazgos inmunohistológicos típicos revisados por un hematólogo experimentado
3. Citopenias autoinmunes (anemia hemolítica, trombocitopenia o neutropenia) y niveles elevados de IgG (hipergamaglobulinemia policlonal)
4. Historia familiar de linfoproliferación no maligna y no infecciosa con o sin autoinmunidad

Modificado de Oliveira, J.D. et al "Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop" [44]

Desde una perspectiva clínica, los pacientes con diagnóstico probable deben ser tratados y monitoreados de la misma manera que los pacientes con diagnóstico definitivo de ALPS, sin

embargo, siempre se les aconseja a los médicos que persigan un diagnóstico genético y/o el ensayo de apoptosis [44].

D.6. Clasificación de ALPS basada en el defecto genético presente

Una vez diagnosticado, ALPS es categorizado de acuerdo al sitio en que se encuentre el defecto en la vía de apoptosis [43]. La clasificación molecular de ALPS ha sufrido numerosas modificaciones a través del tiempo, lo que ha llevado inevitablemente a una nomenclatura un tanto caótica. En la **tabla 5** se resume la clasificación empleada actualmente y la usada anteriormente a ésta.

Tabla 5. Clasificación revisada de ALPS

Nomenclatura previa	Nomenclatura revisada	Definición
ALPS tipo 0	ALPS-FAS	Pacientes que cumplen con los criterios diagnósticos de ALPS y presentan mutaciones homocigotas de línea germinal en <i>FAS</i>
ALPS tipo Ia	ALPS-FAS	Pacientes que cumplen con los criterios diagnósticos de ALPS y presentan mutaciones heterocigotas de línea germinal en <i>FAS</i>
ALPS tipo Im	ALPS-s FAS	Pacientes que cumplen con los criterios diagnósticos de ALPS y presentan mutaciones somáticas en <i>FAS</i> .
ALPS tipo Ib	ALPS-FASLG	Pacientes que cumplen con los criterios diagnósticos de ALPS y presentan mutaciones de línea germinal en <i>FASLG</i> .
ALPS tipo IIa	ALPS-CASP10	Pacientes que cumplen con los criterios diagnósticos de ALPS y presentan mutaciones de línea germinal en <i>CASP10</i> .
ALPS tipo III	ALPS-U	Pacientes que cumplen con los criterios diagnósticos de ALPS pero se desconoce su defecto genético (no <i>FAS</i> , no <i>FASLG</i> , y no <i>CASP-10</i>).

Modificado de Oliveira, J.D. et al "Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop". *eBlood* [44]

Por simplicidad se recomienda no emplear más la clasificación numérica [9], sin embargo, muchos autores siguen empleándola. No es sólo la complejidad del sistema numérico lo que lo hace obsoleto, sino también el hecho de que sólo considera aparte las mutaciones homocigotas en *FAS* y no en los demás genes.

D.6.1. Mutaciones de línea germinal y somáticas en el gen del receptor de muerte Fas (ALPS-FAS y -sFAS)

Dentro de ALPS-FAS se encuentran englobadas las mutaciones de línea germinal en FAS, tanto homocigóticas como heterocigóticas (anteriormente llamados ALPS tipo 0 y tipo la respectivamente [44]). En el caso de ALPS-sFAS, se refiere a las mutaciones somáticas (antes ALPS tipo Im) **Tabla 5**.

La mayoría de los pacientes con ALPS poseen mutaciones heterocigóticas en FAS, ya sea de línea germinal o de manera somática [42,53]. Estas mutaciones no están distribuidas uniformemente a lo largo del gen de FAS en cuanto a frecuencia [46], la mayoría ocurren en la zona del dominio intracelular (ICD), más específicamente en el exón 9 afectando el DD. Estas mutaciones son asociadas con los fenotipos más severos y con mayor penetrancia [53].

Una minoría de los pacientes tiene mutaciones heterocigóticas en el dominio extracelular (ECD) [42,53], y estas mutaciones están asociadas a defectos menos importantes en la apoptosis inducida por Fas en comparación con las que ocurren en el ICD [54].

Un conjunto significativo de pacientes tienen mutaciones somáticas en FAS principalmente limitadas al compartimiento de las DNTs [50]. La mutación aparentemente surge en una célula troncal hematopoyética comprometida de tal forma que las DNTs y quizá una proporción de otras células hematopoyéticamente derivadas pueden portar la mutación, sin embargo, las DNTs son la única población en la que todas las células están mutadas [47]. Los pacientes con ALPS debido a mutaciones de línea germinal y los de mutaciones somáticas son fenotípicamente similares tanto clínicamente como en los hallazgos de laboratorio. De manera predictiva, la principal diferencia entre éstos es que en los pacientes con mutaciones de línea germinal la enfermedad se manifiesta a más temprana edad que en su contraparte somática [50].

Finalmente, se han reportado tres casos de mutaciones homocigotas en *FAS* (ALPS-tipo 0) en diferentes publicaciones. De los tres casos, se deduce que las mutaciones eran recesivas porque los padres que lo portaban de manera heterocigótica no presentaban síntomas. Sin embargo, Rieux-Laucat y colaboradores [45] mencionan un caso no publicado de una familia con un paciente homocigoto en la que la madre y el padre portaban el mismo defecto en *Fas*, pero sólo el padre presentaba los síntomas clásicos del ALPS tipo Ia, pero además las células de ambos padres tenían una respuesta defectuosa de magnitud similar a la inducción de apoptosis vía *Fas*. El hijo, que había heredado ambos alelos defectuosos presentaba una deficiencia total de *Fas* y cuadro típico de ALPS.

Respecto a los detalles de los tres casos reportados, uno tenía un codón de paro prematuro en el ECD que llevaba a una completa falta de expresión. En contraste, en los otros dos casos, las mutaciones estaban localizadas en el ICD afectando la región del DD. Sin embargo, el fenotipo de los tres casos reportados es francamente similar: comienzo prenatal, linfoproliferación muy severa, infiltración pulmonar y muerte en uno de los casos [54].

D.6.2. Mutaciones en el gen del ligando de muerte FasL (ALPS-FASLG)

Existen reportes de al menos 4 pacientes con ALPS debido a mutaciones en *FASLG*. Dos de ellos son de Estados Unidos, ambos heterocigotos, uno tenía un cambio de la Arginina 530 por una Glicina en el ECD [55,56] y el otro una eliminación de 84 bases del exón 4, ocasionando la pérdida de 24 aminoácidos del dominio codificado en dicho fragmento, ambos presentaban cuadros clínicos de Lupus Eritematoso Sistémico (SLE) [55]. Este último fue el primer paciente reportado con una mutación en *FASLG*. Presentaba características clínicas de SLE incluyendo *rash*, artritis, inflamación de los recubrimientos serosos, bajos conteos leucocitarios, enfermedad renal, y anticuerpos antinucleares positivos. Sin embargo no cumplía con todas las características de ALPS pues no tenía las DNTs elevadas [42,47]. Un tercer caso [57] fue de un paciente de nacionalidad española con una mutación autosómica recesiva homocigótica que provocaba un cambio en el aminoácido 247 en el dominio extracelular codificado por el exón 4 de una Alanina por un Ácido

glutámico que dañaba la función de FasL pero no afectaba su expresión. Finalmente, el cuarto caso se trata de un paciente del subcontinente Indio que es también homocigoto, hijo de padres consanguíneos y cuya mutación consiste en la eliminación de un solo nucleótido en el exón 1 que ocasiona un codón de paro prematuro cuya consecuencia es la completa ausencia de expresión de FasL. Este paciente no presentaba niveles elevados de sFasL en plasma y el ensayo de apoptosis inducida vía Fas resultaba normal. Los padres de este paciente resultaron ser heterocigóticos a la mutación, y se describieron como sanos lo que denota el carácter recesivo de la mutación [55].

Dado la semejanza entre los ratones *gld* (defectos en FasL) y los *lpr* (defectos Fas), se podría anticipar una ocurrencia de mutaciones en *FASLG* tan frecuentes como las mutaciones en *FAS*, sin embargo, esto no es así. Lo anterior puede ser interpretado de diversas maneras: por un lado, se podría especular que FasL tiene un papel más importante en el desarrollo humano del que tiene en el ratón, por lo que mutaciones en esta molécula podrían no ser compatibles con la vida [54]. Otra posibilidad que se contemplaba cuando se conocía sólo el primer caso de ALPS -FASL era que las mutaciones en *FASLG* en humanos pudieran causar un fenotipo completamente diferente al del clásico ALPS y por tanto no pudiera ser identificado como tal [45,54]. Conforme se aumentó el número de casos con ALPS-*FASLG*, se fue haciendo evidente que si bien no se trataban de cuadros clásicos de ALPS (recordando que el prototipo estaba dado por el tipo de ALPS más frecuente, es decir el de mutaciones heterocigóticas en *FAS*), si había características que coincidían, y de hecho con base a dichas observaciones es que se cambiaron algunos criterios diagnósticos que se habían establecido previamente para el diagnóstico de la enfermedad.

D.6.3. Mutaciones en el gen de la caspasa-10 (ALPS-CASP10)

Los hallazgos en esta categoría de ALPS reportados son bastante variados e inconsistentes llegando en algunas ocasiones a ser contradictorios.

Hasta hace pocos años, las bases moleculares del antes llamado ALPS-tipo II eran desconocidas pero se sospechaba que el defecto se encontraba abajo en la cascada de

señalización de Fas [53]. Posteriormente Wang y sus colaboradores reportaron en un artículo de 1999 [58] la ocurrencia de mutaciones en *CASP-10* en dos familias diferentes. Una familia tenía una mutación heterocigótica que producía que la Leucina 285 cambiara a Fenilalanina (Leu285Phe). La paciente cumplía con los criterios diagnósticos de SLE e interesantemente, su madre presentaba autoanticuerpos antinucleares circulantes y de acuerdo con los estudios de secuenciación fue ella de quien la paciente había heredado la mutación. El padre y las hermanas del paciente estaban sanos y solo portaban alelos silvestres del gen [58].

La otra familia se trataba de un matrimonio de judíos Ashkenazi que eran heterocigotos para una sustitución que provocaba que la Valina 410 cambiara a Isoleucina (Val410Ile). El paciente afectado en esta familia portaba dicha sustitución de manera homocigótica. Una cuestión curiosa de este paciente es que presentaba autoanticuerpos antinucleares (más comunes en SLE que en ALPS). Los diferentes modos de herencia de ambos defectos fueron consistentes con los ensayos de expresión *in vitro* que realizaron los investigadores en los que se observó que la mutación Leu285Phe afectaba significativamente a la apoptosis y que actuaba de una manera dominante negativa, mientras que la mutación Val410Ile tenía un efecto significativo pero menos severo en la apoptosis. En el estudio inicial [58] por medio de análisis de restricción se descartó que ambas mutaciones se trataran de polimorfismos frecuentes en la población, sin embargo, un análisis posterior en población sana danesa demostró que se trataba de un polimorfismo común [54]. A pesar de esto, no se pudo descartar que esta variante esté asociada con formas severas de ALPS pues en ningún individuo analizado en este estudio se encontró dicho cambio en forma homocigota [59]. Del mismo modo, el rol en la patogénesis de la enfermedad en un número de otras variantes de caspasa-10 identificadas en pacientes con ALPS no son claras [54].

En un estudio realizado por Zhu S. y colaboradores publicado en el 2006 [60] se analizaron las variantes de *CASP-10* en individuos con ALPS tanto con mutación en *FAS* como sin ella, así como en individuos sanos y se encontraron dos pacientes con ALPS que portaban la mutación Ile406Leu de manera heterocigótica. Por medio de estudios *in vitro* se demostró

que al igual que con la mutación Leu285Phe, la apoptosis se veía afectada significativamente cuando se transfectaba sola y que actuaba de una manera dominante negativa cuando se co-transfectaba con la variante silvestre. En ese mismo estudio, se encontraron también individuos sanos que portaban de manera homocigota la variante Val410Ile, descartando así la anterior suposición de que esta variante en forma homocigota era causante de ALPS. Más aun, los autores reportan que un análisis de asociación sugirió un rol protector de esta variante hacia la presentación de la enfermedad en formas severas en 63 familias que la portaban y que tenían ALPS debido a mutaciones dominantes en *FAS* y concluyen que variaciones diferentes en caspasa-10 pueden producir efectos fenotípicos contrastantes [60].

Un dato interesante en los pacientes con ALPS-CASP10 es que no sólo la vía apoptótica de Fas está dañada, sino que también aquellas mediadas por otros receptores de muerte como TNFR1, DR3 y los receptores de TRAIL DR4 y DR5. Sorprendentemente otro hallazgo en estos pacientes fue la acumulación de células dendríticas (DC) en sus órganos linfoides, fenómeno que no ocurre en sus contrapartes con defectos en Fas. La muerte celular de las DCs se ha visto que es dependiente de TRAIL mas que de FasL [54].

D.6.4. Defectos genéticos no identificados (ALPS-U y fenotipo de ALPS)

Dentro de la categoría de ALPS-U se encuentran aquellos pacientes que cumplen con los criterios diagnósticos de ALPS pero no tienen ningún defecto genético identificable [43]. Se le denomina así precisamente por desconocerse esta información (la "U" es de *unknown*). Se calcula que de un 25 a 33% de los pacientes diagnosticados con ALPS son clasificados dentro de esta categoría [43,47]. Hay autores que piensan que probablemente represente un grupo heterogéneo de pacientes con diferentes etiologías moleculares, además de que no se sabe si alguno de estos pacientes tiene mutaciones somáticas en genes distintos a *FAS* [43].

Por otro lado, un grupo de pacientes similar a los ALPS-U son los denominados con fenotipo de ALPS que son aquellos que presentan las características fenotípicas de ALPS pero que no

presentan defectos en el ensayo de apoptosis mediado Fas o si los presentan éstos son muy ligeros además de que al igual que los ALPS-U no tienen mutaciones en los clásicos 3 genes de *FAS*, *FALG* y *CASP-10* ni en otros afines como *CASP-8*, *FADD*, por lo tanto su defecto genético se desconoce [47]. Aunque no se ha demostrado, es posible que estos pacientes posean otra vía apoptótica de los linfocitos afectada, algunas moléculas candidatas son TRAILR1, DR3 o DR6 [25].

III. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de mutaciones en los pacientes con cuadro clínico de Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune no sólo permitirá caracterizar mejor a dichos pacientes para llevar un registro formal de esta enfermedad en México pues el INP es un centro de referencia nacional, también permitiría proporcionar asesoramiento genético al paciente y a su familia que les informe la probabilidad de transmitirla a su descendencia y en un momento dado si las familias lo consienten, realizar un estudio para la detección de portadores.

IV. OBJETIVOS

General

- Determinar la presencia de mutaciones en el gen de *FAS* y *FASLG* en pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune por medio de secuenciación.

Particulares

- Evaluar cuantitativamente la población de células T doble-negativas (DNTs) en sangre periférica de pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome Linfoproliferativo por medio de citometría de flujo para seleccionar a los candidatos para secuenciación
- Determinar la expresión de Fas en los linfocitos de los pacientes con DNTs elevadas
- Extraer mRNA y gDNA a partir de células de sangre periférica de los candidatos a secuenciación para amplificar por medio de PCR a *FAS* y *FASLG*
- Clonar los productos de PCR obtenidos a partir del mRNA de los pacientes para secuenciarlos posteriormente.
- Secuenciar los productos obtenidos a partir del mRNA y confirmar los hallazgos secuenciando los productos obtenidos a partir del gDNA.

V. HIPÓTESIS

Los pacientes que presenten un cuadro clínico compatible con las descripciones de ALPS y que además tengan las células DNTs elevadas (>2.5%) tendrán mutaciones en los genes de *FAS* ó *FASLG*.

