



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**TESIS. IDENTIFICACIÓN DEL ESTADO DE PORTADORAS EN MUJERES CON HIJOS
CON AGAMMAGLOBULINEMIA LIGADA AL CROMOSOMA X**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

PAMELA RODRÍGUEZ TORIZ



MÉXICO, D.F. Septiembre de 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.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	4
LISTA DE ILUSTRACIONES Y TABLAS.	6
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Sistema inmunológico.....	9
Maduración de los linfocitos B.....	9
Inmunodeficiencias primarias	12
Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X.....	16
Inactivación del cromosoma X.....	17
ALX y su relación con la inactivación del cromosoma X.....	22
DNA Microsatélite.....	23
Técnicas para la evaluación de la inactivación del cromosoma X	24
Aplicaciones de la técnica HUMARA y DNA microsatélite	27
JUSTIFICACIÓN.....	28
OBJETIVOS	29
Objetivos Generales:	29
Objetivos particulares:	29
HIPÓTESIS	30
METODOLOGÍA.....	31
Extracción de células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs):	31
Purificación de linfocitos B.	31
Extracción de DNA genómico.....	33
Estandarización de la amplificación del gen AR por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
Estandarización de la digestión enzimática	35

Análisis de fragmentos de PCR en el secuenciador automatizado.....	35
Amplificación del gen constitutivo 18S.....	35
RESULTADOS:.....	37
Estandarización de la técnica HUMARA	37
Digestión enzimática de las posibles portadoras	39
Análisis de las muestras de las posibles portadoras con la técnica HUMARA	40
Identificación de ambos alelos (inactivo y activo) de las posibles portadoras.....	43
Ensayo HUMARA en líneas de células B inmortalizadas con el virus de Epstein-Bar (EBV).....	46
Confirmación de que los alelos inactivos presentes en las portadoras de ALX corresponden a los alelos activos heredados a pacientes con ALX	49
DISCUSIÓN:	53
CONCLUSIONES:.....	58
REFERENCIAS:	59

ABREVIATURAS

Cuando en esta tesis se haga referencia a las siguientes abreviaturas se entenderá:

IDPs Inmunodeficiencias primarias

ALX Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

AR Receptor de andrógeno Humano

HUMARA Gen del receptor de andrógenos humano

Btk Proteína cinasa de Bruton

°C Grados Celsius

kDa Kilodaltones

pb Pares de bases

seg Segundos

μL Microlitros

ng Nanogramos

mM Milimolar

rpm Revoluciones por minuto

V Volts

CD Grupo de diferenciación

G6PD Enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

HPRT Hipoxantina fosforibosiltransferasa

PGK Fosfoglicerato cinasa

STR Secuencias repetidas cortas

PBMCs Células mononucleares de sangre periférica

PBS Buffer fosfato salino

RPMI Medio Roswell Park Memorial Institute

EDTA Ácido etildiaminotetraacético

DNA Ácido desoxirribonucleico

gDNA Ácido desoxirribonucleico genómico

EBV Virus de Epstein-Barr

18S Unidad ribosomal, la letra S representa Svedberg

A Adenina

G Guanina

C Citosina

T Timina

M Mamá

P Paciente
H Hermana
F Sentido
R Antisentido
dNTPs Desoxirribonucleótidos trifosfato
H₂O Agua
MgCl₂ Cloruro de magnesio
CO₂ Dióxido de Carbono
SCID Inmunodeficiencia combinada severa
CVID Inmunodeficiencia común variable
ROS Especies reactivas de oxígeno
EBV Virus de Epstein-Barr
Ig Inmunoglobulina
IgD Inmunoglobulina tipo D
IgM Inmunoglobulina tipo M
V Región variable
C Región constante
BCR Receptor de célula B
RNA Ácido ribonucleico
rRNA Ácido ribonucleico ribosomal
Cr Cromosoma
ESID Sociedad Europea para las Inmunodeficiencias
IUIS Unión Internacional de Sociedades de Inmunología
SNP Polimorfismos de un simple nucleótido
VNTR Polimorfismos en el número de repetición en tandem
RFLP Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

LISTA DE ILUSTRACIONES Y TABLAS.

TABLAS

Tabla 1. Principales inmunodeficiencias primarias. Modificado de (Abbas A, 2008)	13
Tabla 2. Cebadores para el exón 1 del gen <i>AR</i>	34
Tabla 3. Condiciones para la PCR touch down	34
Tabla 4. Cebadores para 18S	35
Tabla 5. Condiciones para la PCR para 18S	36
Tabla 6. Resultados observados después del análisis en el secuenciador automatizado ABI 310 de las mamás posibles portadoras.....	40
Tabla 7. Resultados de muestras de DNA digerido enzimáticamente y sin ningún tratamiento previo de mamás, analizado por secuenciador automatizado ABI 310.....	43
Tabla 8. Resultados del análisis con secuenciador ABI 310 de las muestras del control positivo y mamás obtenidas de células infectadas con EBV después de la digestión enzimática.....	47
Tabla 9. Resultados del análisis con secuenciador automatizado ABI 310 de las muestras de mamás obtenidas de células infectadas por EBV sin ningún tratamiento previo, comparada con las muestras digeridas enzimáticamente.....	48
Tabla 10. Análisis de las muestras de DNA digerido de mamás y muestras de DNA de hijos sin digestión, por secuenciador automatizado ABI310.	49

ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Desarrollo de linfocitos B. (modificado de Charlotte, 2005).....	10
Ilustración 2. Estructura y señalización mediada por el pre-BCR. (tomado de http://www.biologie.uni-erlangen.de/genetik/resact_winkler-Dateien).	11
Ilustración 3. Datos estadísticos del número de pacientes con inmunodeficiencias reportados cada año.	14
Ilustración 4. Clasificación y frecuencia de las IDPs.	15
Ilustración 5. ALX en varones comparada con varones sanos.	17
Ilustración 6. Genealogía de una enfermedad ligada al cromosoma X heredada de manera dominante. XA corresponde al cromosoma X afectado, XS corresponde al cromosoma X sano.	18

Ilustración 7. Herencia Ligada al Cromosoma X.	19
Ilustración 8. Genealogía de una enfermedad ligada al cromosoma X heredada de manera recesiva. XA corresponde al cromosoma X afectado, XS corresponde al cromosoma X sano.	19
Ilustración 9. Ejemplo de identificación de heterocigotas (portadoras) para hemofilia. Tomado de (Mundo-Ayala & Jaloma-Cruz, 2008).....	21
Ilustración 10. Inactivación sesgada en mujeres portadoras comparada con mujeres no portadoras.....	23
Ilustración 11. Proceso de digestión enzimática y amplificación por PCR del gen <i>AR</i>	26
Ilustración 12. Efecto de la inactivación del cromosoma X en portadoras de ALX.....	27
Ilustración 13. Estandarización de la digestión enzimática. Productos de PCR visualizados en gel de agarosa al 2%.....	37
Ilustración 14. Resultados observados después del análisis en el secuenciador ABI 310.	38
Ilustración 15. Gel de agarosa al 1% de productos de PCR de los controles con cebadores 18S. Ambas muestras digeridas enzimáticamente.	39
Ilustración 16. Gel de agarosa al 1% de productos de PCR de los controles con cebadores 18S una vez digeridos enzimáticamente.	40
Ilustración 17. Gel de agarosa al 1% de productos de PCR de las muestras de DNA digeridas, obtenido por células infectadas con EBV de mamás con cebadores 18S.	47
Ilustración 18. Genealogía de la mamá 2.....	52
Ilustración 19. Genealogía de la mamá 30.....	52
Ilustración 20. Genealogía de la mamá 48.....	52

RESUMEN.

La inactivación del cromosoma X es un fenómeno que ocurre en la embriogénesis temprana femenina para lograr una compensación de dosis génica respecto a los varones. Este proceso ocurre al azar (tanto en cromosomas paternos como maternos), pero cuando existe alguna mutación en alguno de los cromosomas sexuales, esta inactivación ocurre de manera sesgada (en cromosomas maternos o paternos), que es característica en mujeres portadoras de enfermedades ligadas al cromosoma X (aquellas que afecten a una población celular o desarrollo de alguna población celular), esta característica es útil para la detección de portadoras de enfermedades ligadas a éste cromosoma. En este trabajo estandarizaremos una herramienta molecular para identificar la inactivación sesgada y por tanto determinar el estado de portadoras de la inmunodeficiencia primaria Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX) en mujeres. La ALX es una enfermedad que sólo afecta a varones, en ésta enfermedad, los pacientes carecen de linfocitos B maduros en órganos linfoides periféricos, esto como consecuencia de mutaciones en el gen que codifica para la proteína tirosina cinasa de Bruton (Btk), una enzima crítica para la maduración de dichas células. La herramienta molecular utilizada para la evaluación del patrón de inactivación del cromosoma X consiste en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen polimórfico del receptor de andrógenos humano (*AR*) con muestras de DNA de linfocitos B tratadas previamente con la enzima de restricción sensible a metilación HhaI, los productos de PCR se analizan en un secuenciador automatizado ABI 310 para poder observar los alelos inactivos (metilados) materno y paterno; permitiendo establecer el estado de portadoras de las mamás analizadas.

INTRODUCCIÓN

Sistema inmunológico

La inmunología es el estudio de todos los componentes del organismo encargados de la defensa del huésped contra infecciones o respuestas adversas del sistema inmune. (Janeway CA Jr, 2001)

El sistema inmunológico es el encargado de reconocer y destruir patógenos, a esto se le denomina inmunidad, es decir, resiste a la enfermedad y se divide en dos: inmunidad innata y adaptativa.

Las principales características de la inmunidad innata son: tiene una respuesta temprana frente a un antígeno, comprende células dendríticas, macrófagos, polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y NK (natural killer o asesinas naturales) y sus principales funciones son ingerir, matar y digerir patógenos.

La respuesta inmune adaptativa, por su parte, actúa después de la innata por lo que se dice que la respuesta es tardía; comprende linfocitos B y T cuya principal función es reconocer patógenos de manera específica y mediar su destrucción ya sea por medio de producción de anticuerpos o por medio de mecanismos celulares, mecanismos que se han denominado como respuesta inmune humoral y celular respectivamente (Abbas A, 2008) (Roitt M, 2008).

Existe además un grupo importante de células llamadas presentadoras de antígeno que comprenden a las células B, macrófagos y célula dendrítica cuya función principal comprende la fagocitosis del patógeno y la presentación de péptidos microbianos en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), ya sea tipo I o II; los péptidos presentados en MHC-I o II son reconocidos por células T específicas, las cuáles a su vez activan y favorece la eliminación del patógeno.

Maduración de los linfocitos B

Los linfocitos B son las células responsables de mediar la respuesta inmune humoral, lo hacen por medio de su diferenciación a células plasmáticas y la producción de anticuerpos específicos en respuesta a una estimulación antigénica.

Las células B detectan la presencia de patógenos gracias al receptor de células B (BCR), dichas señales además de iniciar la producción de anticuerpos, también regulan el desarrollo de células B, la supervivencia celular y la eliminación de las células B que reconocen componentes de su propio cuerpo. (Moschese, y otros, 2004)

En la médula ósea se da origen a las células B, a partir de una célula madre que no produce inmunoglobulinas (Ig) pero que está comprometida para formar la estirpe de células B.

El primer estadio celular en el desarrollo del linfocito B en la médula ósea es el linfocito pro-B, que expresan moléculas de superficie propias como CD19 y CD10. La molécula CD19 aparece de forma temprana y permanece en la célula hasta su diferenciación a célula plasmática (Ilustración 1). (Menno, 2006)

Las proteínas codificadas por los genes RAG (gen activador de la recombinación) se expresan por primera vez en este estadio, esta proteína es responsable de la recombinación de los genes Ig en los locos de la cadena pesada. (Roitt M, 2008)

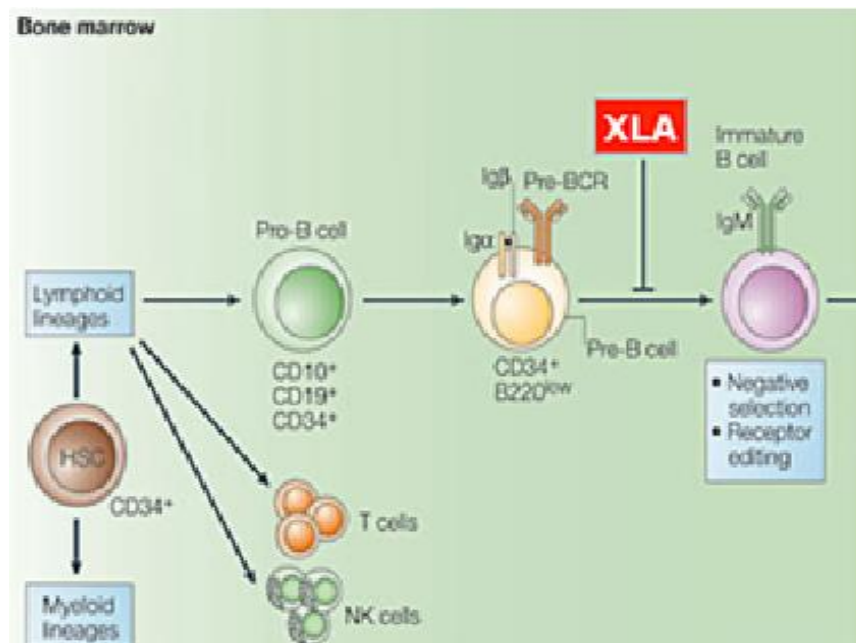
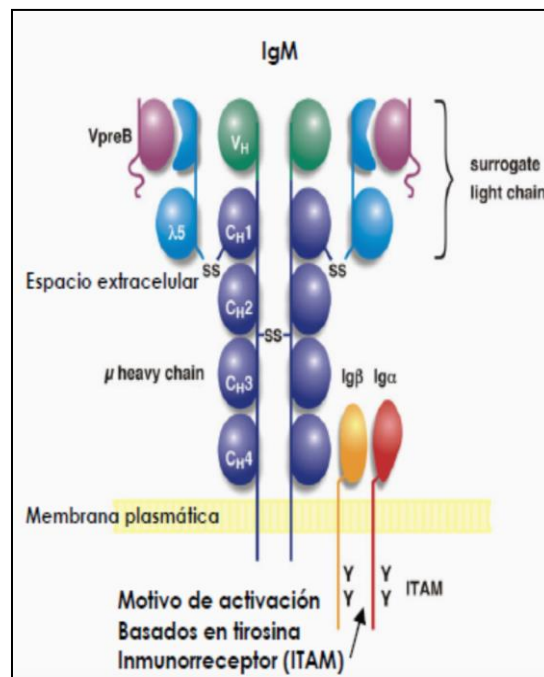


Ilustración 1. Desarrollo de linfocitos B. (modificado de Charlotte, 2005)

Se muestra la ontogenia de los linfocitos B, las moléculas que se expresan y en cuadro rojo se resalta XLA, que significa agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, que es una inmunodeficiencia primaria que se caracteriza porque las células pre-B no pasan al siguiente estadio que es células B inmaduras.

El siguiente tipo celular llamado linfocito pre-B que expresa una molécula o receptor pre-BCR que como su nombre lo indica es precursor del receptor BCR; las características de ésta molécula son: que se ensamblan la cadena pesada (μ) rearreglada a la cadena ligera que posteriormente sufrirá rearrreglos igual que la cadena pesada y a su vez, se asocian al heterodímero $Ig\alpha$ - $Ig\beta$ en la membrana del linfocito (Ilustración 2). Cabe destacar que tanto la cadena pesada como la ligera contiene una fracción variable (V) y una constante (C) (Geier K. & Schlissel S., 2006) (Roitt M, 2008) (Gamberale, 2004)

La tirosina cinasa de Bruton (BTK) es una proteína que interviene en la transmisión de señales procedentes del pre-BCR que son necesarias para que la célula continúe su proceso de maduración, ya que el pre-BCR forma un complejo de señalización de membrana en el que está incluido BTK.



**Ilustración 2. Estructura y señalización mediada por el pre-BCR. (tomado de http://www.biologie.uni-erlangen.de/genetik/resact_winkler-Dateien).
CH. Fracción constante de la cadena pesada, VH. Fracción variable de la cadena ligera.**

Una vez que los genes de la cadena ligera son rearreglados exitosamente, esta comienza a sintetizarse y se combina con la cadena pesada μ para así formar la molécula IgM. Y a su vez, esta molécula se expresará en la membrana junto con el heterodímero $Ig\alpha$ - $Ig\beta$ constituyendo el BCR de clase IgM característico del linfocito B inmaduro. A grandes rasgos, la célula B inmadura a través de su BCR recluta BTK hacia la membrana

plasmática, para que después sea fosforilada y a su vez produzca segundos mensajeros fundamentales para la activación funcional de los linfocitos B. (Desiderio, 1997)(López-Herrera, y otros, 2013)

Las células B maduras vírgenes o naive, coexpresan cadenas pesadas μ y δ asociadas con la cadena ligera κ o λ original y así poder producir IgM e IgD de membrana. Estas células ya son capaces de responder a un antígeno si es que lo encuentra, de no ser así, muere en pocos días o semanas. (Abbas A, 2008)

Inmunodeficiencias primarias

La integridad del sistema inmunológico es esencial para la defensa contra los microorganismos infecciosos y sus productos tóxicos; lo cual es crucial para la supervivencia del ser humano. Sin embargo, existen defectos que afectan el funcionamiento correcto del sistema inmune y reciben el nombre de inmunodeficiencias (ID), que pueden ser primarias o secundarias. (Abbas A, 2008)

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) se denominan así por deberse a defectos genéticos, los pacientes que padecen éstas enfermedades se caracterizan por presentar infecciones recurrentes. De manera general, la población pediátrica es principalmente afectada, sin embargo, algunos tipos de IDPs se diagnostican también en la adolescencia o en la edad adulta. Las IDs secundarias son resultado de factores extrínsecos al organismo, como son diferentes cuadros como desnutrición, cáncer diseminado, infección de las células del sistema inmunitario con el virus de la inmunodeficiencia humana (Abbas A, 2008) (Roitt M, 2008).

La diversidad de las IDPs hace difícil su diagnóstico y son causadas por una gran variedad de defectos genéticos así que su clasificación es importante además de que exista un acuerdo sobre su clasificación para facilitar el diagnóstico y tratamiento del paciente. Por ejemplo, en la tabla 1 se muestran las principales IDPs y se describe brevemente el fenotipo mostrado.

Tabla 1. Principales inmunodeficiencias primarias. Modificado de (Abbas A, 2008)

Inmunidad Humoral Afectada		Fenotipo
Linfocitos B y Anticuerpos	Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X	Ausencia de linfocitos B maduros
	Inmunodeficiencia común variable (CVID)	Producción defectuosa de IgA e IgG
	Síndrome de Wiskott-Aldrich	Anticuerpos anti-polisacárido defectuoso
Linfocitos T	Síndrome de DiGeorge	Defectos de Timo, linfocitos T y B afectados
	Deficiencia de MHC-I	Ausencia de linfocitos T citotóxicos
	Deficiencia de MHC-II	Ausencia de linfocitos T cooperadores
Linfocitos B y T	Síndrome de Hiper-IgM	No hay cambio de isotipo de Ig
	Síndrome linfoproliferativo	Proliferación incontrolada de linfocitos B en el marco de una infección por virus de Epstein-Barr (EBV)
	Inmunodeficiencia severa combinada (SCID)	Linfocitos T, B y células NK afectadas (fenotipo variable)
Inmunidad Innata Afectada		Fenotipo
Enfermedad granulomatosa crónica		Defectos en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)
Síndrome de Chédiak - Higashi		No se pueden liberar lisosomas o vesículas fuera de la célula

Ya que existe una gran diversidad de IDPs, fue necesario clasificarlas; en 1994, los inmunólogos europeos formaron una red de médicos e investigadores, la Sociedad Europea para las Inmunodeficiencias (ESID) con la finalidad de apoyar la investigación de la causa, el mecanismo y la terapia de inmunodeficiencias primarias.