VI. METODOLOGÍA

A. Selección de pacientes y procedimiento general

Se analizaron pacientes con diagnóstico clínico de síndrome linfoproliferativo. De cada paciente se obtuvo una muestra de sangre periférica y a estas muestras se les realizó por citometría de flujo una determinación de poblaciones leucocitarias y de DNTs. En los casos en que resultaron elevadas (>2.5%) éstas últimas, se buscaron mutaciones en *FAS* y *FASLG* para confirmar el diagnóstico.

B. Evaluación del criterio diagnóstico de las doble-negativas y de poblaciones leucocitarias

B.1. Determinación de las poblaciones leucocitarias y DNTs

Se mezclaron 30µL de sangre periférica completa con 5µL de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los siguientes antígenos de superficie y marcados con los fluorocromos indicados a continuación: CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP y TCRαβ-APC (Becton-Dickinson, BD). Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos protegido de la luz y finalmente se lisaron los eritrocitos utilizando solución de lisis comercial (BD). Las muestras se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 1%. Se adquirieron 10,000 eventos utilizando un FACs Aria (BD), incluyendo los respectivos controles de isotipo. Para las determinaciones de las poblaciones leucocitarias se siguió el mismo procedimiento indicado anteriormente cambiando sólo los anticuerpos de acuerdo a la especificidad requerida. Para el determinar células Natural Killer (NK) se empleó: CD45-PerCP/ CD3-FITC/CD16+56-PE y para los Linfocitos B : CD45PerCP/CD19-PE/CD3-FITC.

B.2. Determinación de leucocitos totales

Se realizó una dilución 1:10 de la sangre y se montó sobre una cámara de Neubauer con líquido de Turk donde se realizaron los conteos correspondientes en los cuadrantes periféricos primarios. La cantidad de leucocitos por mm^3 se calculó dividiendo el número de células contadas entre el volumen total de los cuatro cuadrantes periféricos primarios y multiplicado por el factor de dilución:

$$\frac{\text{leucocitos}}{\text{mm}^3} = (\# \text{ leucocitos contados}) \left(\frac{1}{0.4 \text{ mm}^3} \right) \quad (10)$$

B.3. Análisis de datos

Los eventos capturados por el citómetro se analizan con el uso de gráficos, en este caso se usaron gráficos de puntos y se obtuvieron los porcentajes de cada población. Después se calcularon los números absolutos de Monocitos, Neutrófilos y Linfocitos. Dentro de éstos últimos se obtuvieron también Linfocitos B, T CD4+, T CD8+ y NKs considerando el número de Leucocitos totales según el conteo en la cámara de Neubauer y el porcentaje obtenido en los gráficos del análisis por citometría. En la **figura 4** se muestra el análisis con los gráficos para las DNTs, en la **figura 5** de los Linfocitos T (CD4+ y CD8+), en la **figura 6 y 7** para las poblaciones Leucocitarias en general y en particular para los Linfocitos B en la **figura 6** y para las NKs en la **figura 7**.

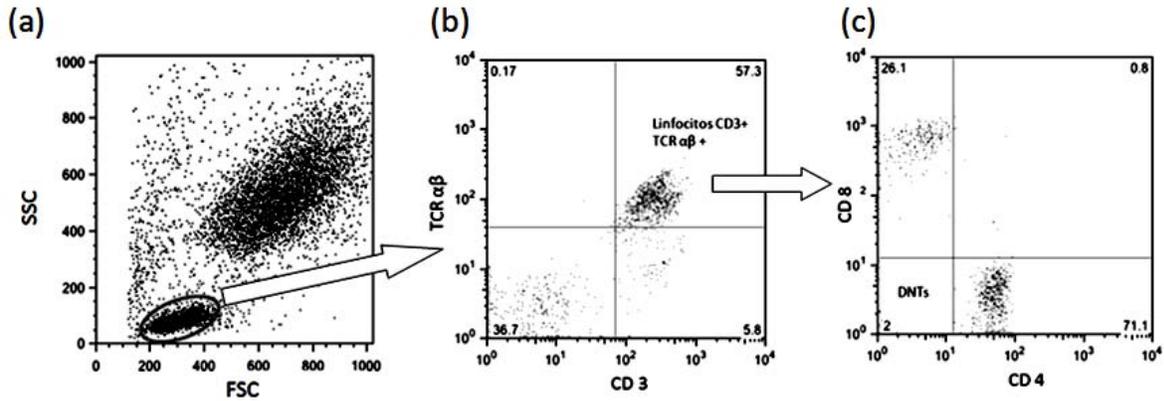


Figura 4. Selección de regiones y análisis de las células DNTs. (a) En un gráfico de puntos que incluía los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos. (b) La población obtenida en (a), se analizó en un nuevo gráfico de acuerdo a los marcajes con anticuerpos contra CD3 y el TCR. Esto con la finalidad de seleccionar la región que contenía a las células que expresaban CD3 y TCR. (c) Finalmente, con esta población se realizó otro gráfico en el que se analizó la expresión de CD4 y CD8 para hallar el porcentaje de las DNTs.

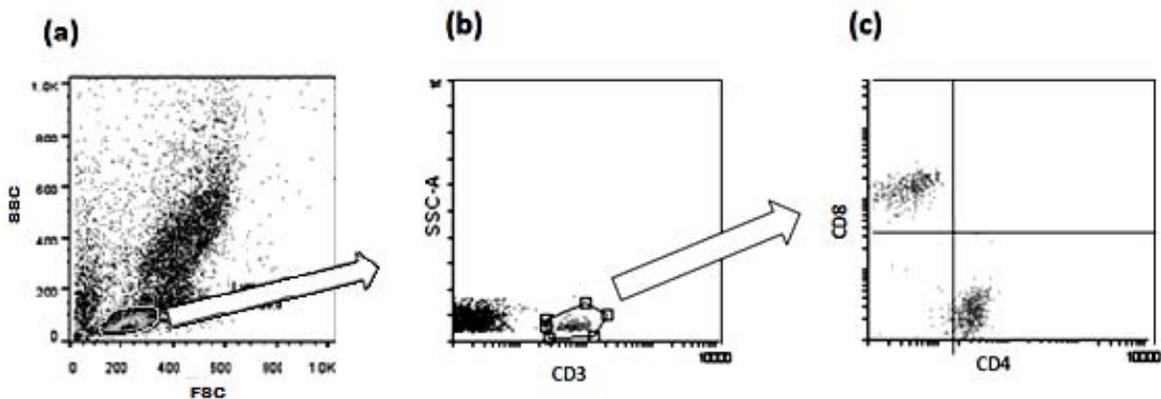


Figura 5. Selección de regiones y análisis de células T CD4+ y CD8+. (a) En un gráfico de puntos que incluía los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos. (b) De la población de linfocitos se seleccionan aquellos que expresaban CD3, es decir los linfocitos T y finalmente (c) se analizó la expresión de CD4 y CD8.

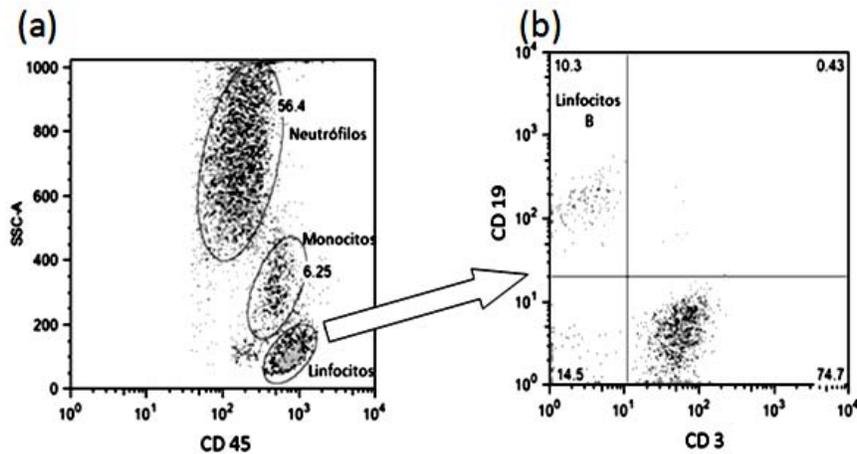


Figura 6. Selección de regiones y análisis de células B totales. **(a)** En un primer gráfico se analizaron los parámetros de granularidad y la fluorescencia emitida por los anticuerpos conjugados anti-CD45 para diferenciar a las poblaciones leucocitarias y seleccionar la región de los Linfocitos. **(b)** De esta región se generó un segundo gráfico en el que se evaluaba la expresión de CD19 y CD3 para encontrar el porcentaje de Linfocitos B (aquellos que expresan CD19 pero no CD3) dentro de los Linfocitos totales.

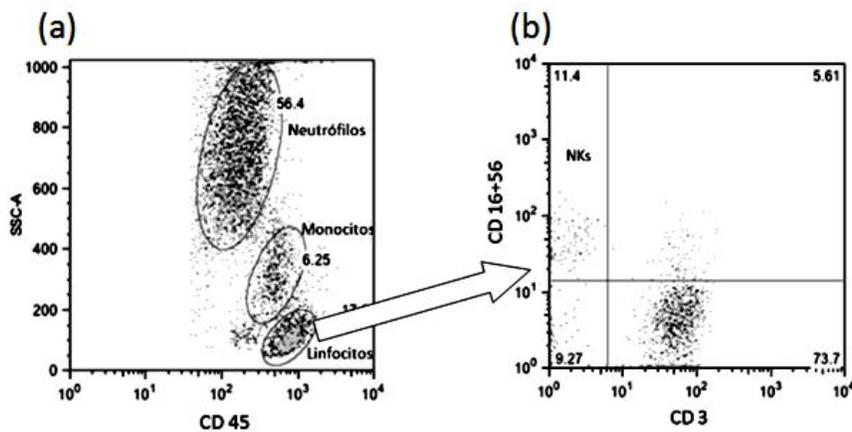


Figura 7. Selección de regiones y análisis de células NK. **(a)** Como con los Linfocitos B, en el primer gráfico se analizaron los parámetros de granularidad y la fluorescencia emitida por los anticuerpos conjugados anti-CD45 para diferenciar a las poblaciones leucocitarias y seleccionar la región de los Linfocitos. **(b)** De esa región se analizó la expresión de CD3 y de CD16+56 para obtener el porcentaje de células NK (aquellas que no expresan CD3 pero si CD16 y CD56) dentro de los Linfocitos totales.

C. Tinción de Fas

C.1. Determinación de Fas

Se mezclaron 50 μ L de sangre completa con 15 μ L de anticuerpo anti CD95(Fas)-PE y 3 μ L de anticuerpo anti CD3-PerCP. Se dejaron incubar 30 minutos protegidos de la luz y a temperatura ambiente y finalmente se lisaron los eritrocitos utilizando solución de lisis comercial (BD). Las muestras se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 1%. Se adquirieron 10,000 eventos utilizando un FACs Aria (BD), incluyendo los respectivos controles de isotipo.

C.2. Análisis de datos

Los eventos capturados en el citómetro se evaluaron usando histogramas de frecuencia e intensidad de fluorescencia y comparando con un testigo y el control de isotipo. La selección de regiones para este análisis se muestra en la **figura 8**.

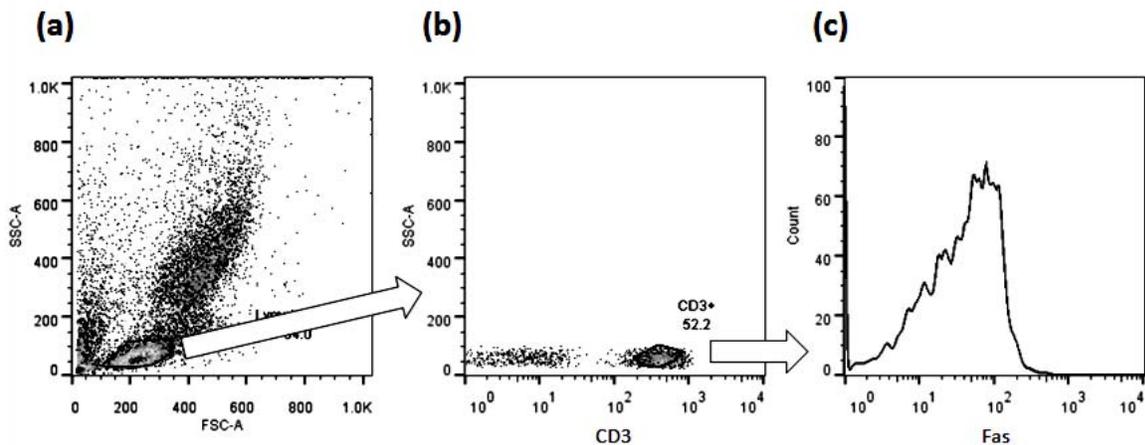


Figura 8. Selección de regiones para analizar la expresión de Fas. **(a)** En un gráfico de tamaño (FSC) contra granularidad (SSC) se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos. **(b)** La población obtenida en (a) se analizó en un nuevo gráfico de acuerdo a el marcaje con el anticuerpo monoclonal contra CD3. Esto con la finalidad de seleccionar la región que contenía a las células que expresaban CD3 (es decir los linfocitos T). **(c)** Finalmente, con esta población se realizó otro gráfico, pero esta vez se trataba de un histograma de frecuencia para las células que expresaran Fas.

D. Procesamiento de muestras destinadas para secuenciación

D.1. Purificación de Células Mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

En tubos estériles se colocó la solución de Ficoll (Lymphoprep®) y lentamente sobre éste, la sangre anticoagulada en una proporción de 1:2 respectivamente. Se centrifugó a 500 g durante 30 minutos ajustando la aceleración y desaceleración del rotor para que fueran lentas. Después se retiró la capa de mononucleares y se les hicieron lavados con PBS 1X estéril centrifugando a 500 g durante 5 minutos y decantando los sobrenadantes. El botón obtenido en el lavado final se resuspendió con 1 mL de PBS 1X y se realizó la cuantificación de las células obtenidas empleando Azul de Tripano como colorante y haciendo una dilución 1:10 con éste y la suspensión celular (la dilución fue sujeta a cambio en caso de que dicha dilución no fuera la adecuada para realizar el conteo). Esta mezcla se montó en una cámara de Neubauer y se observó con el microscopio óptico contando las células presentes en los cuadros primarios periféricos y realizando los cálculos correspondientes de acuerdo a la cuenta efectuada, la dilución y los cuadrantes empleados.

D.2. Estimulación de células T para inducir la expresión de FasL

Se colocaron en tubos estériles 3.5×10^6 PBMCs suspendidas en 500µL de Medio RPMI-1640 y se adicionaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD3 y CD28 y se incubaron durante 14-16 horas a 37°C con 5% de presión de CO₂.

D.3. Extracción de RNA y conversión a cDNA

Se centrifugaron las suspensiones de PBMCs (aproximadamente 1×10^6 células) a 1,500 g durante cinco minutos. El sobrenadante de cada uno se retiró y al botón se le agregaron 500µL de Trizol® mezclando con la pipeta varias veces dentro del tubo. Después se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos y se adicionaron 100µL de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 50:1 para posteriormente agitar en el vortex. Tras incubar 2 minutos en hielo se centrifugó a 13,000 g por 15 minutos y 8°C de

temperatura. Se rescató la fase acuosa y se colocó en otro tubo donde se le adicionaron 200 μ L de isopropanol agitando por inversión. Nuevamente se incubó en hielo pero esta vez 10 minutos y se centrifugó a 13,000 g por 10 minutos a 8°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con 50 μ L de etanol al 75% dos veces, centrifugando cada vez a 5,000 g por 5 minutos a 8°C. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar completamente para eliminar cualquier resto de Etanol y poder resuspender el botón de RNA en 20 μ L de agua libre de nucleasas.