Desde 2004 ESID ha funcionando como una base de datos para las inmunodeficiencias primarias, dicha base de datos de ESID es un registro de pacientes, que combina los datos clínicos y de laboratorio de pacientes con IDPs. Proporciona un conjunto de datos comunes de la actualidad, que incluye datos sobre los indicadores de diagnóstico, terapia, datos de laboratorio y los resultados de salud y se actualiza periódicamente, de acuerdo

con los avances en la investigación. La base de datos de ESID para IDPs se compone actualmente de 214 registros específicos de la enfermedad que se agrupan en ocho categorías principales y 73 subcategorías. (Gathmann, y otros, 2009) La clasificación se basa en la última establecida por la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) en 2007. Las ocho categorías principales son las siguientes: (Raif, y otros, 2007)

1. Inmunodeficiencias combinadas de células T y B
2. Deficiencias predominantemente en anticuerpos
3. Otros síndromes de inmunodeficiencias bien definidos
4. Enfermedades de desregulación inmune
5. Defectos congénitos del número de fagocitos, función o ambos
6. Defectos en la inmunidad innata
7. Enfermedades autoinflamatorias
8. Deficiencias en el complemento

De acuerdo con la base de datos del ESID, estos son los números finales del antiguo Registro ESID (2004-2014) (ilustración 3) donde se observa que se reportaron en el año 2014 un total de 19355 pacientes por 126 centros médicos, cada año esta cifra ha ido en aumento, lo que indica que cada vez hay más difusión de estas enfermedades, así como su diagnóstico, mejorando la calidad de vida de los pacientes. (<http://esid.org/Working-Parties/Registry/ESID-Database-Statistics>)



Ilustración 3. Datos estadísticos del número de pacientes con inmunodeficiencias reportados cada año.
Imagen tomada de <http://esid.org/Working-Parties/Registry/ESID-Database-Statistics>

Las IDPs correspondientes a la clasificación de enfermedades predominantemente de anticuerpos es de las más frecuentemente diagnosticadas hasta el año 2013 y 2014 (Ilustración 4), (<http://esid.org/Working-Parties/Registry/ESID-Database-Statistics>); dentro de este grupo de IDPs se encuentra la Agammaglobulinemia Ligada al Cromosoma X (ALX), descrita en el año 1952 por Odgen Bruton, es uno de los síndromes más comunes en todo el mundo, presenta con una incidencia de aproximadamente 1:200,000 (Bruton O, 1952).

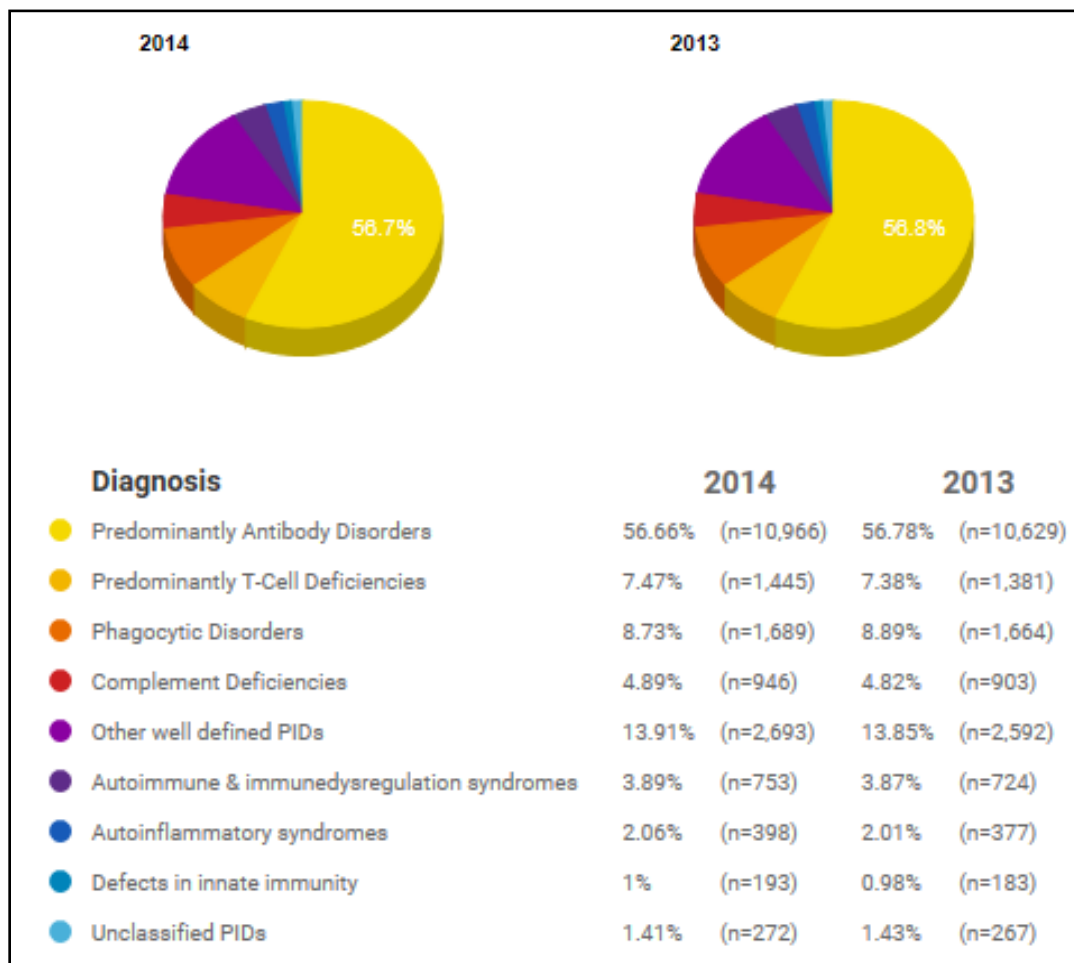


Ilustración 4. Clasificación y frecuencia de las IDPs.
 Tomada de (<http://esid.org/Working-Parties/Registry/ESID-Database-Statistics>)

Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X

Defectos en algunas cinasas involucradas en el desarrollo de los linfocitos B pueden afectar el funcionamiento de dichas células o su desarrollo adecuado; como es el caso de la tirosina cinasa de Bruton (BTK), que es un miembro de la familia Tec relacionada con Src de tirosina cinasas de proteínas, se ha demostrado que desempeñan un papel crucial tanto en el mantenimiento del número de células B periféricas y su respuesta a la interacción de BCR con el antígeno. El gen de la *BTK* se encuentra en la región Xq21.33-q22 y consta de 19 exones y 18 intrones, mutaciones en dicho gen provoca la agammaglobulinemia ligada a X (ALX). La proteína BTK, es fundamental para el desarrollo de los linfocitos B, en especial para la etapa de maduración, es decir, el paso de célula pro-B a pre-B y una de sus características es que tiene 5 dominios: PH, TH, SH3, SH2 y SH1. (López-Herrera, y otros, 2013).

La ALX como se mencionó anteriormente, fue descrita en el año 1952 por Odgen Bruton, razón por la cual también se le conoce también como agammaglobulinemia de Bruton, afecta a varones principalmente. (Abbas A, 2008) (Mattson P, M, & Smith C, 1996) (Khan W, y otros, 1995)(Ilustración 5).

Ya que su locus se encuentra en el cromosoma X, es aquí donde nos enfocaremos, los varones poseen además de 22 pares de cromosomas somáticos, los cromosomas sexuales comprenden un cromosoma X y un cromosoma Y. Únicamente los varones padecen esta enfermedad, ya que al sólo tener un cromosoma X, si es que ese cromosoma posee la mutación, será expresado; en cambio las mujeres al tener además de 22 pares de cromosomas, dos cromosomas X, si alguno de estos posee la mutación, no padecen la enfermedad porque el otro es sano y ese es el que se expresa, este fenómeno se llama inactivación sesgada del cromosoma X. (Centre for Genetics Education, 2007)

Esta enfermedad está caracterizada por apariciones tempranas de infecciones bacterianas, agammaglobulinemia, es decir, concentraciones de todos los isotipos de inmunoglobulina (IgM, IgG e IgA) por debajo de los valores de referencia en suero y ausencia de linfocitos B. (Conley, Mathias, Treadaway, Miregishi, & Rohrer, 1998)

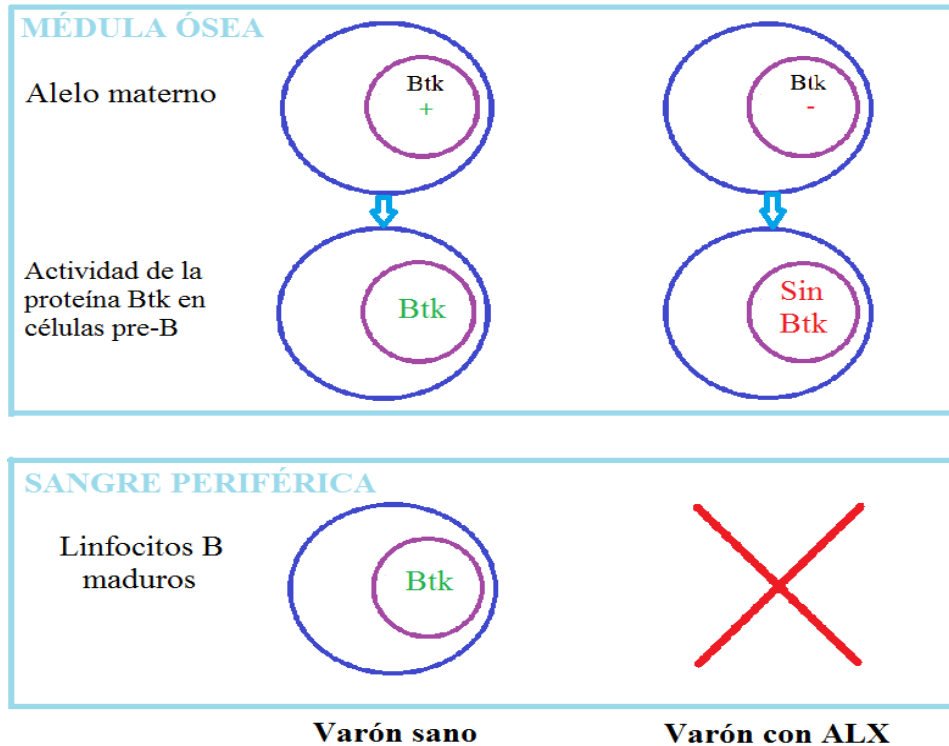


Ilustración 5. ALX en varones comparada con varones sanos.

En las células pre-B se expresa la proteína Btk cuyo gen se localiza en el cromosoma X, en el caso de los varones se expresará la proteína del alelo materno, el signo – representa cuando éste alelo porta alguna mutación que afecte la función o expresión de la proteína Btk y el signo + representa un alelo sano, cuando los linfocitos B salen a médula se denominan maduros y sólo maduran aquellos que expresan la proteína Btk y es funcional.