Puesto que el RNA es muy lábil, se prosiguió a convertir el RNA extraído en cDNA mediante un RT-PCR. Para ello, primero se cuantificó el RNA obtenido en cada caso usando en un sistema Epoch de BioTek®.

Una vez cuantificado el RNA, se preparó la mezcla de reacción para la RT-PCR que incluía 1 μ g de RNA, 1 μ L del iniciador oligo dT a 40 μ M, 1 μ L de dNTPs a 10mM y agua libre de nucleasas para completar un volumen de 17 μ L. Esta mezcla se colocó en el termociclador dejando correr el programa indicado en la **tabla 6** hasta el término de los 5 minutos a 73°C. En ese momento se dejó bajar la temperatura a 42°C para adicionar los elementos faltantes que fueron 1 μ L de retrotranscriptasa (RT) a 200U/ μ L y 2 μ L del buffer 5X. Una vez completa la mezcla de reacción se continuó el programa. Todos los reactivos utilizados pertenecen al kit de Fermentas® en el que está incluida la enzima RT. Los cDNAs obtenidos por la técnica anterior se almacenaron a -30°C, hasta que fueron utilizados.

Tabla 6. Programa para realizar RT-PCR

Temperatura	Tiempo
73°C	5 minuto
42°C	60 minutos
90°C	10 minutos
4°C	∞

D.4. Extracción y purificación de DNA genómico de sangre periférica

Para eliminar a los eritrocitos, se lisaron empleando una solución de lisis compuesta por NH_4CO_3 a 9.75×10^{-3} M y NH_4Cl a 0.14M y en una proporción de 5:1 respecto a la sangre, e incubando en hielo por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 500 g por 5 minutos decantando el sobrenadante para agregar de nuevo la solución de lisis de eritrocitos y repetir la incubación y centrifugación. Los leucocitos obtenidos en el botón se lisaron a continuación adicionando la solución de lisis de leucocitos comercial (Qiagen®) y agitando en vórtex. Después se le adicionó un volumen de la solución comercial para precipitar proteínas (Qiagen®) equivalente a 1/3 del volumen que se encontraba en el tubo y se agitó nuevamente en vortex hasta obtener un aspecto lechoso en la suspensión. Esto se centrifugó a 1,300 g durante 10 minutos rescatando el sobrenadante y midiendo su volumen para adicionarle un volumen igual de isopropanol. Esta mezcla se agitó por inversión hasta verse un discreto precipitado compacto. Finalmente se centrifugó a 17,000 g durante 10 minutos, eliminando el sobrenadante y haciendo lavados con 500µL de etanol al 75% en los cuales se centrifugaron también a 17,000 g durante 10 minutos. El botón del último lavado se dejó secar y se resuspendió en agua libre de nucleasas. El gDNA obtenido se cuantificó con el sistema Epoch y se almacenó a -30°C hasta su uso.

E. Búsqueda de mutaciones en, *FAS* y *FASLG*

E.1. Amplificación de *FAS* y *FASLG* a partir de cDNA

Se diseñaron primers utilizando el programa Primosequencing 3.4 disponible en línea para amplificar el mRNA de *FAS* y, *FASLG* por medio de PCR, y se estandarizaron las condiciones adecuadas para dicho fin. La secuencia de dichos primers y la temperatura de alineamiento empleada con cada par se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Primers empleados para amplificar los mensajeros de *FAS* y *FASLG*

SECUENCIA			Tm
FAS			
Par1	Fw	AGGTGTTCAAAGACGCTTCTGG	66°C
	Rv	GGTGCAAGGGTCACAGTGTACA	
Par2	Fw	ACTGTATGTGAACACTGTGACCC	62°C
	Rv	ACCAAGCAGTATTTACAGCCAG	
FASLG			
Par1	Fw	AGCCTCTACAGGACTGAG	65°C
	Rv	ACCTTGAGTTGGACTTGC	
Par2	Fw	TACAGAAGGAGCTGGCAG	64°C
	Rv	ACATTTTGAACCCTGTGGT	

La mezcla de reacción para la PCR se realizó con reactivos de *New England BioLabs*[®] como sigue: 2.5 µL del Buffer 10X sin Mg, 1.5 µL de MgCl₂ 25mM, 0.5 µL de dNTPS 10 mM, 0.2 µL de Primers Forward y 0.2 µL de Reverse, ambos a 25 µM, 0.125 µL de enzima Taq polimerasa a 5000U/mL, 1 µL de cDNA obtenido para cada paciente y agua libre de nucleasas para completar 25 µL. El programa utilizado en el termociclador se indica en la **tabla 8**.

Tabla 8. Programa empleado para amplificar *FAS* y *FASLG* a partir de cDNA.

Temperatura	Tiempo	35 ciclos
95°C	5 minutos	
95°C	30 segundos	
T. de alineamiento de cada par de primers	30 segundos	
68°C	45 segundos	
68°C	7 minutos	
4°C	∞	

Los productos de PCR se comprobaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%.

E.2. Amplificación de *FAS* y *FASLG* a partir de gDNA

Se diseñaron primers para amplificar *FAS* y *FASLG* a partir de DNA genómico por medio de PCR, y se estandarizaron las condiciones adecuadas para tal fin. La secuencia de dichos primers y la temperatura de alineamiento empleada con cada par se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Primers empleados para amplificar los genes de *FAS*, *FASLG*

SECUENCIA			Tm
<i>FAS</i>			
E1	Fw	TGTGCAACGAACCCTGACTCC	60°C
	Rv	AAAAGCAAGTCCTCCAGCGTTC	
E2	Fw	GCTTCTATCATTTCATGGTGCTG	57°C
	Rv	TCTCATTTTCAGAGGTGCATGTC	
E3	Fw	TTTGTCTTGGGAGACTTTCTGTC	57°C
	Rv	CTCATAAAGGTCTAGACCAGTAG	
E4	Fw	GAGACGTCTAAGTATTGGTGAG	56°C
	Rv	CCAGCAAAGTGTCACCTACAC	
E5-6	Fw	TTGAAGGAATACGTTTGCCAGAG	56°C
	Rv	TTCTTATCAGTCAGCTCTCAAGG	
E7	Fw	AGCGGTCTCCTGCGATGTTTG	57°C
	Rv	GTAACAGGCCCGGATGTGATGG	
E8	Fw	CGAGAAAAGAAACCAGTTGCAC	57°C
	Rv	CTGAGCAGGTAGAATTGTATGAG	
E9	Fw	GGATTTGGAGTTAGAACTCAAGG	57°C
	Rv	TCCTTGGAGGCAGAATCATGAG	
<i>FASLG</i>			
E1	Fw	AGCTTGCCTCCTCTTGAGCAG	60°C
	Rv	CCTATGAGCCTCCATTTCTCTG	
E2	Fw	TCCAAATCACAAAAGTGGGAC	57°C
	Rv	GTGTGTCTCTTCCAAAGTCAAG	
E3	Fw	AGGGTTGTGGTGAGTTCTAAATG	60°C
	Rv	TGTGTTTATAAAGACTGACTCGAC	
E4	Fw	CAGTTCTATACCAGCTGTCATTC	57°C
	Rv	TTTGAACCCTGTGGTCAAGG	

El programa para el termociclador fue el mismo que el usado para amplificar los mensajeros (**tabla 8**). Así mismo, la mezcla de reacción fue similar con la variante que en lugar de cDNA se empleó gDNA.

E.3. Purificación de los productos de PCR

Para eliminar aquellos constituyentes de la PCR que pudieran afectar la reacción de secuenciación, se preparó una mezcla de reacción de digestión enzimática en el mismo tubo en el que se encuentran los productos de PCR con 1 μ L de Exonucleasa I a 20U/ μ L, 0.2 μ L de Fosfatasa alcalina (TSAP) a 1U/ μ L y 2 μ L de Buffer 5X correspondiente al kit de Fermentas® en el que vienen las enzimas. El programa que se utiliza se indica en la **tabla 10**.

Tabla 10. Programa para la purificación de los productos de PCR

Temperatura	Tiempo
37°C	15 minutos
80°C	15 minutos
10°C	∞

Esta digestión sólo se realizó en los productos que fueron secuenciados directamente previo a la clonación.

E.4. Clonación de los productos de PCR.

Sólo algunos productos de PCR obtenidos a partir de cDNA se clonaron. Lo anterior debido a que se requería optimizar la señal percibida en el electroferograma de algunas reacciones de secuenciación pues en los geles particularmente de los productos obtenidos con el par 2 de primers para *FAS* se observaba un subproducto de talla molecular cercana a la del producto principal. Para esto se utilizó el kit de Invitrogen TOPO® TA Cloning® y para purificar el plásmido se empleó el kit Nucleospin® Plasmid de MACHEREY-NAGEL.

El proceso de clonación inició con la incorporación del inserto (que en este caso fue nuestro producto de PCR fresco) a un vector plasmídico linearizado llamado pCR-II TOPO®.

Este vector posee en sus extremos timinas libres que se aparean con las adeninas libres añadidas al final de los insertos por la enzima polimerasa usada en las PCRs, también tiene una enzima topoisomerasa unida covalentemente que realiza la ligación de los extremos apareados y finalmente contiene genes de resistencia a ampicilina y kanamicina que permiten seleccionar a las bacterias transformadas si se incorpora alguno de estos antibióticos al medio de cultivo, así mismo, contiene el gen *lacZ-α* que codifica para la β-galactosidasa y que permite detectar a las bacterias que tengan plásmidos con el inserto incorporado pues al estar el sitio de inserción justamente a la mitad del gen *lacZ-α*, lo interrumpe dejándolo no funcional por lo que la bacteria no puede degradar la lactosa. Para evidenciar este fenómeno, una molécula análoga a la lactosa es incorporada al medio de cultivo llamada X-gal que la β-galactosidasa puede reconocer y descomponer, sin embargo, los productos no son galactosa y glucosa como ocurriría con una molécula de lactosa común, sino galactosa y un colorante azul que tiñe a las colonias de bacterias que pudieron asimilar el X-gal identificándolas como no portadoras del inserto.

Para verificar que las bacterias de las colonias sin color azul realmente contuvieran el plásmido con el fragmento de PCR incorporado se realizaron PCRs de colonia empleando los primers incluidos en el kit de clonación y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Para el PCR de colonia se empleó el programa para el termociclador indicado en la **tabla 11** y una mezcla de reacción que contenía un poco de la colonia a evaluar resuspendida en 6μL de agua libre de nucleasas y los elementos de una PCR común.

Tabla 11. Programa para la amplificación de los productos de clonación

Temperatura	Tiempo	35 ciclos
95°C	5 minutos	
95°C	1 minuto	
55°C	1 minuto	
68°C	1 minuto	
68°C	7 minutos	
4°C	∞	

E.5. Secuenciación

Las reacciones de secuenciación se realizaron con el kit Big Dye 3.1 de Applied Biosystems® incluyendo en la mezcla de reacción: 0.5µL de Big Dye, 1µL de primer (forward o reverse) a 10µM, 1µL de buffer 5X, 40 ng de producto de PCR y el volumen de agua libre de nucleasas para completar 6µL de volumen final. El programa que se utilizó en el termociclador se resume en la **tabla 12**.

Tabla 12. Programa para la reacción de secuenciación.

Temperatura	Tiempo	40 ciclos
96°C	6 minutos	
96 °C	10 segundos	
Temperatura de alineamiento	5 segundos	
60°C	4 minutos	
60°C	10 segundos	
4°C	∞	

Las reacciones de secuenciación fueron purificadas con el kit de purificación Big Dye X Terminator® de Invitrogen y leídas en un secuenciador.

VII. RESULTADOS

A. Resumen clínico de los pacientes analizados

En la **tabla 13** se presentan los datos más relevantes de los resúmenes clínicos de cada paciente analizado. Todos los pacientes presentaban la característica de adenopatías y/o esplenomegalia que es un criterio requerido para el diagnóstico de ALPS y en la mayoría de los casos también había características que pueden presentar los pacientes con ALPS pero que no son exclusivos de esta patología como las citopenias autoinmunes y en el caso del P6 niveles plasmáticos de vitamina B12 elevados.

Tabla 13. Resumen de las características clínicas de los pacientes analizados

PACIENTE	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
P1	<p>Paciente masculino de 1 año y medio con padres consanguíneos (primos en segundo grado), hermana fallecida sin diagnóstico a los 10 meses y hermano fallecido al 1 año 3 meses, 4 hermanos aparentemente sanos de más de 14 años de edad y un hermano de 11 años con dilatación esofágica congénita. Presentaba hepatoesplenomegalia, adenomegalias en cadena ganglionar anterior del lado izquierdo y derecho, también en las axilas y en las regiones inguinales y bicitopenia a base de eritrocitos y plaquetas. Una biopsia de ganglio cervical y hepática muestra un acúmulo de células plasmáticas inmunoblastos plasmoblastos y linfocitos T, así como manifestaciones de autoinmunidad. Las manifestaciones iniciaron a los 9 meses con distensión abdominal y constipación sin fiebre, presentando adenopatía generalizadas de 3x3 cm, dolorosas a nivel de cadena ganglionar anterior y axilas. CMV negativo. EBV negativo. VIH negativo. Posteriormente presentó cuadro de gastroenteritis con evacuaciones disminuidas en consistencia y anemia hemolítica normocítica por lo que se le transfundió con paquete globular. Dos meses después fue hospitalizado porque presentó un cuadro de infección en vías áreas superiores. Y continuó con manifestaciones diversas como exantema probablemente infeccioso, faringitis, entre otros. Finalmente se le practicó un trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas con esquema de acondicionamiento mieloablativo con Busulfan y Ciclofosfamida</p>

P2	Paciente femenino de 3 años cuyo padecimiento inició por crecimiento de masa a nivel maxilar izquierdo y pérdida de peso. Presentaba lesiones eritematosas evanescentes con duración de menos de 24 hrs, que remiten con loratadina. Abdomen con esplenomegalia de 3 cm. Ganglios inguinales bilaterales de 1 cm no dolorosos, axilares 1 cm no dolorosos, cervicales izquierdo de 3cm, móvil no doloroso y derecho de 1.5cm no doloroso. Serología positiva para EBV exopto IgM, sospecha de infección crónica por éste.
P3	Paciente masculino de 14 años con hepatoesplenomegalia. En su historial existe un episodio febril que remitió con tratamiento. Datos clínicos iniciales de inmunodeficiencia con déficit de subclases de IgG, bronquiectasias, diarreas recurrentes. Linfocitos B bajos con CD3 y CD4 elevados. Biopsia hepática reportada con cirrosis, y la biometría hemática indica anemia y trombocitopenia. Se le dió tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas.
P4	Paciente masculino de 11 años con antecedentes de infecciones de vías aéreas superiores, así como otitis de larga evolución y difícil manejo, dos episodios al año, con absceso axilar a los 7 meses de edad, posteriormente en ingles, piernas, pies y brazos uno o dos episodios por año tratados ambulatoriamente. Cursa con gingivitis de células plasmáticas, bicitopenia: neutropenia y anemia, eosinofilia, periodontitis y sialoadenitis. La biopsia de ganglio submandibular y cervical profundo reportó sialoadenitis crónica leve e hiperplasia folicular reactiva. Prueba de Coombs directo (+) y niveles dentro del rango de vitamina B12. Se le realizó un aspirado de médula ósea que fue negativo a infiltración neoplásica pero se reportó detención en la maduración de la serie mieloide. Por serología se demostró que era HIV(-)
P5	Paciente masculino de 3 años con padres consanguíneos. Presenta fiebre persistente desde los 8 meses y presencia de adenomegalias, se descartó proceso hemato-oncológico. También presenta vasculitis. Tiene antecedente de infección por EBV. Presenta hipergammaglobulinemia, así como respuesta al tratamiento de inmunomodulación con IVGG.
P6	Paciente masculino de 13 años con un episodio en su historial de fiebre, tos, rinorrea y otorragia de 8 días de evolución, además de tener antecedentes de pancitopenia, epistaxis, gingivorragias, lesiones equimóticas y petequiales desde los 2 años, aproximadamente 2 veces al mes, acompañado de úlceras en mucosas, dolorosas con remisiones espontáneas. Un aspirado de médula ósea mostró hipocelularidad y predominio de linfocitos. Resultó VIH(-), CMV(-), EBV(-). La prueba de anticuerpos antinucleares fue positiva, así como la de Coombs directo. Presentaba IgG elevada y plaquetopenia y niveles elevados de vitamina B12 plasmáticos. Al momento de acudir a la unidad estaba en tratamiento con prednisona.