Inactivación del cromosoma X

Hablando de las enfermedades ligadas al cromosoma X; en la especie humana, el sexo se determina genéticamente al momento de la fertilización cuando se establece el dimorfismo de los cromosomas sexuales que son XX en el caso de la mujer y XY en el varón. (Guízar-Vázquez, 2001). Esta diferencia permite identificar un tipo de herencia mendeliana ligada al cromosoma X, el cuál puede ser dominante o recesivo según las características de expresión del gen.

Una herencia dominante ligada al cromosoma X tiene como características:

- Hombres afectados transmiten la condición a todas sus hijas pero a ninguno de sus hijos.
- Mujeres heterocigotas afectadas, tienen una probabilidad de transmitir la condición al 50% de sus hijos y 50% de sus hijas.

Las mujeres suelen desarrollar formas más leves de la enfermedad, debido a que el 50% de sus células habrán inactivado el cromosoma X portador de la mutación y expresarán el alelo normal del gen implicado. (Ilustración 6) (Strachan & Read, 2010)

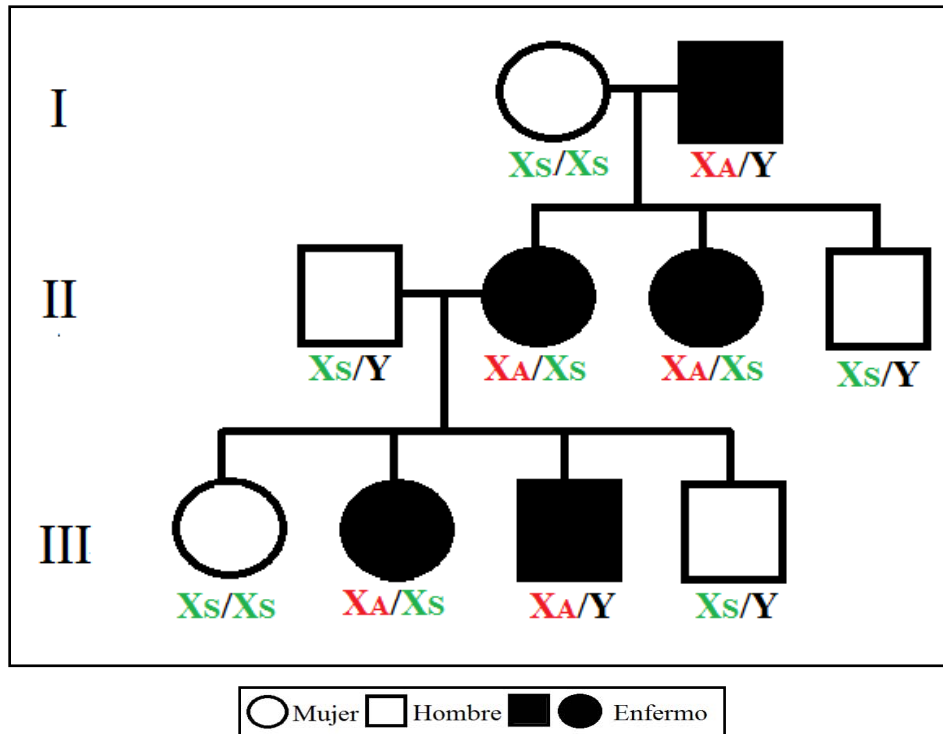


Ilustración 6. Genealogía de una enfermedad ligada al cromosoma X heredada de manera dominante. XA corresponde al cromosoma X afectado, Xs corresponde al cromosoma X sano.

Algunos ejemplos de estas enfermedades son el Síndrome de Rett, el Raquitismo Hipofosfatásico, o la Incontinencia Pigmentaria tipo 1.

Por otro lado las características de la herencia recesiva ligada al cromosoma X (Ilustración 7 y 8) pueden resumirse de la siguiente manera:

- Sólo se encuentran varones afectados
- La transmisión se realiza a través de heterocigotas, si el producto es varón tendrá un 50% de posibilidades de estar afectado o ser sano; si es mujer, la posibilidad de ser portadora o no es del 50%.
- Todos los hijos de un varón afectado serán sanos y sus hijas todas portadoras.
- No hay transmisión de varón a varón.

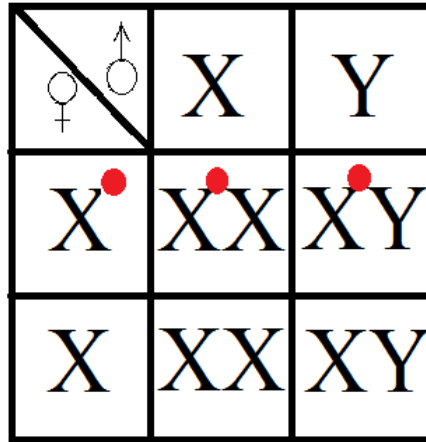


Ilustración 7. Herencia Ligada al Cromosoma X.
 En esta imagen se puede observar a la mujer (portadora) que tiene el alelo mutado en uno de sus cromosomas X, representado por un círculo rojo.

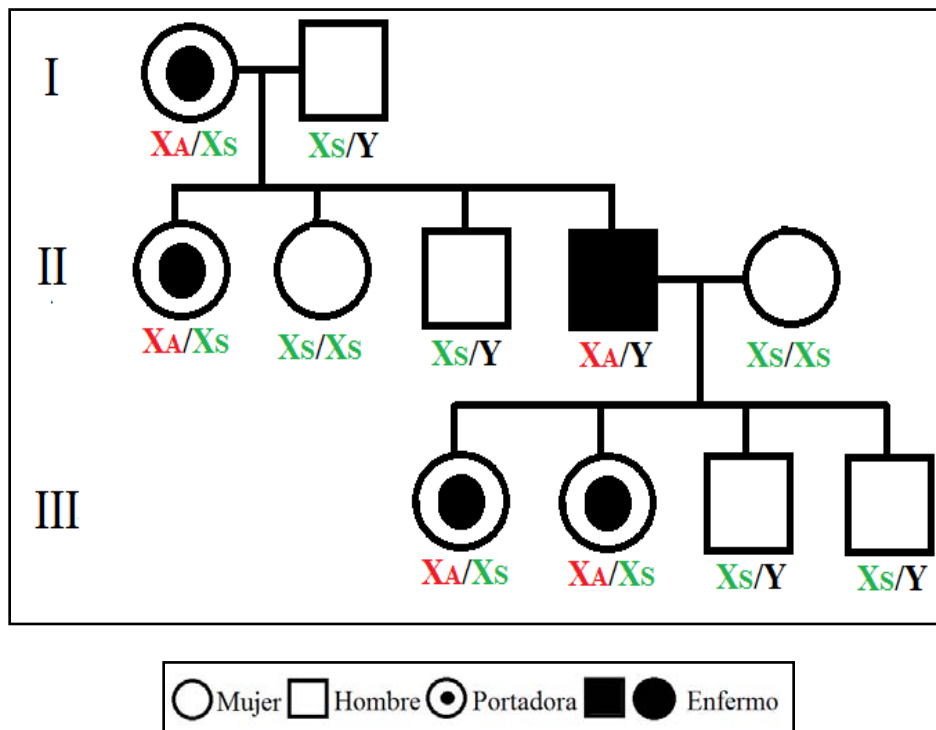


Ilustración 8. Genealogía de una enfermedad ligada al cromosoma X heredada de manera recesiva. XA corresponde al cromosoma X afectado, Xs corresponde al cromosoma X sano.

Algunos ejemplos de enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X son: Daltonismo, Hemofilia, Distrofia de Duchenne.

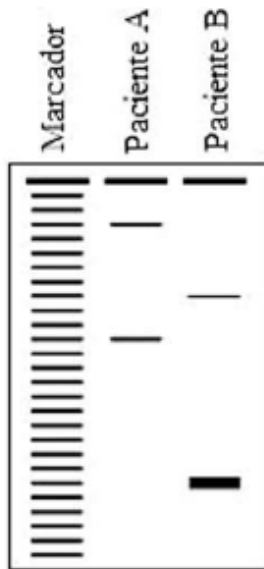
Nos enfocaremos a las enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X, ya que la ALX pertenece a este grupo, recordemos que los varones sólo tienen un cromosoma X y por ello una sola constitución genética es hemicigoto para los genes que se encuentran en el cromosoma X, porque carece de los *loci* correspondientes en el Y y siempre se expresarán los genes del cromosoma X (Centre for Genetics Education, 2007).

En el caso de las mujeres, al tener dos cromosomas X, uno de ellos sufre una inactivación al azar, conocida como lionización, éste fenómeno permite que la expresión de los genes presentes en el cromosoma X sea equivalente a la expresada en los varones que sólo poseen un cromosoma sexual X. En mujeres este fenómeno parece un mosaico celular, es decir, ya que el sistema de inactivación del cromosoma X es al azar, en unas células se inactivará el cromosoma materno y en otras el cromosoma paterno, teniendo como resultado una mezcla de dicha inactivación. (Briggs F & Reijo Pera, 2014)

En 1961, Mary Lyon postuló la hipótesis de Lyon (proceso de lionización), teoría antes mencionada cuyos puntos más importantes son:

- El cromosoma X condensado resulta genéticamente inactivo.
- La primera inactivación ocurre durante el desarrollo embrionario temprano, cuando se inactiva al azar el cromosoma X materno o paterno.
- La inactivación del X se hereda de manera clonal, es decir, una vez inactivado el X materno o paterno en una célula este mismo cromosoma se inactivará en las células descendientes.

Las características de las enfermedades ligadas al cromosoma X son muy parecidas en los varones afectados, sin embargo, aún dentro de una misma familia, en las mujeres hay diferencias en la manifestación en el estado de portadora, por el mosaico celular mencionado; si existen más células que tienen el cromosoma X con el gen mutado activo entonces aumenta la posibilidad de detección de mujeres heterocigotas (que sean portadoras) y por el contrario, es difícil identificar mujeres heterocigotas (que sean portadoras) cuando es mayor el número de células que tienen el cromosoma X con el gen sano activo (ilustración 9). (Belmont J, 2005)



Paciente A

Inactivación aleatoria del cromosoma X - Las bandas son de proporciones semejantes.