P7	Paciente masculino de 1 año. El inicio de signos y síntomas fue un episodio de fiebre de hasta 42°C de difícil control, además presentaba anemia y plaquetopenia, reacciones febriles(-), HIV(-), Coombs directo(+), TORCH(-), inmunoglobulinas elevadas, presencia de adenopatías cervicales y axilares y hepato-esplenomegalia. El servicio de hematología descartó que se tratase de una enfermedad maligna proliferativa
----	--

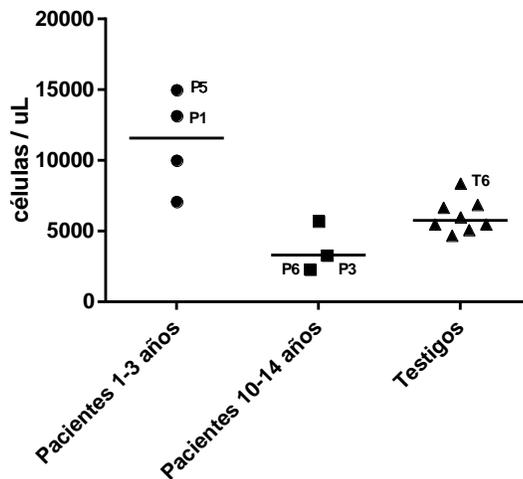
B. Resultados de las poblaciones leucocitarias y las células DNTs

Primero se buscó usar como criterio de selección a las células DNTs, para lo cual se obtuvieron muestras de sangre periférica por venopunción de los pacientes y se realizó una tinción superficial para FACS con ese fin. Sin embargo, debido a que no existen valores de referencia absolutos de las células DNTs (sólo en porcentaje), los resultados deben situarse en un contexto descriptivo del estado del paciente lo más completo posible, por lo tanto, la tinción de células DNTs no fue la única que se realizó, también se realizaron tinciones para evaluar otras poblaciones leucocitarias.

En la **tabla 14**, así como en la **gráfica 2** se muestran los valores absolutos de la cuenta total de leucocitos en pacientes y testigos respectivamente. Los resultados que se encuentran fuera en rango de los valores de referencia están sombreados aquí y en el resto de las tablas. Cabe mencionar que los testigos fueron usados como un medio de validación de los resultados obtenidos con los pacientes y no como referencia de los valores de cada población pues eran individuos sanos no pediátricos, a diferencia de los pacientes. Podemos resaltar la leucopenia marcada del P3 y en un nivel menor del P6. Por el contrario P1 y P6 muestran leucocitosis. En el caso del T6 se observa que está sobre el valor superior de referencia sin embargo no es una diferencia muy grande.

Tabla 14. Leucocitos totales en sangre periférica de los pacientes y testigos

PACIENTE	CÉLULAS $\times 10^3 / \mu\text{L}$	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS/ μL	TESTIGO	CÉLULAS $\times 10^3 / \mu\text{L}$	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS/ μL
P1	13,150	6,400-12,000	T1	6,000	4,400-8,100
P2	10,000	5,200-11,000	T2	5,500	4,400-8,100
P3	2,310	4,400-8,100	T3	6,900	4,400-8,100
P4	5,700	4,400-8,100	T4	6,700	4,400-8,100
P5	15,000	5,200-11,000	T5	5,500	4,400-8,100
P6	3,300	4,400-8,100	T6	8,400	4,400-8,100
P7	7,100	6,400-12,000	T7	-----	4,400-8,100
-----	-----	-----	T8	4,700	4,400-8,100
-----	-----	-----	T9	5,100	4,400-8,100

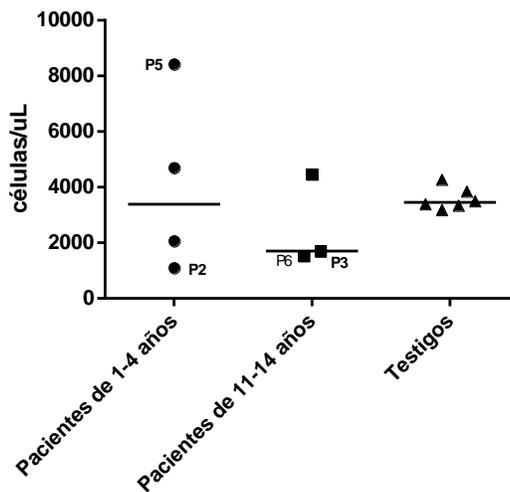


Gráfica 2. Leucocitos totales en la sangre de los pacientes distribuidos por grupo de edades y los testigos.

En la **tabla 15**, así como en la **gráfica 3** se muestran los resultados de la cuenta de neutrófilos de pacientes y testigos. El P2 , el P3 y el P6 presentan números de neutrófilos por debajo del límite inferior de los valores para su edad respectiva mientras que el P5 se encuentra ligeramente por encima del límite superior. Por lo tanto la leucopenia de P3 y P6 es en parte a base de los neutrófilos.

Tabla 15. Neutrófilos en sangre periférica de los pacientes y testigos

PACIENTE	CÉLULAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS/ μL	TESTIGO	CÉLULAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS/ μL
P1	4,708	1,000-7,000	T1	3,510	2,000-7,000
P2	1,100	1,500-8,000	T2	3,196	2,000-7,000
P3	1,707	2,000-7,000	T3	3,864	2,000-7,000
P4	4,469	2,000-8,000	T4	3,404	2,000-7,000
P5	8,430	1,500-8,000	T5	3,355	2,000-7,000
P6	1,541	2,000-7,000	T6	4,284	2,000-7,000
P7	2,073	1,000-7,000	T7	-----	2,000-7,000
-----	-----	-----	T8	-----	2,000-7,000
-----	-----	-----	T9	-----	2,000-7,000

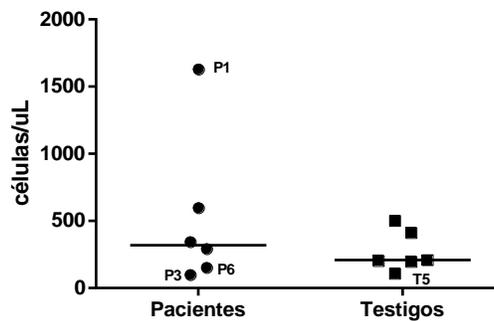


Gráfica 3. Neutrófilos en sangre periférica de los pacientes distribuidos por grupo de edad y los testigos.

En la **tabla 16**, así como en la **gráfica 4** se muestran los valores de los monocitos en sangre periférica de los paciente y testigos. En este caso no se dividieron en grupos por edad a los pacientes porque los valores de referencia empleados eran los mismos para las edades consideradas. En cuanto a los resultados, el P1 es el único que presenta una elevación en estos, mientras que los niveles del P3 y 6 estaban por debajo de los valores de referencia.

Tabla 16. Monocitos en sangre periférica de los pacientes y testigos

PACIENTE	CÉLULAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS $/\mu\text{L}$	TESTIGO	CÉLULAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS $/\mu\text{L}$
P1	1,631	200-1,000	T1	213	200-1,000
P2	345	200-1,000	T2	205	200-1,000
P3	100	200-1,000	T3	414	200-1,000
P4	-----	200-1,000	T4	199	200-1,000
P5	599	200-1,000	T5	110	200-1,000
P6	154	200-1,000	T6	504	200-1,000
P7	294	200-1,000	T7	-----	-----
-----	-----	-----	T8	-----	-----
-----	-----	-----	T9	-----	-----

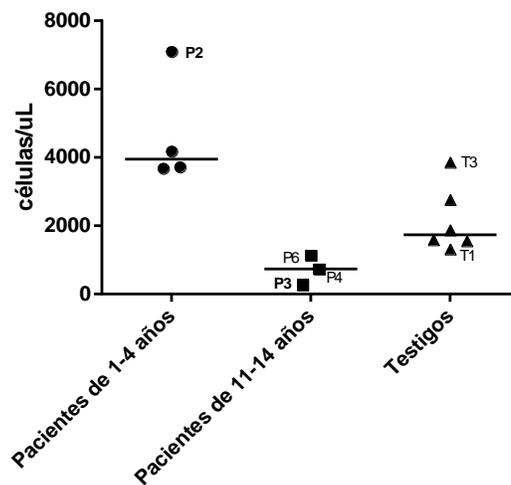


Gráfica 4. Monocitos en sangre periférica de los pacientes y testigos

En la **tabla 17**, así como en la **gráfica 5** se muestran los valores de linfocitos totales en sangre periférica de los pacientes y los testigos. Presentan una linfopenia importante tanto P3 como P4 pero P6 sólo está ligeramente por debajo del valor inferior de referencia al igual que T1. P2 y T3 presentan elevación en sus linfocitos totales pero en el caso de P2 es una linfocitosis marcada.

Tabla 17. Linfocitos totales en sangre periférica de los pacientes y testigos

PACIENTE	CÉLULAS x10 ³ /μL	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS /μL	TESTIGO	CÉLULAS x10 ³ /μL	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS/μL
P1	3,721	3,600-8,900	T1	1,320	1,400-3,300
P2	7,100	2,300-5,400	T2	1,562	1,400-3,300
P3	268	1,400-3,300	T3	3,864	1,400-3,300
P4	735	1,900-3,700	T4	1,883	1,400-3,300
P5	4,185	2,300-5,400	T5	2,772	1,400-3,300
P6	1,135	1,400-3,300	T6	1,595	1,400-3,300
P7	3,685	3,600-8,900	T7	-----	1,400-3,300
-----	-----	-----	T8	-----	1,400-3,300
-----	-----	-----	T9	-----	1,400-3,300

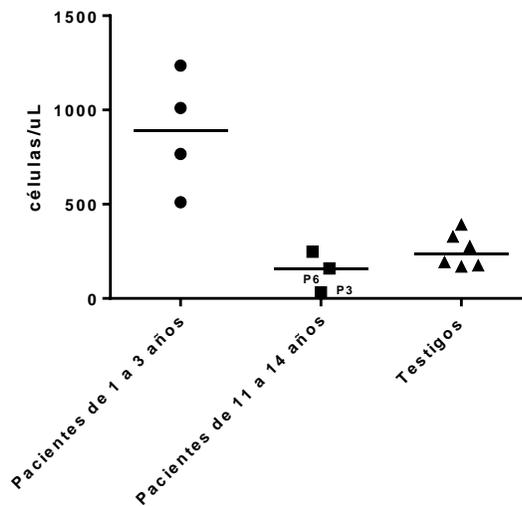


Gráfica 5. Linfocitos totales en sangre periférica de pacientes y testigos

En la **tabla 18**, en conjunto con la **gráfica 6** se muestran los valores de linfocitos B en sangre periférica de pacientes y testigos.

Tabla 18. Linfocitos B en sangre periférica de los pacientes y testigos

PACIENTE	CÉLULAS $\times 10^3 / \mu\text{L}$	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS/ μL	TESTIGO	CÉLULAS $\times 10^3 / \mu\text{L}$	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS/ μL
P1	1,235	600-3,100	T1	193	90-600
P2	767	200-2,100	T2	169	90-600
P3	32	200-600	T3	328	90-600
P4	248	200-600	T4	392	90-600
P5	511	200-2,100	T5	175	90-600
P6	159	200-600	T6	277	90-600
P7	1,010	600-3,100	T7	-----	90-600
-----	-----	-----	T8	-----	90-600
-----	-----	-----	T9	-----	90-600

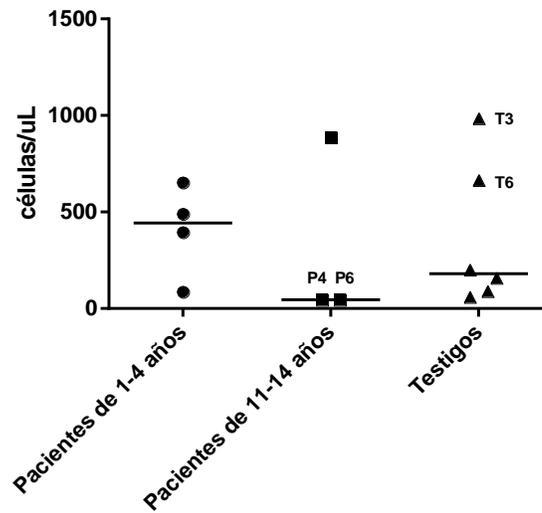


Gráfica 6. Linfocitos B en sangre periférica de los pacientes y testigos

En la **tabla 19**, así como en la **gráfica 7** se muestran los valores de células NK en sangre periférica de pacientes y testigos. Los conteos de P4 y P6 están por debajo de los valores de referencia mientras que los de T3 y T6 se encuentran elevados.

Tabla 19. Células NK en sangre periférica de los pacientes y testigos

PACIENTE	CÉLULAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS / μL	TESTIGO	CÉLULAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS/ μL
P1	491	200-1,200	T1	202	90-600
P2	396	100-1,000	T2	90	90-600
P3	887	70-1,200	T3	985	90-600
P4	45	70-1,200	T4	60	90-600
P5	653	100-1,000	T5	159	90-600
P6	46	70-1,200	T6	665	90-600
P7	87	200-1,200	T7	-----	90-600
-----	-----	-----	T8	-----	90-600
-----	-----	-----	T9	-----	90-600

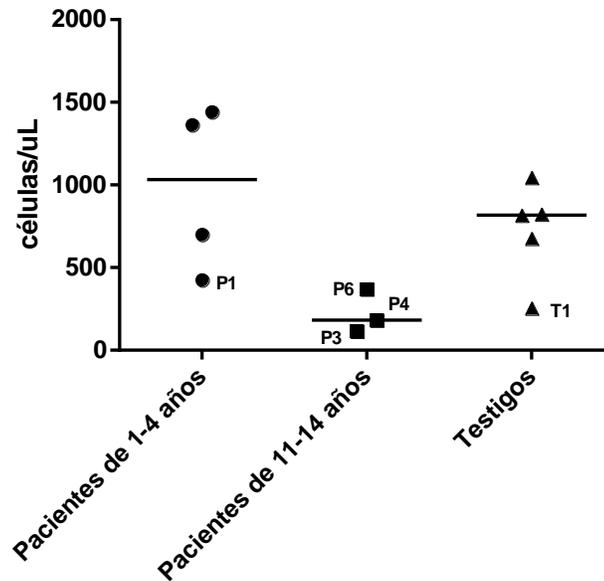


Gráfica 7. Células NK en sangre periférica de los pacientes y testigos

En la **tabla 20**, así como en la **gráfica 8** se presentan los valores de linfocitos T CD4+ encontrados en sangre periférica de pacientes y testigos. Los valores de linfocitos T CD4 de P1, P3 y P4, P6 y T1 se encuentran por debajo de los valores de referencia.

Tabla 20. Linfocitos T CD4+ en sangre periférica de los pacientes y testigos

PACIENTE	CÉLULAS x10 ³ /μL	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS /μL	TESTIGO	CÉLULAS x10 ³ /μL	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS/μL
P1	425	900-5,500	T1	255	300-1,400
P2	1,364	500-2,400	T2	677	300-1,400
P3	116	400-2,100	T3	1,045	300-1,400
P4	183	400-2,100	T4	478	300-1,400
P5	1,442	500-2,400	T5	817	300-1,400
P6	370	400-2,100	T6	824	300-1,400
P7	701	900-5,500	T7	-----	300-1,400
-----	-----	-----	T8	-----	300-1,400
-----	-----	-----	T9	-----	300-1,400

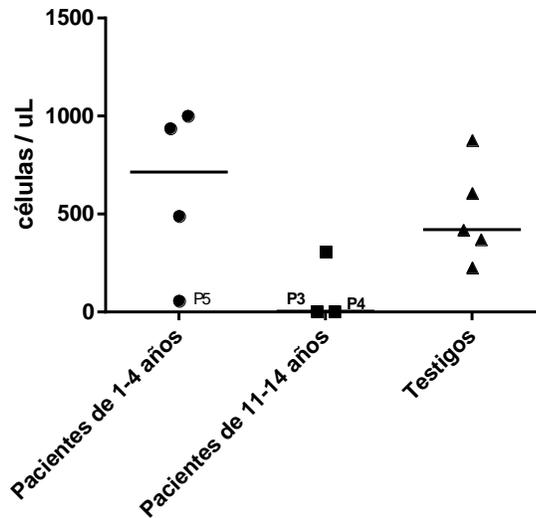


Gráfica 8. Linfocitos T CD4 en sangre periférica de pacientes y testigos

En la **tabla 21**, así como en la **gráfica 9** se presentan los resultados de los linfocitos T CD8 en sangre periférica de los pacientes y testigos. P3, P4 y P5 tuvieron niveles muy bajos de linfocitos TCD8.

Tabla 21. Linfocitos T CD8+ en sangre periférica de los pacientes y testigos

PACIENTE	CÉLULAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS / μL	TESTIGO	CÉLULAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	VALORES DE REFERENCIA CÉLULAS/ μL
P1	490	400-2,300	T1	228	200-900
P2	1,002	300-1,600	T2	372	200-900
P3	4*	200-1,200	T3	608	200-900
P4	4*	200-1,200	T4	691	200-900
P5	58	300-1,600	T5	878	200-900
P6	309	200-1,200	T6	421	200-900
P7	938	400-2,300	T7	-----	200-900
-----	-----	-----	T8	-----	200-900
-----	-----	-----	T9	-----	200-900

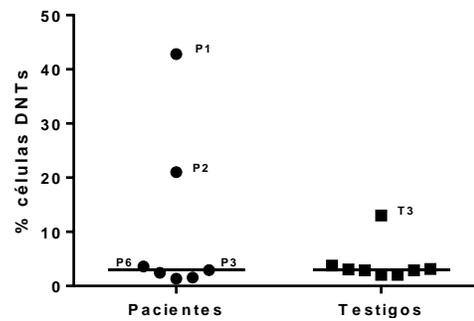


Gráfica 9. Linfocitos T CD8 en sangre periférica de los pacientes

En la **tabla 22**, así como en la **gráfica 10** se muestran los resultados de las células DNTs. Es de destacarse que éstas están ligeramente arriba de 2.5% en P3, P5, P6, T1, T4, T7, T8 y T9. Pero tienen una elevación muy evidente (>10%) el P1, P2 y T3.

Tabla 22. Células DNTs en sangre periférica de los pacientes

PACIENTE	CÉLULAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	PORCENTAJE	TESTIGO	CÉLULAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	PORCENTAJE
P1	677	42.8%	T1	19	3.77%
P2	1,002	21%	T2	22	2.06%
P3	4	2.93%	T3	247	13%
P4	4	1.57%	T4	25	3.06%
P5	58	2.44%	T5	39	2.06%
P6	26	3.59%	T6	-----	-----
P7	22	1.37%	T7	-----	2.91%
-----	-----	-----	T8	-----	3.14%
-----	-----	-----	T9	-----	2.91



Gráfica 10. Porcentaje de células DNTs de los pacientes y los testigos

C. Expresión de Fas

En la **figura 9** se muestran los histogramas de frecuencia con los que se analizó la expresión de Fas tanto del paciente 2 (a) como del paciente 6 (b). Puede observarse una separación muy marcada entre el histograma del control de isotipo y el del paciente 2 con su testigo, pero en el caso del paciente 6 y su testigo no se observa demasiada diferencia con respecto al control de isotipo.

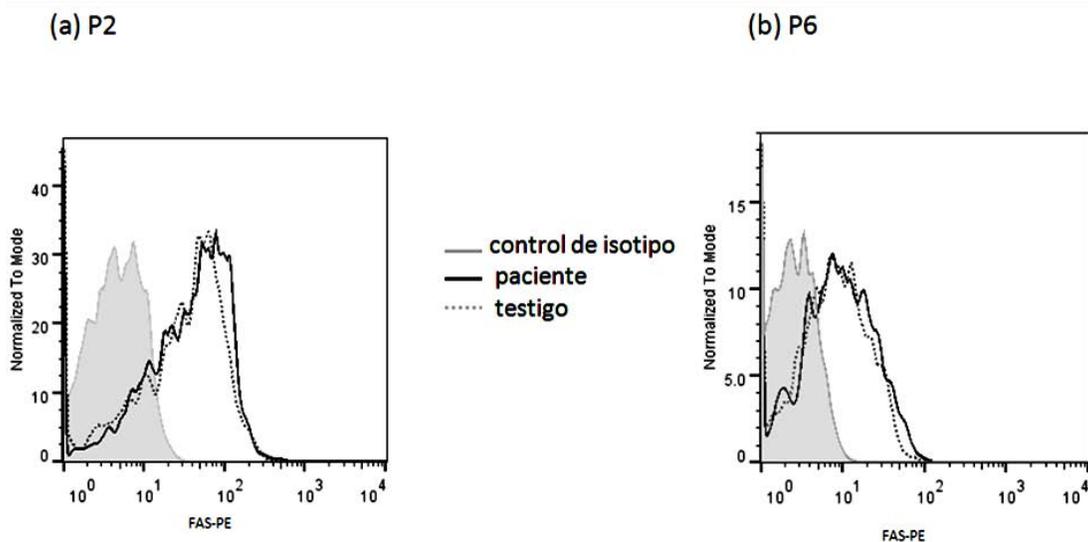


Figura 9. Histogramas de frecuencia para la expresión de Fas del P2 y del P6.

D. Resultados de PCR

Se amplificaron por medio de PCR los cDNAs de *FAS* y *FASLG* a partir del mRNA de los mismos. En la **figura 10** se muestran los gels de agarosa al 1% en los que se corrió la electroforesis de los amplicones obtenidos usando el par 1 de primers dirigidos contra el mRNA de *FAS* correspondiente al P1, al P2 y al P6, mientras que en las **figuras 11** y **12** se muestran los amplicones obtenidos usando el par 2 para los mismos pacientes. En el caso del P1 se detectó una banda adicional en los amplicones realizados con el par 2 de primers

por lo que se realizó una segunda corrida electroforética en un gel al 2% para lograr una mejor resolución de las bandas y corriendo a la vez amplicones de testigos obtenidos con el mismo par de primers. Aquí se observó que si bien en los testigos se encontraba la banda adicional a la esperada, ésta se encontraba aparentemente en menor proporción en los testigos que en el P1 por lo que se decidió purificarla por medio de clonación en un sistema bacteriano cuya PCR de colonia se muestra en la **figura 14**. Por otro lado, del P2 y del P6 se amplificó también *FASLG* (**figura 13**).

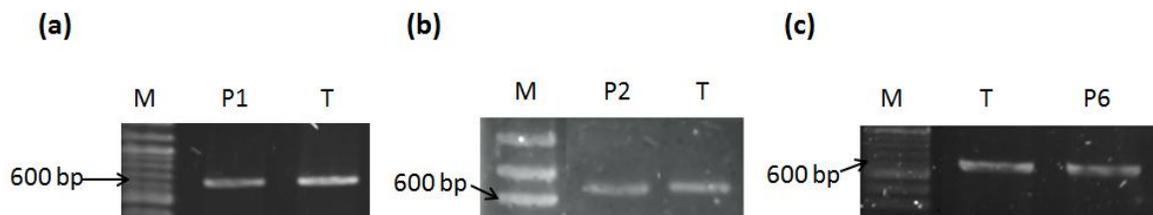


Figura 10. Amplificaciones del cDNA del mRNA de *FAS* con el par 1 de primers (a) del paciente 1, (b) paciente 2 y (c) paciente 6. Todos fueron corridos en gels de agarosa al 1%.

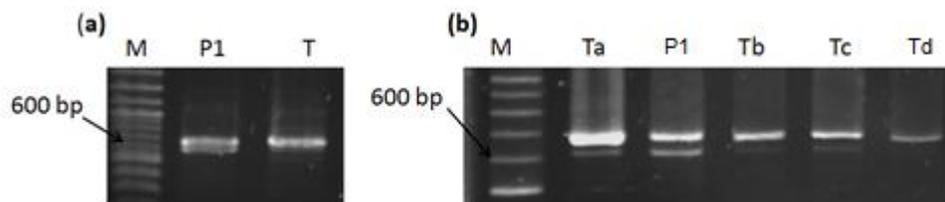


Figura 11. Productos de PCR del mRNA de *FAS* obtenidos a partir del cDNA del P1 y algunos testigos usando el par 2 de primers. En (a) tenemos un gel de agarosa al 1% en el que se ve una segunda banda un poco más pequeña que el producto principal en el paciente 1, en el testigo, sin embargo se ve sumamente tenue. En el inciso (b) se muestra un gel de agarosa al 2% en el que se volvió a correr el producto del P1 junto con el de varios testigos (Ta, Tb, Tc, Td).

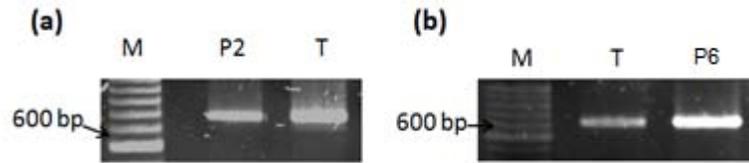


Figura 12. Productos de PCR del mRNA de *FAS* a partir de cDNA del P2 y P6 usando el par 2 de primers. Ambos fueron corridos en geles de agarosa al 1%.

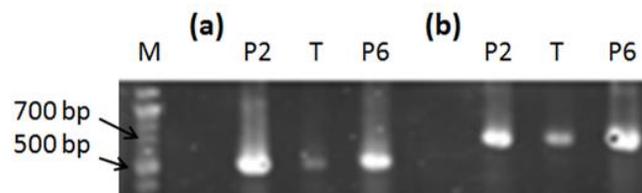


Figura 13. Productos de PCR del mRNA de *FASLG* a partir del cDNA del P2 y P6 (a) con el par 1 y (b) con el par 2. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1%.

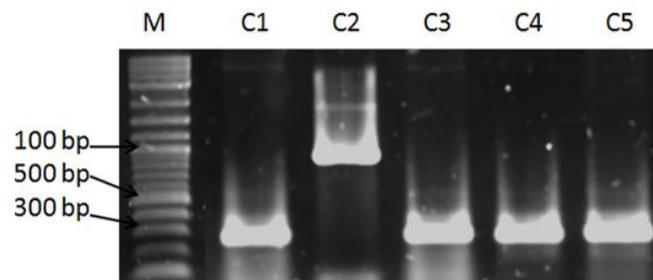


Figura 14. Productos de PCR de diferentes colonias obtenidas en el ensayo de clonación del fragmento de obtenido con el par 2 para cDNA de *FAS* del paciente 1. De las cinco colonias amplificadas inicialmente sólo una (C2) incorporó al plásmido dicho fragmento. Los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 1%.

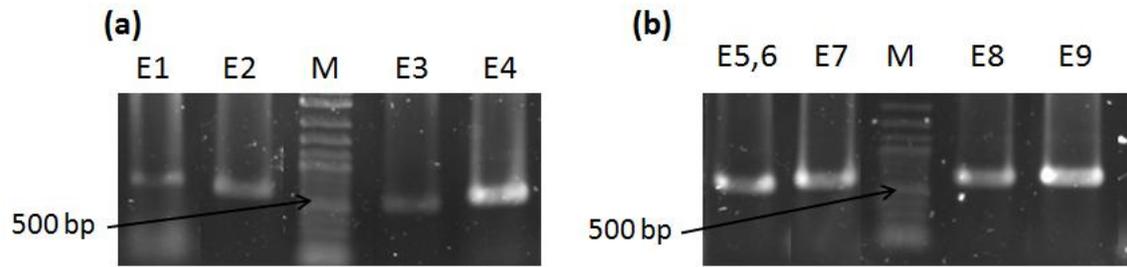
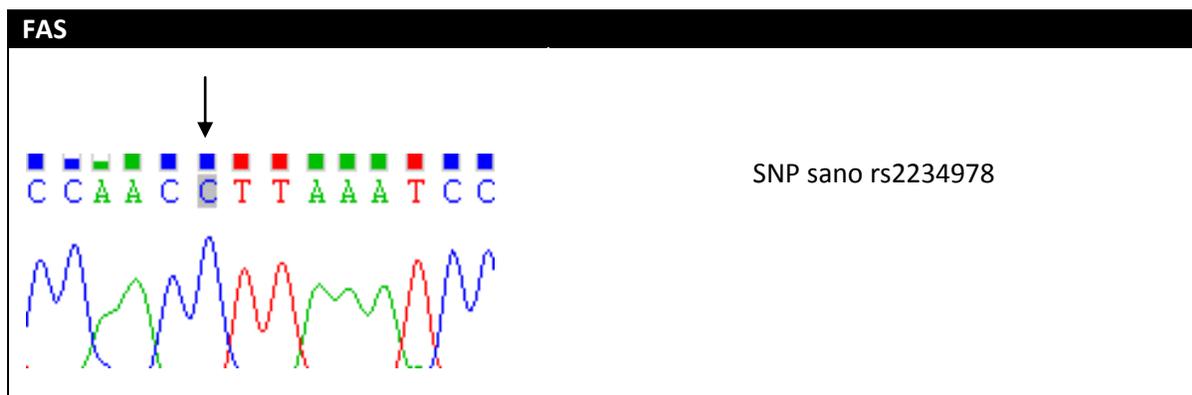


Figura 15. Productos de PCR de *FAS* obtenidos a partir de DNA genómico del P1. En el gel (a) presenta los exones del 1 al 4 y el gel (b) del 5 al 9. Ambos geles eran de agarosa al 1%.

E. Resultados de la secuenciación

Finalmente, se secuenciaron los amplicones obtenidos por PCR y clonación de *FAS* y *FASLG* del P1 (**tabla 23**), P2 (**tabla 24**) y P6 (**tabla 25**). En el caso del P1 en los productos obtenidos por clonación se detectó una sustitución con cambio de sentido (inciso a) que no se logró confirmar en la secuenciación directa del gen en el DNA (inciso b). Adicionalmente en el P1 se encontró el mismo SNP sinónimo que se encontró en *FAS* del P6.