Paciente B

Inactivación sesgada del cromosoma X - Una de las bandas es más intensa que la otra.
Predominio de un alelo con respecto al otro.

Ilustración 9. Ejemplo de identificación de heterocigotas (portadoras) para hemofilia.

Tomado de (Mundo-Ayala & Jaloma-Cruz, 2008)

En esta imagen, se muestra la evaluación de la inactivación del cromosoma X mediante el análisis por PCR del gen AR. Paciente A es una mujer sana que expresa con la misma intensidad, dos bandas correspondientes al alelo paterno y materno. Paciente B es portadora, ya que expresa una de las dos bandas con mayor intensidad.

Hoy en día es sabido que el proceso de inactivación del cromosoma X se logra gracias a un locus llamado centro de inactivación del cromosoma X (CIX), localizado en Xq13. Dicha inactivación del cromosoma X tiene pasos importantes como el recuento de cromosomas X, elección del X que será inactivado y mantenimiento de la inactivación. Para los primeros pasos de la inactivación del cromosoma X, es importante transcritos específicos del X activo (XIST) que forma parte del CIX. (Ahn & Lee, 2008)

XIST es responsable del inicio del proceso de inactivación del cromosoma X, es un RNA funcional pero no-codificante, es decir, tiene una función, pero no se traduce a ninguna proteína, su función es unirse a lo largo de todo el cromosoma X, una vez unido produce la des-acetilación de histonas, recluta un complejo protéico que induce metilación de los residuos del aminoácido lisina-27 y lisina-9 de la histona H3 y como consecuencia la cromatina se condensa dando lugar así a la inactivación de ese cromosoma, ya que esa estructura evita que se traduzca. (Briggs F & Reijo Pera, 2014) (Ahn & Lee, 2008)

ALX y su relación con la inactivación del cromosoma X

En la ALX, las mutaciones en *BTK*, podrían generarse de *novo* o bien, ser heredadas del X de la madre de los pacientes, cuándo las mujeres que portan una mutación en *BTK* en uno de sus cromosomas X, se les denomina portadoras de la enfermedad ALX. Estas mujeres sólo son portadoras de la mutación para dicha enfermedad, pero no la padecen gracias al otro cromosoma sexual X que tienen y gracias también a que presentan inactivación sesgada del cromosoma X.

La inactivación sesgada del cromosoma X en las mujeres portadoras, significa que el cromosoma X inactivo siempre es el mismo (en este caso, el que contiene la mutación) y que en consecuencia el cromosoma X el cromosoma activo será el que no posea la mutación y que por lo tanto, la proteína que se traduzca de éste cromosoma será completamente funcional (Ilustración 10), de ésta manera, los linfocitos B maduros que se encuentran en los tejidos periféricos de estas mujeres, tendrán activo sólo al cromosoma que no presenta la mutación, siendo este fenómeno aprovechado desde el punto de vista metodológico para detectar el estado de portadoras de ALX (Autuoro M, Pirnie S, & Carmichael G, 2014).

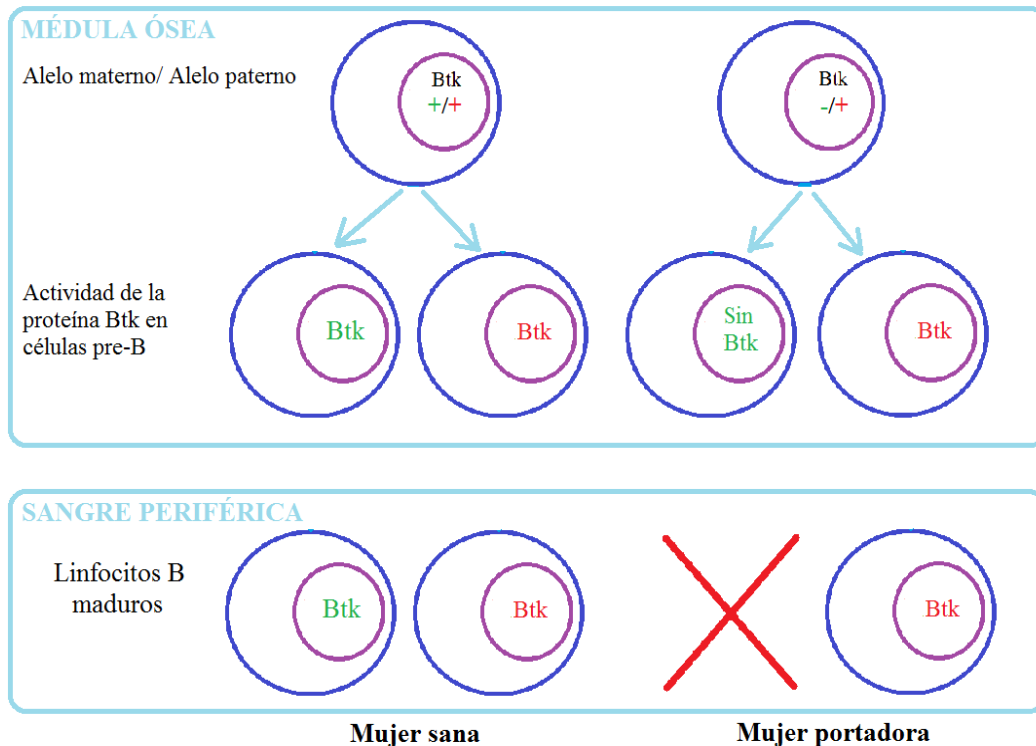


Ilustración 10. Inactivación sesgada en mujeres portadoras comparada con mujeres no portadoras.

En médula ósea los linfocitos pre-B expresan la proteína Btk cuyo gen se localiza en el cromosoma X, las mujeres al tener dos cromosomas X, expresan dos poblaciones pre-B, una con el alelo materno y otra con el paterno; para una mujer sana esas dos poblaciones maduran y sus linfocitos circulan por sangre periférica, pero para mujeres portadoras sólo la población del alelo sano será la que madure y salga a la periferia, el signo - representa el alelo con la mutación y el signo +, el alelo sano.

DNA Microsatélite

Primero describiremos los marcadores moleculares utilizados para la evaluación de inactivación del cromosoma X, descrita más adelante.

Los microsatélites, secuencias de repetidos cortos (STR) son secuencias de ADN en las que un fragmento se repite de manera consecutiva, se encuentra en zonas no codificantes del DNA, el número de repetidos varía de persona en persona y son utilizados como marcadores moleculares. (Strachan & Read, 2010)

Una de las técnica para evaluar la inactivación del cromosoma X utiliza este DNA que tiene una alta tasa de mutación, lo que los hace altamente polimórficos, que se define como variaciones o cambios en la secuencia de un lugar determinado del DNA que no provoca una enfermedad o algún daño al humano, la cual debe estar presente en al

menos 1% de la población; ya que si este porcentaje es menor, puede tratarse de una mutación que sea dañina para el ser humano. (Aranguren-Méndez, Román - Bravo, Isea, Villasmil, & Jordana, 2005)

Hay varios tipos de polimorfismos:

- Polimorfismos de un simple nucleótido (SNP). Donde hay una variación de una sola base nitrogenada, es decir, un cambio, una delección o adición, pero que como lo marca la definición de polimorfismo, no daña o afecta al ser humano ya que se encuentran en zonas no codificantes.
- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Consiste en repetidos de nucleótidos que tienen como característica que cerca de ellos se encuentran sitios de restricción, es decir, que cerca de ellos, enzimas de restricción pueden reconocer secuencias específicas y digerir o cortar el DNA.
- Polimorfismos en el número de repetición en tandem (VNTR). (Aranguren-Méndez, Román - Bravo, Isea, Villasmil, & Jordana, 2005) (Strachan & Read, 2010)

Técnicas para la evaluación de la inactivación del cromosoma X

Para evaluar el patrón de inactivación del cromosoma X es necesario distinguir entre ambos cromosomas (activo e inactivo) y determinar si se encuentran equitativamente activos. Una de las observaciones que apoya la inactivación de un cromosoma X en varias líneas celulares en la mujer, provino de la determinación de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), en eritrocitos de mujeres portadoras del gen mutado de la G6PD localizado en el cromosoma X; valores adecuados de G6PD deben provenir de una célula cuyo cromosoma X activo lleva el gen sano, pero ésta herramienta es limitada porque el polimorfismo es relativamente raro en la población caucásica (Busque, y otros, 1994) (Mundo-Ayala & Jaloma-Cruz, 2008)

La mejor opción para la evaluación del patrón de inactivación del cromosoma X ha sido la detección de las diferencias en la metilación entre los cromosomas X activo e inactivo.

La disponibilidad de sondas moleculares para la región 5' de genes polimórficos ligados al cromosoma X, como el gen de la hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT) y el gen de la fosfoglicerato cinasa (PGK), permiten la evaluación del patrón de inactivación en una gran cantidad de mujeres, pero, sólo 35 a 40% de las mujeres son heterocigotas para este polimorfismo. En 1992 se desarrolló una técnica que utiliza un polimorfismo de STR en el gen del receptor de andrógenos humano (AR), gen que en el primer exón contiene una

repetición altamente polimórfica de trinucleótidos CAG, lo cual permite establecer el origen parental de los cromosomas X en mujeres para este *locus*, su localización es Xq12. De manera que el polimorfismo simplemente sirve como un marcador genético que nos permite identificar el patrón de inactivación del cromosoma X presente en la población celular analizada (Mundo-Ayala & Jaloma-Cruz, 2008) (Fearon R, Winkelstein A., Civin I, Pardoli M, & Vogelstein, 2011).