Tabla 23. Resultados de la secuenciación de *FAS* del P1



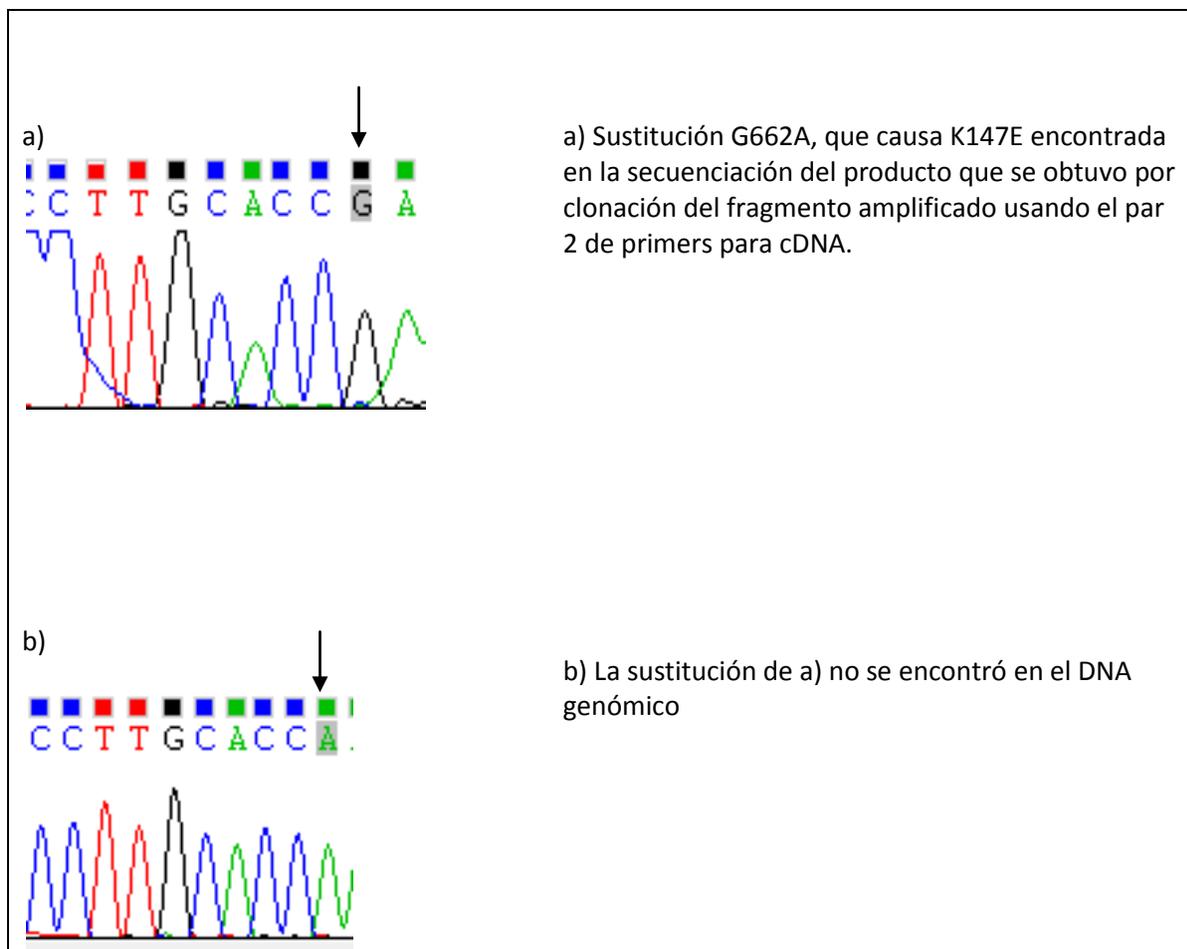
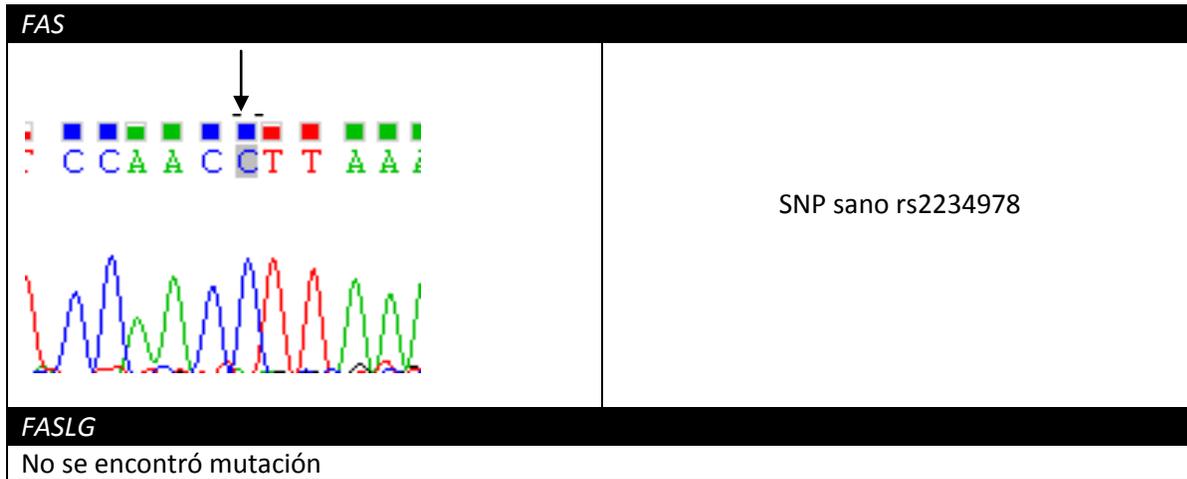


Tabla 24. Resultados de secuenciación de *FAS* y *FASLG* del P2

<i>FAS</i>
No se encontró mutación
<i>FASLG</i>
No se encontró mutación

Tabla 25. Resultados de secuenciación de *FAS* y *FASLG* del P6



Puesto que el SNP en *FAS* que se encontró tanto en el P1 como en el P6 (rs2234978) , se buscó en la base de SNPs datos del NCBI si existía algún tipo de reporte que lo correlacionara con ALPS o alguna otra patología.

(a)

- Validation status description**
- Validated by multiple, independent submissions to the refSNP cluster
 - Validated by frequency or genotype data: minor alleles observed in at least two chromosomes.
 - Validated by submitter confirmation
 - All alleles have been observed in at least two chromosomes apiece
 - H** Genotyped by HapMap project
 - SNP has been sequenced in 1000Genome project.
 - Suspect SNPs: snp suspected from paralogous region (PMID: 21030649). Added to dbSNP on 01/21/2011.

(b)

Region	Chr. position	mRNA pos	dbSNP rs# cluster id	Heterozygosity	Validation	MAF	Allele origin	3D	Clinically Associated	Clinical Significance	Function	dbSNP allele	Protein residue	Codon pos	Amino acid pos	PubMed
	90771829	988	rs2234978	0.361		0.2360					synonymous	C	Thr [T]	3	214	
											contig reference	T	Thr [T]	3	214	

Figura 16. Información obtenida de la base de datos del NCBI* sobre el SNP rs2234978 encontrado en la secuencia de *FAS* tanto en el paciente 1 como en el 6. en (a) se encuentra un resumen de los símbolos empleados en el apartado de "validación" en la tabla (b).

*Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

VIII. DISCUSIÓN

Los pacientes analizados fueron remitidos al laboratorio con la sospecha de alguna enfermedad linfoproliferativa por lo que el primer paso en el análisis de los mismos fue evaluar sus poblaciones linfocitarias por medio de inmunofenotipificación.

El valor de la inmunofenotipificación en la evaluación diagnóstica de los desórdenes inmunológicos generalmente recae en la identificación de la ausencia o presencia de alguna subpoblación o marcador linfocitario. En el caso de ALPS la población de importancia es la de las células DNTs [63], sin embargo, también se evaluaron los linfocitos B, NK y T - tanto CD8+ como CD4+ - así como otras poblaciones leucocitarias (monocitos y neutrófilos) debido a que, si bien los pacientes que no tuvieran las DNTs elevadas ya no se tomarían en cuenta para la búsqueda de mutaciones relacionadas con ALPS, la unidad de inmunodeficiencias y el servicio de inmunología y alergia del INP continuaría el proceso de diagnóstico, aunque por ser diferente a ALPS no se trató en el presente trabajo.

En el análisis de las poblaciones leucocitarias se incluyeron como testigos a adultos sanos con la finalidad de verificar que los resultados observados no se trataran de artefactos ocasionados por el manejo de la muestra o defectos en los reactivos utilizados. Sin embargo, para determinar la correspondencia a un resultado "normal" de los datos obtenidos, se emplearon los valores de referencia indicados en cada tabla y resumidos en el anexo I.

Empezando con los pacientes 3, 4, 5 y 7, que no fueron candidatos para la búsqueda de mutaciones asociadas con ALPS, tenemos que el P3 presentaba leucopenia a base de neutropenia y linfopenia. Según los datos obtenidos del análisis de poblaciones

leucocitarias que se le realizó, la linfopenia era tanto de células B como de T CD4+ y CD8+. El dato de las células B (32 células/ μ L, que es el 12% de los linfocitos totales) difiere de aquel reportado en su resumen clínico que viene referido únicamente en términos de porcentaje (2%) y marcado como bajo, sin embargo, las determinaciones no fueron realizadas en el mismo periodo de tiempo lo que significa que dicha variación pudo darse debido al curso de la enfermedad. Aunque el porcentaje de células DNTs de este paciente era mayor al 2.5% establecido como criterio diagnóstico, dichos resultados no pueden tomarse en cuenta para efectuar el diagnóstico de ALPS debido a que la presencia de linfopenia invalida el criterio, pues se desconoce el efecto en la distribución relativa de las DNTs en tales casos [44], además, su historia clínica no contaba con pruebas de laboratorio que mostraran que su anemia, trombocitopenia y neutropenia fueran de origen autoinmune y tampoco contenía algún otro criterio accesorio por lo que no había suficientes elementos que justificaran un diagnóstico probable de ALPS y debido a esto no se consideró para la secuenciación.

Los pacientes 4, 5 y 7 presentaban células DNTs por debajo del 2.5% indicado en los criterios diagnósticos con respecto a los Linfocitos que expresan CD3 y TCR $\alpha\beta$. A pesar de que los tres presentaban adenopatías y en el caso del P7 también hepato-esplenomegalia (que es uno de los criterios diagnósticos requeridos) y compartieran algunas características clínicas compatibles con ALPS como citopenias autoinmunes (a decir del Coombs positivo en los pacientes 4 y 7), se descartó a ALPS como posible patología en estos pacientes porque tanto para un diagnóstico probable como para uno definitivo de ALPS deben cumplirse ambos criterios requeridos que son: la linfadenopatía y/o esplenomegalia crónica y la elevación de las DNTs. Como ya se mencionó, esto no significa que el proceso diagnóstico no se continuara en la unidad, sin embargo, la asociación de los hallazgos en las poblaciones leucocitarias de cada paciente con su probable etiología fuera de ALPS excede de los objetivos del presente trabajo.

Los pacientes 1, 2 y 6 tuvieron un porcentaje de DNTs mayor al 2.5%. A pesar de que el P2 tuvo un porcentaje menor de DNTs en comparación con el P1, el número absoluto de

linfocitos DNTs del P2 ($1,002/\text{mm}^3$) es mayor al de P1 ($677/\text{mm}^3$). Respecto a esto, es importante notar que de acuerdo a la cuenta total de linfocitos, el P2 es el único que presenta linfocitosis. Por otro lado, el paciente 1 además presentó monocitosis. Según diversos autores, la elevación de monocitos es un hallazgo relativamente común en los pacientes con ALPS [64], sin embargo este hallazgo en particular podría sugerir una dirección diferente en la búsqueda del defecto genético pues también hay patologías parecidas a ALPS como RALD (*Ras-Associated Autoimmune Leukoproliferative disease*) en la que se encuentran mutaciones somáticas en *N-RAS* y los pacientes presentan autoinmunidad, linfadenopatías y DNTs elevadas (o normales) [44]. RALD está muy relacionada con la Leucemia Mielomonocítica Juvenil (JML) en algunos aspectos fenotípicos como las linfadenopatías, esplenomegalia, trombocitopenia, anemia y en algunos casos autoinmunidad y es curioso que un porcentaje de pacientes importante tiene alteraciones en la familia Ras. Está reportado que la JML se acompaña de monocitosis [67] y hay clínicos que afirman que el hallazgo de monocitosis es un indicio de que se trate muy probablemente de defectos en Ras.

El P1 y el P2 tuvieron porcentajes de 42.8 y 12 respectivamente de células DNTs, lo que sugiere fuertemente que se trata de pacientes con ALPS pues valores $>5\%$ de éstas células son encontrados rara vez en otras patologías que no sean ALPS, por lo que se les considera patognomónicas de la enfermedad [44]. En el caso del P1, las manifestaciones eran sumamente fuertes de tal suerte que fue sometido a un trasplante de médula ósea por parte de su hermano, previo a que se tuvieran resultados sobre su defecto genético. Al hermano del P1 también se le efectuó la determinación de las DNTs cuyos resultados mostraron que a diferencia del P1, no tenía elevada esta población. Por otro lado, como ya se comentó, los testigos utilizados eran adultos, pero en muchos casos eran familiares o acompañantes de los pacientes. El T3 es uno de esos casos, pues es la madre del P1. Como puede verse en la **tabla 22** su porcentaje era del 13% que es muy superior al 2.5% marcado en los criterios diagnósticos e incluso del 5% considerado como patognomónico de ALPS. Lo anterior es muy significativo en varios aspectos.

En primer lugar sugiere que el defecto genético en el P1 y en el T3 es de línea germinal y no somático, pues parece encontrarse tanto en la madre como en el hijo. En segundo lugar marca a la madre como posible portadora del defecto y en tercer lugar evidencia la penetrancia variable de la enfermedad pues aunque ambos tenían las DNTs elevadas y presumiblemente el mismo defecto genético, es sólo el P1 quien presenta el cuadro clínico grave. Por otro lado, el hecho de que el hermano del P1 no presentara ni las características clínicas de ALPS ni las DNTs elevadas podría significar ya sea que la madre pudiendo ser heterocigótica al defecto le haya heredado el alelo sano y si su padre no poseía tal defecto el otro alelo también sería sano o silvestre y así el hermano del P1 estaría libre del defecto u otra posibilidad es que sí tenga el defecto genético pero al igual que su madre no desarrolló el cuadro además de que algún otro factor protector le permita no desarrollar la elevación de las células DNTs vistas en su madre y hermano.

La noción sobre la diferente expresión fenotípica de la enfermedad es ampliamente conocida y se piensa que hay varios factores que influyen en ella tales como haploinsuficiencia y genes que actúan como modificadores. Este tipo de penetrancia y expresividad variada también ha sido vista en modelos animales en los que por ejemplo una mutación homocigota de *fas* en ratones MRL no tiene la misma severidad que en otras cepas en las que se pueden dar manifestaciones muy leves [64]. En estudios realizados con pacientes diagnosticados con *ALPS-FAS* (que por ser la variedad más abundante ha permitido obtener más datos al respecto) se ha observado que en sus familiares portadores de la mutación se pueden presentar manifestaciones leves o ningún dato de laboratorio ni signo compatible con ALPS aunque el ensayo de apoptosis mediada por Fas siempre resulta anormal en ellos [46]. En este sentido, sería de gran utilidad tener un ensayo de apoptosis disponible en el laboratorio para detectar probables portadores de una manera sencilla en las familias de pacientes con probable ALPS-FAS.

Los testigos T7, 8 y 9 fueron únicamente empleados para tener un panorama más amplio de las células DNTs en la población sana, como puede verse en la **tabla 22**, los valores de éstos son un poco por encima del 2.5% sin embargo, este hallazgo como ya se mencionó,

carece de significado por sí solo, simplemente en nuestro caso, el hecho de que dichos testigos presentaran esos resultados es un indicativo más de que cada laboratorio debe establecer sus valores de referencia.