La proximidad de las STR a cuatro sitios de restricción sensibles a metilación, dos HhaI y Hpa II, hace posible el análisis basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puesto que se ha demostrado que la metilación de estos sitios se correlaciona con la inactivación del cromosoma X. El DNA primeramente es digerido con enzimas de restricción que nos permiten distinguir alelos inactivos (metilado) y los alelos activos (no metilados), las enzimas que se utilizan para este análisis son sensibles a la metilación, es decir, su acción se bloquea en presencia de DNA metilado, de manera que sólo actuarán sobre DNA no metilado (activo), así que la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *AR* se realizará entonces sólo de los alelos inactivos (Ilustraciones 11 y 12) (Fearon R, Winkelstein A., Civin I, Pardoli M, & Vogelstein, 2011) (Cutler A., Huda Y., Moseley B., Rosenblatt M., & Belmont W., 1992)

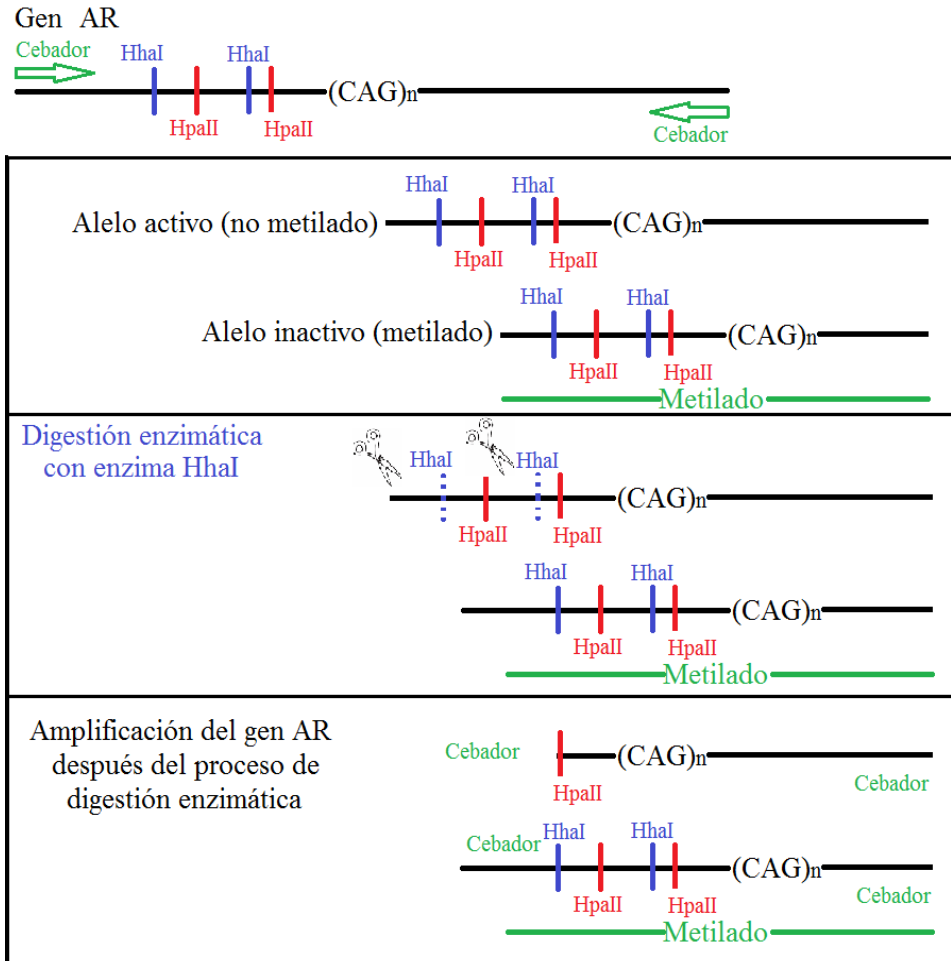


Ilustración 11. Proceso de digestión enzimática y amplificación por PCR del gen AR.
 Esta ilustración representa el gen AR con los repetidos CAG, los sitios de reconocimiento de las enzimas HhaI y HpaII cerca de los repetidos CAG. En el primer recuadro se representa el alelo activo e inactivo, éste último con metilación; en el segundo recuadro se representa el proceso de digestión enzimática, es decir, la enzima HhaI reconoce el sitio de restricción y corta el DNA sólo del alelo activo (no metilado); en el último recuadro se observan los alelos después de la digestión enzimática, el alelo activo fue cortado y el único que podrá ser amplificado por PCR con cebadores para el gen AR será el inactivo.

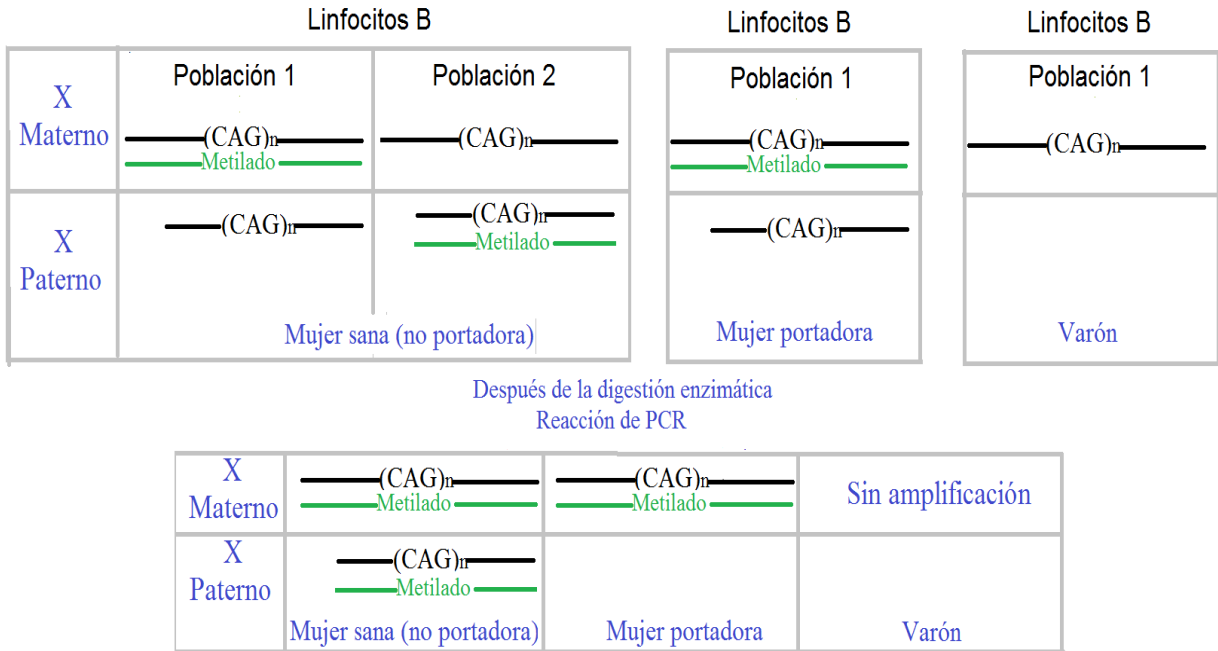


Ilustración 12. Efecto de la inactivación del cromosoma X en portadoras de ALX.

El primer recuadro representa la inactivación en una mujer sana (no portadora) en la que en una población linfocitaria se inactiva el alelo paterno y en otra el materno; en el segundo recuadro se observa una mujer portadora en el que siempre se inactiva el alelo materno y sólo hay una población linfocitaria; y en el último recuadro se observa el alelo materno del varón el cual está activo. En la parte inferior, se representan los alelos después de la digestión enzimática y la PCR en el cual, para una mujer sana habrá dos tamaños de repetidos CAG amplificados, para la mujer portadora habrá sólo un tamaño amplificado y para el varón no habrá amplificado.

Aplicaciones de la técnica HUMARA y DNA microsatélite

La técnica HUMARA nos permite evaluar el patrón de inactivación del cromosoma X, existen muchas aplicaciones de esta técnica, se ha reportado su uso para identificación de algunos tipos de cáncer, ya que se ha encontrado que algunos como el cáncer de mamá se caracterizan por la reactivación del cromosoma X inactivo y como consecuencia, estas células poseen 2 cromosomas X activos. Para estudios de ligamiento, cartografía genética, pruebas de paternidad y para la identificación del estado de portadoras de algunas enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X como hemofilia. (Chaligné & Heard, 2014) (Boudewijs, Van Dongen, & Langerak, 2007) (Banelli, y otros, 2010)

JUSTIFICACIÓN

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) son defectos genéticos que afectan principalmente a la población pediátrica, una de las más comunes es la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX).

En pacientes (varones) afectados por esta enfermedad, las mamás pueden ser portadoras, es decir que transmiten la enfermedad a sus hijos y por lo tanto cabe la posibilidad de que sus hijas también lo sean, esto ocurre porque la inmunodeficiencia es ligada al cromosoma X y se puede diagnosticar si son portadoras del gen mutado por el método HUMARA o descartar esta posibilidad del origen de la mutación del hijo afectado.

El Instituto Nacional de Pediatría aunque lleva más de una década dedicándose a la investigación de los defectos genéticos en la enfermedad ALX, sin embargo, el estado de portadora de las madres y hermanas de estos pacientes aún se desconoce, de manera que el hecho de realizar este ensayo ayudará a que las mujeres portadoras que se identifiquen serán plenamente conscientes de que sus hijos varones pueden nacer con esta enfermedad y así puedan elegir tener hijos o hacer estudios a sus hijos varones para darles un diagnóstico y tratamiento oportuno, así mismo, la técnica HUMARA estandarizada nos permitirá hacer el consejo genético a las mujeres de las familias analizadas y descartar mutaciones de *novo* en los pacientes que padezcan ALX.

OBJETIVOS

Objetivos Generales:

Determinar el estado de portadora en madres de pacientes con Agammaglobulinemia Ligada al Cromosoma X.

Objetivos particulares:

1. Estandarizar todos los pasos necesarios (purificación de linfocitos B, extracción de DNA, digestión enzimática) para la realización del ensayo HUMARA.
2. Realizar la genealogía de las posibles portadoras a estudiar.
3. Determinar si el alelo inactivo que portan los linfocitos B de las posible portadoras, corresponden al alelo del X de los varones afectados por medio del ensayo HUMARA.
4. Determinar si los alelos inactivos observados tras realizar el ensayo de HUMARA son comparables en linfocitos B purificados ó en líneas celulares obtenidas tras la infección con el virus EBV de las posibles portadoras estudiadas.
5. Identificar los alelos activo e inactivo de las posibles portadoras estudiadas.

HIPÓTESIS

Las mujeres con hijos que padezcan ALX serán portadoras de dicha enfermedad y por tanto será detectable utilizando la técnica HUMARA. El resultado del ensayo de HUMARA, será comparable, en el caso de que se utilice DNA de linfocitos B purificados ó DNA de células B inmortalizadas con el virus de Epstein Barr (EBV).

METODOLOGÍA

Extracción de células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs):

Se obtuvieron aproximadamente 10 ml de sangre periférica en un tubo vacutainer ACD (amarillo) con solución A.

En una campana de flujo laminar se colocaron 5ml de Ficoll – histopaque (Sigma Aldrich) en un tubo Falcon estéril de 15ml de capacidad y se adicionaron lentamente los 10ml de sangre evitando mezclar y/o agitar el tubo (para formar un gradiente de densidad).

El tubo se cerró y centrifugó durante 30 minutos a 1500 rpm con aceleración y desaceleración de 1, nuevamente en la campana de flujo laminar se extrajo la porción que contiene los monocitos y se trasladó a otro tubo Falcon estéril.

A continuación se realizaron los lavados de esta fracción celular agregando PBS 1X estéril hasta un volumen aproximado de 10ml, se centrifugó por 5 minutos a 1500rpm con aceleración y desaceleración de 7. Después de la centrifugación, en la campana de flujo laminar se decantó el tubo Falcon y se repitió el lavado (2 veces en total).

Se resuspendieron las células en 1 mL de solución PBS 1X, se cuantificaron las células con solución azul tripano 0.4% (Sigma Aldrich). Se colocó en un pozo 45µl de la solución azul tripano y 5µl de la suspensión celular.

Se colocaron 10µl de esta mezcla en una cámara de Neubauer y se observó al microscopio con el objetivo de 20X para contar las células de los cuadrantes marcados.

Purificación de linfocitos B.

Para éste ensayo, necesitamos separar los linfocitos B de las PBMCs previamente extraídas una de las proteínas que sólo se expresan en estos linfocitos es CD19 que es una proteína transmembranal glicosilada de 95 – 120 kDa que es crítica y está involucrada en la regulación del desarrollo, activación y diferenciación de los linfocitos B.

Dichos linfocitos se purificaron utilizando un anticuerpo anti-CD19 acoplado a perlas magnéticas (MACS) (Miltenyi Biotec).

Primero se centrifugó la suspensión celular a 1500rpm por 5 minutos con aceleración y desaceleración de 7, en campana de flujo laminar se decantó.

Por cada 10 millones de células, se agregaron 80µl del buffer de extracción de linfocitos B (el cuál contiene PBS 1X pH 7.2, EDTA 2mM y BSA 0.5%) y 20µl de anti-CD19, se mezcló

con ayuda de un vortex, se incubó en hielo durante 15 minutos. Una vez terminada la incubación se adicionaron 2ml del buffer para linfocitos B y se centrifugó nuevamente a 1500rpm por 5 minutos con aceleración y desaceleración 7.

Se desechó el sobrenadante en la campana de flujo laminar y se resuspendió el paquete celular en 500 μ l de buffer de extracción por cada 10 millones de células PBMCs extraídas al inicio.

Se colocó la columna MS (Miltenyi Biotec) del equipo en el magneto MACS MULTISTAND (Miltenyi Biotec) y se humedeció con 500 μ l del buffer de extracción, debajo de ella se colocó un tubo Falcon para recolectar la fracción CD19 negativa, a continuación se colocó la suspensión celular en la columna. Después de que toda la suspensión atravesó la columna, se realizaron los lavados agregando 500 μ l del buffer de extracción 3 veces en la columna.

Una vez que el buffer de extracción atravesó la columna, ésta se retiró del magneto y se cambió el tubo colector por un tubo FACS estéril marcado como CD19+. Se agregaron nuevamente 500 μ l de buffer de extracción 3 veces, permitiendo la elución de las células marcadas con el anticuerpo CD19, en la tercera ocasión se empujó el líquido apoyándose del émbolo de la columna.

Las células CD19+ se centrifugaron a 1500rpm por 5 minutos con aceleración y desaceleración de 7, se decantó en la campana de flujo laminar y se adicionó 1ml de medio RPMI, 2 μ l de Pansorbin y 2 μ l de mitógeno de Pokeweed, las células se incubaron durante aproximadamente 4 días en estufa a 37°C y 5% de CO₂, éste paso se realizó con la finalidad de lograr la expansión de las células y obtener un mejor rendimiento de DNA.

Extracción de DNA genómico

La extracción de gDNA se realizó utilizando el kit de extracción (Qiagen). Brevemente tras el tiempo de incubación se centrifugó el tubo FACS a 1500rpm durante 5 minutos con aceleración y desaceleración de 7.^{1,2} Se decantó y agregó 400µl de solución de lisis de leucocitos, se mezcló con vortex hasta observar una solución homogénea y se trasladó la mezcla a un tubo Eppendorf. Se agregaron 150µl de solución para precipitar proteínas, se mezcló con vortex hasta observar una solución blanca y se centrifugó a 13500rpm durante 10 minutos.

Se trasladó el sobrenadante a otro tubo Eppendorf contando el volumen total trasladado y se adicionó la misma cantidad (de sobrenadante medido) de isopropanol, se mezcló invirtiendo el tubo hasta observar el DNA.

Se centrifugó a 13500rpm durante 10 minutos, una vez terminada la centrifugación, se quitó el sobrenadante y se agregaron 500µl de etanol al 70% para realizar el lavado; se centrifugó nuevamente a 13500rpm por 10 minutos. Cuando el proceso terminó, se decantó y se dejó secando en la campana de flujo laminar aproximadamente 16 horas.

Una vez seco, se hidrató con 60 - 100µl de solución de rehidratación de DNA y se incubó 24 horas a temperatura ambiente.

Después de la incubación, se cuantificó con un espectrofotómetro a las longitudes de onda de 260 y 280nm⁻¹.

Estandarización de la amplificación del gen AR por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Ya que se utilizará la metodología del análisis por PCR del gen AR primero se estandarizó el ensayo para que los cebadores (invitrogen) funcionen adecuadamente, utilizando DNA genómico de linfocitos B sin digerir y sin ningún tratamiento previo para asegurar que haya amplificación y éste sea de un peso aproximado de 280 pb.

¹ Si se utilizan muestras de líneas celulares que fueron inmortalizadas con virus de Epstein-Barr (EBV), únicamente se agrega la solución de lisis de leucocitos, seguida de la solución de precipitación de proteínas.

² Para las muestras de los pacientes, el DNA se extrae de sangre periférica (1mL), lisando primero los eritrocitos con una solución específica, centrifugando a 3500rpm por 5 minutos, decantando y repitiendo dos veces el procedimiento y la extracción continua igual que el mencionado a continuación.

Los reactivos y las condiciones utilizadas para la amplificación por PCR del gen *AR* se describen a continuación:

- Buffer 10X 2.5 μ l
- dNTPs 10 mM 0.5 μ l
- MgCl₂ 25 mM 1.5 μ l
- Cebador –F 25 μ M 0.2 μ l
- Cebador –R 25 μ M 0.2 μ l
- Betaína 5M 5.0 μ l
- H₂O 14.0 μ l
- gDNA 1 μ l (~100ng)

Para un volumen final de 25 μ l

Tabla 2. Cebadores para el exón 1 del gen *AR*

	Sentido	Antisentido
Secuencia	GCTGTGAAGGTTGCTGTTCTCAT	TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC

Las condiciones para realizar la PCR, se muestran a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones para la PCR touch down

Número de ciclos	Temperaturas y duración		
	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
1	95°C 5 min		
4	95°C 15 seg	66°C 30 seg	68°C 30 seg
4	95°C 15 seg	64°C 30 seg	68°C 30 seg
4	95°C 15 seg	60°C 30 seg	68°C 30 seg
4	95°C 15 seg	58°C 30 seg	68°C 30 seg
20	95°C 15 seg	56°C 30 seg	68°C 30 seg
1		68°C 5 min	10°C ∞

Una vez concluidos los ciclos del PCR, los productos obtenidos se visualizaron con una electroforesis en geles de agarosa al 2%, con un tiempo aproximadamente 40 minutos a un voltaje de 100 V, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y observaron en un transluminador utilizando luz ultravioleta (UV).

Estandarización de la digestión enzimática

Se establecieron las condiciones de la digestión enzimática con la enzima HhaI (thermo scientific) utilizando DNA testigo con un control positivo, es decir, una mujer sana (que no es portadora) y un control negativo equivalente a un varón sano para validar la digestión completa, bajo las siguientes condiciones:

- Buffer Tango 10x 2 μ l
- HhaI (10u/ μ l) 20 unidades
- DNA ~ 1 μ g
- H₂O Necesaria para un volumen de 18 μ l

Volumen final de 18 μ l

Después de 3 horas de incubación a 37°C, se adicionaron 20 unidades de enzima HhaI para tener un volumen total de 20 μ l; y se incubó por 3 horas más (6 horas en total). Al final la actividad de la enzima se inactivó tras incubar las muestras durante 15 minutos a 70 °C, donde esperamos fragmentos de una longitud de 280pb.

Análisis de fragmentos de PCR en el secuenciador automatizado

Se realizó PCR con los cebadores para el exón 1 del gen *AR*, de acuerdo a lo descrito en la sección anterior, la PCR se realizó utilizando el cebador sentido acoplado al fluorocromo 5-FAM (absorción 492nm, emisión 518nm) y con el cebador antisentido normal; de manera que esta fluorescencia pueda ser captada por el secuenciador.

1 μ l del producto de PCR fue mezclado con 0.5 μ l del marcador de peso GeneScan 500 (Applied Biosystems) y 9.5 μ l de formamida desionizada, para posteriormente ser analizada en un secuenciador automatizado ABI310.

Amplificación del gen constitutivo 18S

También las muestras de las mamás una vez digeridas, se les realizó una amplificación con cebadores 18S (tabla 4) por PCR para corroborar el estado del DNA.

Tabla 4. Cebadores para 18S

	Sentido	Antisentido
Secuencia	GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT	TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC

Tabla 5. Condiciones para la PCR para 18S

Número de ciclos	Temperaturas y duración		
	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
1	95°C 5 min		
38	95°C 15 seg	57°C 30 seg	68°C 30 seg
1		68°C 5 min	10°C ∞

Los productos de PCR para el gen 18S fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% utilizando luz UV después de ser sometido a electroforesis por 30 minutos a 100 V y teñido posteriormente con bromuro de etidio y los productos visualizados deben tener un tamaño aproximado de 500pb.