El P2 también resultó con niveles muy elevados de células DNTs y como ya se mencionó presentaba linfocitosis. Se dice que en los pacientes con ALPS que presentan linfocitosis, ésta es debida a células T y B pero no a NKs [47]. Dichas subpoblaciones linfocitarias del paciente no se encontraban fuera de los límites de referencia pero si se encontraban cerca del límite superior los linfocitos T, particularmente los CD8+ (tabla 21). Respecto a la expansión de esta subpoblación en pacientes con ALPS se ha visto que dichas células expresan CD57 [47] al igual que las DNTs [54]. CD57 es un marcador de senescencia clonal, sin embargo, la determinación de tal marcador no es necesaria o útil para el diagnóstico, simplemente es un dato interesante considerando que experimentos llevados a cabo con células T de ratones *lpr* han mostrado que sus células CD4-CD8- son derivadas principalmente de células CD8+[47], aunque de sus contrapartes humanas no se sepa mucho.

El caso del P6 es más complicado pues cuando acudió a la toma de muestra para las determinaciones que se le iban a realizar, estaba bajo tratamiento con prednisona que es un inmunosupresor que puede alterar las subpoblaciones linfocitarias lo que podría explicar la disminución en dichas células del paciente. Sus células DNTs se encontraban ligeramente por arriba del 2.5% , sin embargo también lo estaban las de algunos testigos (T1, 4, 7 y 8). En este punto encontramos distintas cuestiones que vale la pena tratar. Por un lado, los valores de las DNTs son un tanto variables entre laboratorios por lo que se recomienda que cada uno obtenga sus propios valores de acuerdo a grupos de edad tanto de porcentajes como de números absolutos pues se sabe que estos últimos varían con la edad [44]. Por otro lado, las DNTs elevadas por si solas no tienen significado patológico, deben estar acompañadas de un contexto clínico que las asocie a diferentes patologías: algunas enfermedades en las que se puede observar esta población ligeramente elevada son en enfermedades autoinmunes como SLE [44] u otras inmunodeficiencias como el

síndrome de di George [47], por lo cual el establecimiento de rangos normales ayudaría en la interpretación de los límites de elevación en esta población.

En el caso del P6, no solamente fue el hallazgo de las DNTs elevadas lo que indicó un probable diagnóstico de ALPS; sus antecedentes de pancitopenia, los resultados positivos en las pruebas de Coombs y de anticuerpos anti-nucleares, la elevación de la IgG plasmática y sobre todo la elevación de los niveles de vitamina B12 plasmáticos junto con la su esplenomegalia eran todos criterios diagnósticos de ALPS (**tabla 4**), por lo cual también se tomó en cuenta para el estudio de secuenciación.

Tanto para el P2 como para el P6 se realizó la determinación de la expresión de Fas en sus linfocitos T (células CD3+) empleando citometría de flujo, como puede verse en la **figura 9** comparado con la expresión de la misma molécula de un testigo para cada paciente no existe diferencia prácticamente. Esta determinación se realiza debido a que hay mutaciones que impiden la expresión de la proteína en la superficie celular por lo que es un elemento más que nos permite caracterizar el fenotipo de cada paciente. En el caso particular del P1, no se determinó dicha expresión pues al momento de la toma de muestra la tinción aun no estaba estandarizada.

Para la búsqueda de mutaciones se inició secuenciando el mensajero de *FAS* en todos los pacientes. Los resultados de las amplificaciones se muestran en la figura **10, 11 y 12**. En la etapa de estandarización ya se había notado un subproducto de la PCR cuando se usaba el par 2 de primers, pero, era casi indistinguible pues se veía muy tenue. En el P1 a diferencia de los testigos y los pacientes 2 y 6 se observó más intensamente dicha banda, lo que sugería la posibilidad de que no se tratara de un subproducto inespecífico de la reacción, sino de un producto alternativo de dicho gen pero de un tamaño molecular aparentemente menor al de la banda principal en el gel, que quizá estaba expresado de manera más intensa en el P1, sin embargo, una imagen de un gel no es un método cuantitativo y no puede aportar mucha información. El abordaje que se le dio a dicho hallazgo fue clonar el producto de PCR total, es decir, la mezcla que contenía el producto principal visto en el gel y el producto correspondiente a la banda secundaria, con el fin de "purificar" dichos

fragmentos en plásmidos separados y así secuenciarlos posteriormente para determinar si eran formas alternativas del mensajero de *FAS* o se trataba de un producto secundario de la reacción de PCR.

Finalmente sólo se pudo obtener y secuenciar un sólo tipo de producto de la clonación de aproximadamente 900bp. Si la fracción del plásmido amplificado con los primers M13 tiene una longitud teórica de 243 bp y los productos que pudieron insertarse eran de poco menos de 700 y 650 bp (producto principal y secundario respectivamente) el producto observado en el gel de la figura tendría que ser de ~943 en caso de que el inserto fuera el fragmento de aproximadamente 700 bp ó ~843 si se tratase del de 650 bp. Las bandas del marcador de tamaño molecular no muestran mucha resolución entre sí, sin embargo es claro que la banda del plásmido con el inserto se encontraba un poco arriba de la banda de 900bp por lo que se asume que se clonó solamente el producto de ~700bp. El resultado de la secuenciación de dicho plásmido fue notable pues se identificó una sustitución de la adenina 662 (del cDNA) por una guanina lo que provocaba que el codón al que pertenecía y que codificaba para la lisina 147 ahora codificara para ácido glutámico. Así mismo, se buscó la confirmación de este resultado por medio de la secuenciación del exón correspondiente (exón 4) en el DNA del paciente pero no se encontró dicha sustitución. Suponiendo que se trataba de un error de la polimerasa empelada para amplificar, se secuenciaron todos los exones del gen *FAS* a partir del DNA del P1 **figura 15**, sin embargo no se encontró ninguna secuencia anormal en ninguno de ellos. Pensando que quizá se tratase de un caso de ALPS somático se continuó repitiendo el ensayo de clonación (datos no mostrados) pero en ningún caso se repitió el resultado de la sustitución. La posibilidad de que se tratara de un defecto somático era poco probable por las razones expuestas sobre las DNTs de su madre, sin embargo, debía descartarse como una posibilidad el que se tratara de un defecto aparte del probablemente heredado por ésta.

En el caso de los pacientes 2 y 6, no se encontraron mutaciones en los mensajeros de *FAS* ni de *FASLG* y por lo tanto existen 3 posibilidades: que se trate de ALPS-*FAS* somático, ALPS-*CASP10* o ALPS-U. De acuerdo a las estadísticas aproximadas de la frecuencia de cada tipo

de ALPS, es más probable que se trate de ALPS-U pues como ya se mencionó, se calcula que de un 25 a 33% de los pacientes diagnosticados con ALPS son clasificados dentro de esta categoría [43,47]. En ambos pacientes debería ser investigada la posibilidad de la mutación somática pues se ha descrito el hallazgo de este tipo de mutaciones en pacientes que aparentemente tienen alelos sanos de *FAS*, *FASLG* y *CASP-10* [65,66], sin embargo, aunque es menos frecuente aun que las otras formas no debe descartarse la búsqueda en la propia *CASP-10*. Para determinar si se trata de una condición somática, las células mononucleares de sangre periférica se someten a una separación o "sorting" con la que se pretende purificar las células DNTs del resto pues presumiblemente en ellas se encuentra la mutación, y efectuar la búsqueda directamente en éstas células. Varios autores encontraron mutaciones de esta manera en pacientes que habían sido diagnosticados como ALPS-U [65,66] por lo que aun hay una fuerte posibilidad de que tengan un defecto genético identificable.

Finalmente, en el caso de los pacientes P1 y P6 se encontró en mismo polimorfismo rs2234978 en *FAS*, que es reportado como un polimorfismo sinónimo en la posición 288 del mRNA cuyo codón codifica para la Treonina 214 (figura 16). Sin embargo, según las propias referencias encontradas en Pubmed, no ha habido ninguna asociación directa de este polimorfismo con pacientes con ALPS, aunque se ha asociado con deficiencia de IgA en pacientes que cursan además con autoinmunidad (Referencia: PMID 20694011). Se desconoce la frecuencia de este polimorfismo en población Mexicana, por lo que una de las perspectivas de este trabajo sería determinar si rs2234978 se encuentra ampliamente distribuida en nuestra población, de no ser así, los hallazgos con respecto a la aparición de este SNP en los pacientes estudiados en el presente trabajo serían relevantes.

IX. CONCLUSIONES

No se pudo determinar el defecto genético de los pacientes seleccionados para la secuenciación en *FAS* ni en *FASLG*, sin embargo, aun quedan como alternativas un defecto en la caspasa-10 o una mutación somática en *FAS*. En caso de no encontrarse mutación alguna -- habiendo completado la búsqueda de todas las posibilidades-- un ensayo de DNTs al menos en los familiares cercanos de los pacientes sería una exploración viable para detectar al posible portador en caso de ser un defecto de línea germinal heredado por alguno de los padres. También sería recomendable que el laboratorio implementara en su catálogo de pruebas, un ensayo de apoptosis mediado por Fas pues así se dirigiría la búsqueda de mutaciones con este resultado, a saber, en los pacientes con un defecto en esta prueba se buscarían defectos de línea germinal en *FAS* y *CASP-10*, y en aquellos con resultados normales se buscarían primero defectos en *FASLG* y se consideraría un defecto somático en *FAS*. Finalmente, a pesar de no haberse cumplido la totalidad de los objetivos en este trabajo, es importante resaltar la trascendencia del mismo pues sienta un precedente en el laboratorio para la búsqueda de mutaciones en este tipo de pacientes por lo que los próximos en acudir al laboratorio tendrán resultados más prontamente al haberse construido un marco de trabajo de las técnicas utilizadas.

X. REFERENCIAS

- [1] Samarghitean, C., Ortutay, C., Vihinen, M. (2009). "Systematic classification of primary immunodeficiencies based in clinical, pathological and laboratory parameters". *J. immunol.* **183**: 7569-7575. doi: 10.4049/jimmunol.0901837
- [2] Leiva, L.E., Zelazco, M., Oleastro, M., Carneiro-Sampaio, M., Condino-Neto, A., Costa-Carvalho, B.T., Grumach, A.S., Quezada, A., Patiño, P., Franco, J.L., Porras, O., Rodríguez, F.J., Espinosa-Rosales, F.J., Espinosa-Padilla, S.E., Almillategui, D., Martínez, C., Rodríguez Tafur, J., Valentín, M., Benarroch, L., Barroso, R., Sorensen, R. U. (2006). "Primary Immunodeficiency Diseases in Latin America: The Second Report of the LAGID1 Registry". *Journal of Clinical Immunology.* **1**:101-108. doi: 10.1007/s10875-006-9052-0
- [3] Coria, E., Espinosa, S., Espinosa, F., Vargas, M.E., Blancas, L. (2010). "Panorama epidemiológico de las inmunodeficiencias primarias en México". *Revista Alergia México.* **57**:159-163.
- [4] Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie A.R. (1972). "Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranged implications in tissue kinetics". *British Journal of Cancer.* **26**:239-257.
- [5] Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.W., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Núñez, G., Peter, M.E., Pientini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G. (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations

- of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012". *Cell Death and Differentiation*. **19**: 107-120. doi: 10.1038/cdd.2011.96
- [6] Lavrik, I.N., Krammer, P.H. (2012). "Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC". *Cell Death and Differentiation*. **19**: 36-41. doi:10.1038/cdd.2011.155
- [7] Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B.C., Murmann, A.E., Burkhardt, J.K., Peter, M.E. (2002). "Molecular Ordering of the Initial Signaling Events of CD95". *Molecular and Cellular Biology*. **22**:207-220. doi: 10.1128/MCB.22.1.207-220.2002
- [8] Lee, K.H., Feig, C., Tchikov, V., Schickel, R., Hallas, C., Schutze, S., Peter, M.E., Chan, A.C. (2006). "The role of receptor internalization in CD95 signaling". *The European Molecular Biology Journal*. **25**:1009-1023. doi:10.1038/sj.emboj.7601016
- [9] Geserick, P., Hupe, M., Moulin, M., Wong, W.W.L., Feoktistova, M., Kellert, B., Gollnick, H., Silke, J., Leverkus, M. (2009). "Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP kinase 1 recruitment". *Journal of Cell Biology*. **187**:1037-1054. doi: 10.1083/jcb.200904158
- [10] Budd, R.C., Yeh, W.C., Tschopp, J. (2006). "cFLIP regulation of Lymphocyte activation and development". *Nature Reviews Immunology*. **6**:196-204. doi:10.1038/nri1787
- [11] Hyer, M.L., Samuel, T., Reed, J.C. (2006). "The FLIP side of Fas signaling". *Clinical Cancer Research*. **12**: 5929-5931. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2098
- [12] Fricker, N., Beaudouin, J., Richter, P., Eils, R., Krammer, P.H., Lavrik, I.N. (2010). "Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both pro- and anti-apoptotic role of c-FLIP_L". *Journal of Cellular Biology*. **190**: 377-389. doi: 10.1083/jcb.201002060

- [13] Yurchenko, M., Shlapatska, L.M., Sidorenko, S.P. (2012). "The multilevel regulation of CD95 signaling outcome". *Experimental oncology*. **34**:153-159
- [14] Feig, C., Tchikov, V., Schütze, S., Peter, M.E. (2007). "Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling". *The European Molecular Biology Organization Journal*. **26**:221-231. doi:10.1038/sj.emboj.7601460
- [15] Hao, Z., Mak, T.W. (2010). "Type I and Type II Pathways of Fas-mediated Apoptosis Are Differentially Controlled by XIAP". *Journal of Molecular Cell Biology*. **2**: 63-64. doi:10.1093/jmcb/mjp034
- [16] Taylor, R.C, Cullen, S.P., Martin, S.J. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level". *Nature Reviews*. **9**:231-241. doi:10.1038/nrm2312
- [17] Elmore, S. (2007). "A review of programmed cell death". *Toxicologic Pathology*. **35**:495-516. doi: 10.1080/01926230701320337
- [18] Rojas, W. (2004). "Inmunología". Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. México, D.F. Décimo tercera edición. Capítulo 1.
- [19] Murphy, K., Travers, P., Walter, P. (2008). "Janeway's Immunobiology". Séptima edición. Ed. Garland Science. Nueva York, USA. Capítulo 1, capítulo 7.
- [20] Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. (2007). "Kuby Immunology". Sexta edición. Ed. W.H. Freeman and Company. New York, USA. Páginas 1, 8-12.

- [21] Borghesi, L., Milcarek, C. (2007). "Innate versus Adaptive Immunity: A Paradigm Past Its Prime?". *Cancer Research*. **67**:3989-3993. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0182
- [22] LeBien, T.W., Tedder, T.F. (2008). "B-Lymphocytes how they develop and function". *American Society of Hematology*. **112**: 1570-1580. doi:10.1182/blood-2008-02-078071
- [23] Geisberger, R., Lamers, M., Achatz, G. (2006). "The riddle of the dual expression of IgM and IgD". *Immunology*. **112**:429-437. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02386.x
- [24] Geffner, J., Fainboim, L. (2008). "Introducción a la Inmunología humana". Quinta edición. Ed. Médica-Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Páginas 2-8.
- [25] Krammer, P.H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system". *Nature*. **407**: 789-795. doi:10.1038/35037728
- [26] Strasser, A., Jost, P.J., Nagata, S. (2009). "The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System". *Cell*. **30**:180-192. doi 10.1016/j.immuni.2009.01.001
- [27] Marsden, V.S., Strasser, A. (2003). "Control of Apoptosis in the Immune System: Bcl-2, BH-3-only proteins and more". *Annual Reviews of Immunology*. **21**:71-105. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141029
- [28] Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green, D.R. (2010). "The Bcl-2 family reunion". *Molecular Cell*. **37**:299-310. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.025
- [29] Opferman, J.T. 2008. "Apoptosis in the development of the immune system". *Cell Death and Differentiation*. **15**: 234-242. doi:10.1038/sj.cdd.4402182

- [30] Zhang, N., He, W.Y. (2005). "An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes". *Journal of Experimental Medicine*. **202**:395-404. doi: 10.1084/jem.20050117
- [31] Xing, Y., Hogquist, K.A. 2012. T-Cell Tolerance central and peripheral. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. doi: 10.1101/cshperspect.a006957
- [32] Rathmell, J.C., Thompson, C.B. (2002). "Pathways of apoptosis in lymphocytes development, homeostasis and disease". *Cell*. **109**: S97-S107.
- [33] Trapani, J.A., Smyth, M.J. (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway". *Nature Reviews of Immunology*. **2**:735-747. doi:10.1038/nri911
- [34] Russell, J.H., Ley, T.J. (2002). "Lymphocyte-mediated cytotoxicity". *Annual Reviews of Immunology*. **20**: 323-370. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730
- [35] Notarangelo, L.D. (2010). "Primary immunodeficiencies". *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2**: S182-S194. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.053
- [36] Ruggero, P., Franco, J.L., Espinosa-Rosales, F.J, Sorensen, R., Condino-Neto, A.(2012). "Advances in Primary Immunodeficiency Diseases in Latin America: epidemiology, research and perspectives". *Annals of the New York Academy of Sciences*.**1250**:62-72. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06289.x
- [37] McCusker C., Warrington R.(2011). "Primary Immunodeficiency". *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*.**7**:S1-S11. doi:10.1186/1710-1492-7-S1-S11

- [38] Fudenberg HH, Good RA, Hitzig W, Kunkel HG, Roitt IM, Rosen FS . (1970). "Classification of the primary immune deficiencies: WHO recommendation". *New England Journal of Medicine*. **283**: 656-657.
- [39] Fudenberg H, Good RA, Goodman HC, Hitzig W, Kunkel HG, Roitt IM. (1971)." Primary immunodeficiencies. Report of a World Health Organization Committee". *Pediatrics*.**47**:927-46.
- [40] Al-Herz , W. , Bousfiha, A., Casanova, J.L, Chapel, H., Conley , M.H., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Fischer, A., Franco, J.L., Geha, R.S., Hammarström, L., Nonoyama, S., Notarangelo, L.D., Ochs, H.D., Puck , J.M., Roifman,C.M., Seger, R.S., Tang, M.L.K. (2012). "Primary immunodeficiency diseases: an up date on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency". *Frontiers in Immunology*. **2**: doi: 10.3389/fimmu.2011.00054
- [41] Leiva, L.E., Bezrodnik, L., Oleastro, M., Condino-Neto, A., Costa-Carvalho, B.T., Sevciovic Grumach, A., Espinosa-Rosales, F.J., Franco, J.L., King, A., Inostroza, J., Quezada ,A., Porras, O., Sorensen, R.U. (2011). "Primary immunodeficiency diseases in Latin America: Proceedings of the Second Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID) Advisory Board". *Allergologia et Immunopathologia*. **39**:106-110. doi:10.1016/j.aller.2010.10.007
- [42] Su, H.C., Lenardo, M.J. (2005). "Lessons from autoimmune lymphoproliferative syndrome". *Drug discovery today: Disease mechanisms*. **2**:495-502. doi: 10.1016/j.ddmec.2005.10.003

- [43] Turbyville, J.C. , Rao, V.J. (2010). "The autoimmune lymphoproliferative syndrome: A rare disorder providing clues about normal tolerance". *Autoimmunity reviews*. **9**:488-493 doi:10.1016/j.autrev.2010.02.007
- [44] Oliveira, J.B., Bleesing, J.J., Dianzani, U., Fleisher , T.A., Jaffe, E.S., Lenardo, M.J., Rieux-Laucat, F., Siegel, R.M., Su, H.C., Teachey , D.T., Rao, V.K. (2010). "Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop". *eBlood*. **116**:e35-e40. doi:10.1182/blood-2010-04-280347
- [45] Rieux-Laucat, F., Fischer, A., Le Deist, F.(2003). "Cell-death signaling and human disease". *Current opinion in Immunology*.**15**: 325-331. doi: 10.1016/S0952-7915(03)00042-6
- [46] Bleesing, J.J.H. (2002). "Autoimmune lymphoproliferative syndrome: A genetic disorder of abnormal lymphocyte apoptosis". *Immunology and Allergy Clinics of North America*. **22**: 339-355.
- [47] Su, H.C., Lenardo, M.J. (2008). "Genetic Defects of Apoptosis and Primary Immunodeficiency". *Immunology and Allergy Clinics of North America*. **28**:329-351. doi:10.1016/j.iac.2008.01.002.
- [48] Kim,Y.J., Dale, J.K., Noel, P.,Brown, M.R., Nutman,T.B.,Straus, S.E., Klion A.D. (2007). Eosinophilia is Associated With a Higher Mortality Rate Among Patients With Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. *American Journal of Hematology*. **82**: 615-624. doi: 10.1002/ ajh.20851
- [49] Lim, M.S., Straus, S.E., Dale, J.K., Fleisher, T.A., Stetler-Stevenson, M., Strober, W., Sneller, M.C., Puck, J.M., Lenardo, M.J., Elenitoba-Johnson, K.S.J., Lin, A.Y., Raffeld, M.,

- Jaffe, E.S.(1998). "Pathological Findings in Human Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome". *American Journal of Pathology*. **153**:1541-1550
- [50] Teachey, D.T. (2012). "New Advances in the Diagnosis and Treatment of Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS)". *Current opinion in Pediatrics*. **24**:1-8. doi: 10.1097/MOP.0b013e32834ea739
- [51] Ohga, S., Nomura, A., Takahata, Y., Ihara, K., Takada, H., Wakiguchi, H., Kudo Y., Hara, T. (2002). "Dominant expression of interleukin 10 but not interferon γ in CD4-CD8- abT cells of autoimmune lymphoproliferative syndrome". *British Journal of Hematology*. **119**: 535-538. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03848.x
- [52] Bleesing, J.J.H., Brown, M.R., Dale, J.K., Straus, S.E., Lenardo, M.J., Puck, J.M., Atkinson, T.P., Fleisher, T.A. 2001. "TcR- $\alpha\beta^+$ CD4-CD8- T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-glycan biosynthesis"
- [53] Rensing-Ehl, A., Warnatz, K., Fuchs, S., Schlesier, M., Salzer, U., Draeger, R., Bondzio, I., Joos, Y., Janda, A., Gomes, M., Abinun, M., Hambleton, S., Cant, A., Shackley, F., Flood, T., Waruiru, C., Beutel, K., Siepermann, K., Dueckers, G., Niehues, T., Wiesel, T., Schuster, V., Seidel, M.G., Minkov, M., Sirkiä, K., Kopp, M.V., Korhonen, M., Schwarz, K., Ehl, S., Speckmann, C. (2010). "Clinical and immunological overlap between autoimmune lymphoproliferative syndrome and common variable immunodeficiency". *Clinical Immunology*. **137**: 357-365. doi: 10.1016/j.clim.2010.08.008
- [54] Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Fischer, A. (2003). "Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways". *Cell Death and Differentiation*. **10**: 124-133. doi:10.1038/sj.cdd.4401190

- [55] Magerus-Chatinet, A., Stolzenberg, M.C., Lanzarotti, N., Neven, B., MD, Daussy, C., Picard, C., Neveux, N., Desai, M., Rao, M., Ghosh, K., Madkaikar, M. MD, Fischer, A., MD, Rieux-Laucat, F.(2013). " Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a homozygous null FAS ligand (FASLG) mutation". *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **131**: 486-490. doi: 8080/10.1016/j.jaci.2012.06.011
- [56] Bi, L.L., Pan, G., Atkinson, T.P., Zheng, L., Dale, J.K., Makris, C., Reddy, V., McDonald, J.M., Siegel, R.M., Puck, J.M., Lenardo, M.J., Straus, S.E. (2007). " Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib". *BMC Medical Genetics*. **8**: 1-14. doi:10.1186/1471-2350-8-41
- [57] Del-Rey, M., Ruiz-Contreras, J., Bosque, A., Calleja, S., Gomez-Rial, J., Roldan, E., Morales, P., Serrano, A., Anel, A., Paz-Artal, E., Allende, L.M. (2006). " A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome". *Blood*. **108**:1306-1312. doi: 10.1182/blood-2006-04-015776
- [58] Wang, L., Zheng, L., Lobito, A., Ka-Ming Chan, F., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J.M., Straus, S.E., Lenardo, M.J. (1999)." Inherited Human Caspase 10 Mutations Underlie Defective Lymphocyte and Dendritic Cell Apoptosis in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Type II". *Cell*. **98**: 47-58. doi:10.1016/S0092-8674(00)80605-4
- [59] Grønbæk, K., Dalby, T., Zeuthen, J., Ralfkiaer, E., Guldberg, P. (2000). "The V410I (G1228A) variant of the caspase-10 gene is a common polymorphism in the Danish population". *Blood*. **95**: 2184-2185.

- [60] Zhu, S., Hsu, A.P., Vacek, M.M., Zheng, L., Schaffer, A.A., Dale, J.K., Davis, J., Fischer, R.E., Straus, S.E., Boruchov, D., Saulsbury, F.T., Lenardo, M.J., Puck, J.M. (2006). "Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome". *Human Genetics*. **119**: 284-294. doi: 10.1007/s00439-006-0138-9
- [61] Lewis, S.M., Bain, B.J., Bates, I. (2008). "Dacie y Lewis. Hematología Práctica". Décima edición. Ed. Elsevier. Páginas 14-16.
- [62] Comans-Bitter, W.M., de Groot, R., van den Beemd, R., Neijens, H.J., Hop, W.C.J., Groeneveld, K., Hooijkaas, H., van Dongen, J.J.M. (1997). "Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations". *The Journal of Pediatrics*. **130**:388-393. doi: 8080/10.1016/S0022-3476(97)70200-2
- [63] Bleesing, J.J.H., Brown, M.R., Novicio, C., Guarraia, D., Dale, J.K., Straus, S.E., Fleisher, T.A. (2002). "A Composite Picture of TCR α /+ β CD4-CD8-T Cells (α / β -DNTCs) in Humans with Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome". *Clinical Immunology*. **104**: 21-30. doi:10.1006/clim.2002.5225
- [64] Rao, K.V., Oliveira, J.B. (2011). "How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome". *Blood*. **118**: 5741-5751. doi:10.1182/blood-2011-07-325217
- [65] Dowdell, K.C., Niemela, J.E., Price, S., Davis, J., Hornung, R.L., Oliveira, J.B., Puck, J.M., Jaffe, E.S., Pittaluga, S., Cohen, J.I., Fleisher, T.A., Rao, V.K. (2010). "Somatic *FAS* mutations are common in patients with genetically undefined autoimmune lymphoproliferative syndrome". *Blood*. **115**: 5164-5169. doi: 10.1182/blood-2010-01-263145

- [66] Holzelova, E., Vonarbourg, C., Stolzenberg, M.C., Arkwright, P.D., Selz, F., Prieur, A.M., Blanche, S., Bartunkova, J., Vilmer, E., Fischer, A., M.D., Deist, F., M.D., Rieux-Laucat, F. (2004). "Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome with Somatic Fas Mutations". *The New England Journal of Medicine*. **351**:1409-18. doi: 10.1056/NEJMoa040036
- [67] Takagi, M., Shinoda, K., Piao, J., Mitsui, N., Takagi, M., Matsuda, K., Muramatsu, H., Doisaki, S., Nagasawa, M., Morio, T., Kasahara, Y., Koike, K., Kojima, S., Takao, A., Mizutani, S. 2011. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic *KRAS* mutation. *Blood*. **118**: 2887-2890.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Genes modificadores	Se definen como genes que afectan la expresión fenotípica y/o molecular de otros genes.
Haploinsuficiencia	Es un fenómeno que ocurre cuando en un organismo diploide los dos alelos de un gen son necesarios para la función de éste pero uno de los alelos se encuentra afectado por ejemplo por una mutación y entonces el producto producido por el gen normal no es suficiente para conservar la función.
Lesión equimótica	Púrpura que forma una mancha extensa o parche, irregular, violácea, azulosa o amarillenta.
Morfotipo	Un organismo o conjunto de organismos dentro de una población distinguidos por tener características físicas distintas.
Mutación de línea germinal	Mutación que afecta a las células germinales (precursoras de los gametos) y que por tanto es transmisible a la siguiente generación.
Mutación heterocigota	Mutación presente en ambos alelos de un gen.
Mutación homocigota	Mutación presente en uno solo de los alelos de un gen.
Mutación somática	Mutación que se da en células diferentes a los gametos y por lo tanto no es transmisible a la siguiente generación.
Penetrancia	Frecuencia por la que un determinado genotipo se manifiesta en el fenotipo.
Plasmacitosis policlonal	Expansión policlonal de células plasmáticas (células B productoras de anticuerpos)
Isotipo	Característica debida al tipo de cadena pesada que se

incorpora a la molécula de inmunoglobulina que le da diferencias funcionales a los diferentes tipos de inmunoglobulinas.

Sialoadenitis

Término que se utiliza habitualmente para definir la situación de un grupo variado de cuadros que presentan inflamación en una o más glándulas salivales.

ANEXO I : VALORES DE REFERENCIA CONSIDERADOS PARA LAS POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES LEUCOCITARIAS

Tabla 26. Valores de referencia de números absolutos de diferentes poblaciones leucocitarias correspondientes a distintas edades

Células	Edad			
	1-2 años	2-6 años	6-12 años	Adultos
Leucocitos totales ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6.40-12.00	5.20-11.00	4.40-9.50	4.40-8.10
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1.00-7.00	1.50-8.00	2.00-8.00	2.00-7.00
Monocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.20-1.00			
Linfocitos totales ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3.60-8.90	2.30-5.40	1.90-3.70	1.40-3.30

*Modificado de Lewis, S.M. et al "Dacie y Lewis. Hematología Práctica".

Tabla 27. Valores de referencia de subpoblaciones linfocitarias para distintas edades

Células	Edad				
	9-15 meses	2-5 años	5-10 años	10-16 años	Adultos
Células NK ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.20-1.20	0.10-1.00	0.09-0.90	0.07-1.20	0.09-0.60
Linfocitos B ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.60-3.10	0.20-2.10	0.20-1.60	0.20-0.60	0.10-0.50
Linfocitos T CD4 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.90-5.50	0.50-2.40	0.30-2.00	0.40-2.10	0.30-1.40
Linfocitos T CD8 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.40-2.30	0.30-1.60	0.30-1.80	0.20-1.20	0.20-0.90

*Modificado de Commans-Bitter, W.M. et al "Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations"

ANEXO II: REACTIVOS UTILIZADOS

Anticuerpos

- BD Bioscience Anti-humano CD45-PerCP/CD16+56-PE/CD3-FITC clona NCAM
- BD Bioscience Anti-humano CD45-PerCP/CD19-PE/CD3-FITC clona SK7, 2D1, SJ25C1
- BD Bioscience Anti-humano CD3-PerCP/CD8-PE/CD4-FITC clona SK3, SK1 y SK7
- BD Bioscience Anti-humano TCR $\alpha\beta$ -APC clona T10B9.1A-31
- BD Bioscience Anti-humano CD 95 (Fas)-PE

Kits ó reactivos comerciales

- Solución de Ficoll Lymphoprep™
- Solución de lisis 10x (Lysing buffer 10X) BD Biosciences
- Big Dye 3.1 de Applied Biosystems®
- Big Dye™ XTerminator Purification kit