RESULTADOS:

Estandarización de la técnica HUMARA

Para la estandarización de la técnica HUMARA se realizó la PCR del *AR* utilizando los siguientes controles: gDNA de varones y mujeres sanas (no portadoras) ambas sin digerir y digeridas con la enzima HhaI, como se observa en la ilustración 13. La amplificación fue positiva tras utilizar gDNA de varones y mujeres sanas (no portadoras) sin digerir ya que se puede observar una banda en cada uno a aproximadamente 300pb que es el correspondiente al exón 1 del *AR*, sin embargo, la amplificación del gDNA digerido con HhaI resultó negativa en la muestra del varón porque no se observa ninguna banda y en la correspondiente a la mujer sana sí se observa una banda en aproximadamente 300pb, igual que en la muestra sin digerir (ilustración 13). Los resultados observados a continuación (ilustración 13, ilustración 14), indican una digestión completa del DNA con las condiciones mencionadas anteriormente.

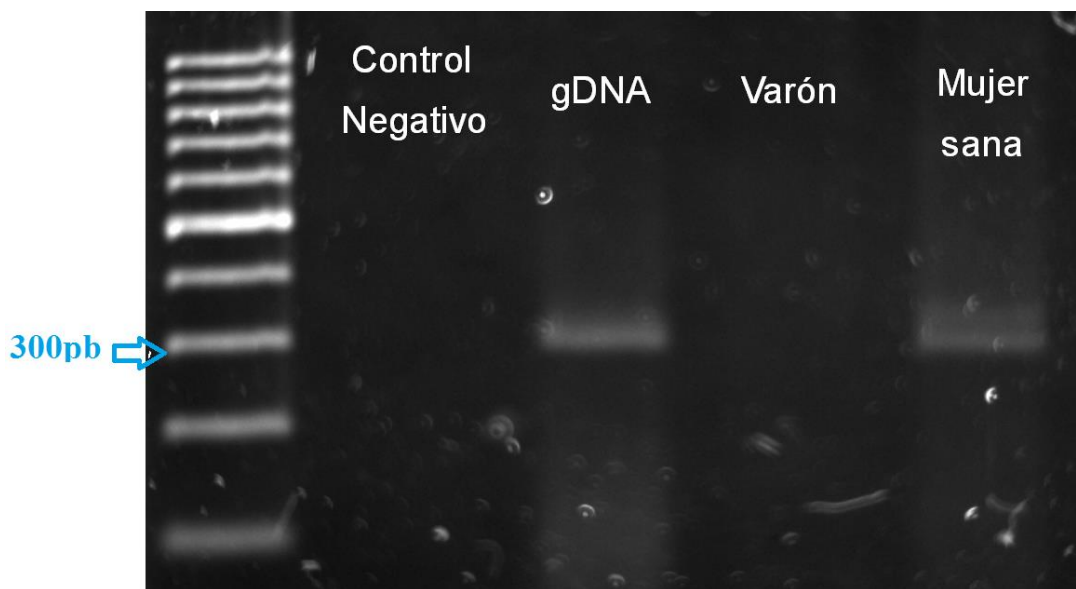


Ilustración 13. Estandarización de la digestión enzimática. Productos de PCR visualizados en gel de agarosa al 2%.

Primer pozo contiene el marcador de peso molecular, segundo pozo es control negativo, tercer pozo tiene DNA obtenido de linfocitos B, el cuarto pozo tiene DNA digerido de un varón y el último contiene DNA digerido de control positivo.

Una vez amplificadas, se realizó el análisis de fragmentos de los productos de PCR con un secuenciador automatizado ABI 310; los resultados son presentados en la ilustración 14, en la sección A y B, se observan dos picos correspondientes a los alelos materno y paterno inactivos respectivamente de las mujeres sanas no portadoras, para el control 1

(ilustración 14A), sus dos alelos tienen un tamaño aproximado de 274 y 282pb; para el control 2 (ilustración 14B), sus dos alelos tienen un tamaño aproximado de 280 y 304pb respectivamente. Es importante mencionar que estos dos controles fueron sometidos al proceso de digestión enzimática. Para el control negativo, es decir, la muestra del varón en la ilustración 14C, no se observa ningún pico y en la ilustración 14D se presenta la imagen de la muestra del mismo varón, pero sin que fuera sometido al proceso de digestión enzimática, en la cual se observa un pico a 288pb que representa al alelo materno (activo).

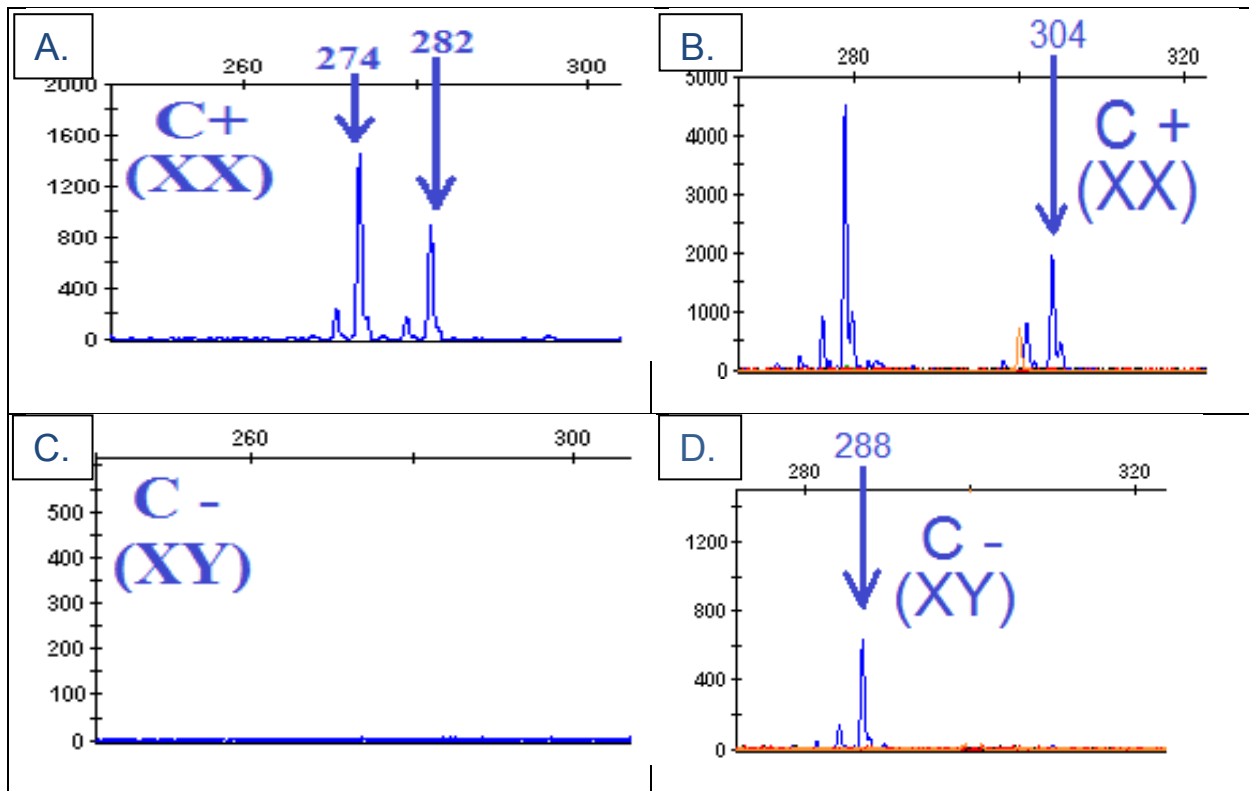


Ilustración 14. Resultados observados después del análisis en el secuenciador ABI 310.
A. Muestra de mujer sana 1 digerida enzimáticamente. B. Muestra de mujer sana 2 digerida enzimáticamente. C. Muestra de varón sano digerido enzimáticamente. D. Muestra de varón sano sin digestión enzimática.

También las muestras de DNA de los controles que fueron sometidos al proceso de digestión enzimática, se amplificaron con los cebadores 18S, con la finalidad de comprobar el buen estado del DNA, la veracidad de los resultados, así que el hecho de que no haya amplificación del AR no se debe al DNA, sino a la completa digestión enzimática (Ilustración 15).

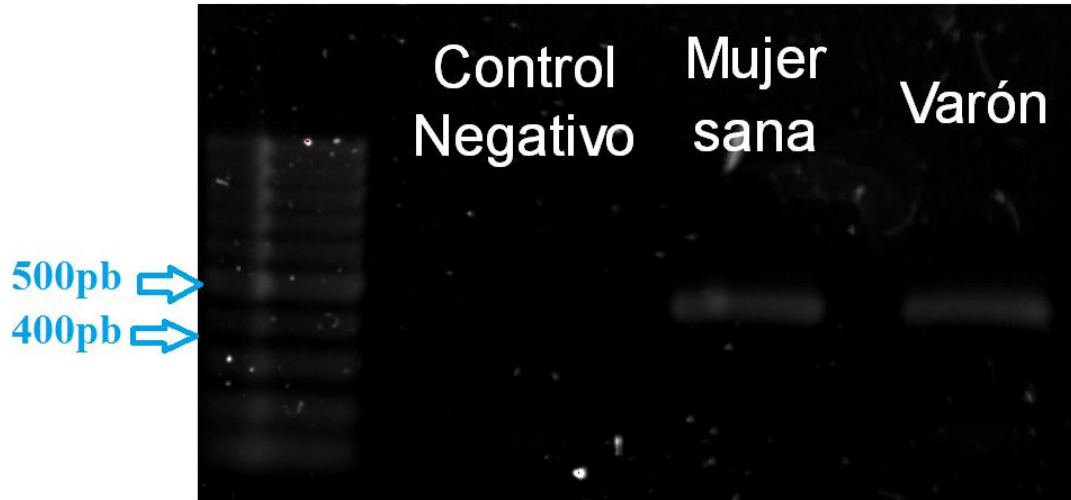


Ilustración 15. Gel de agarosa al 1% de productos de PCR de los controles con cebadores 18S. Ambas muestras digeridas enzimáticamente.

Las tres imágenes anteriores (Ilustraciones 13, 14 y 15) muestran la estandarización completa del ensayo HUMARA que comprende la digestión enzimática, PCR con los cebadores para el gen *AR* y *18S*.

Digestión enzimática de las posibles portadoras

Una vez estandarizado se analizaron las muestras de las mamás de los pacientes con ALX, siguiendo este mismo protocolo; primero se trataron las muestras de DNA obtenidas de células B con la digestión enzimática y después de que se observó amplificación por PCR tanto con cebadores para el gen *AR* como para el *18S* (Ilustración 16), se llevaron a analizar en el secuenciador automatizado.

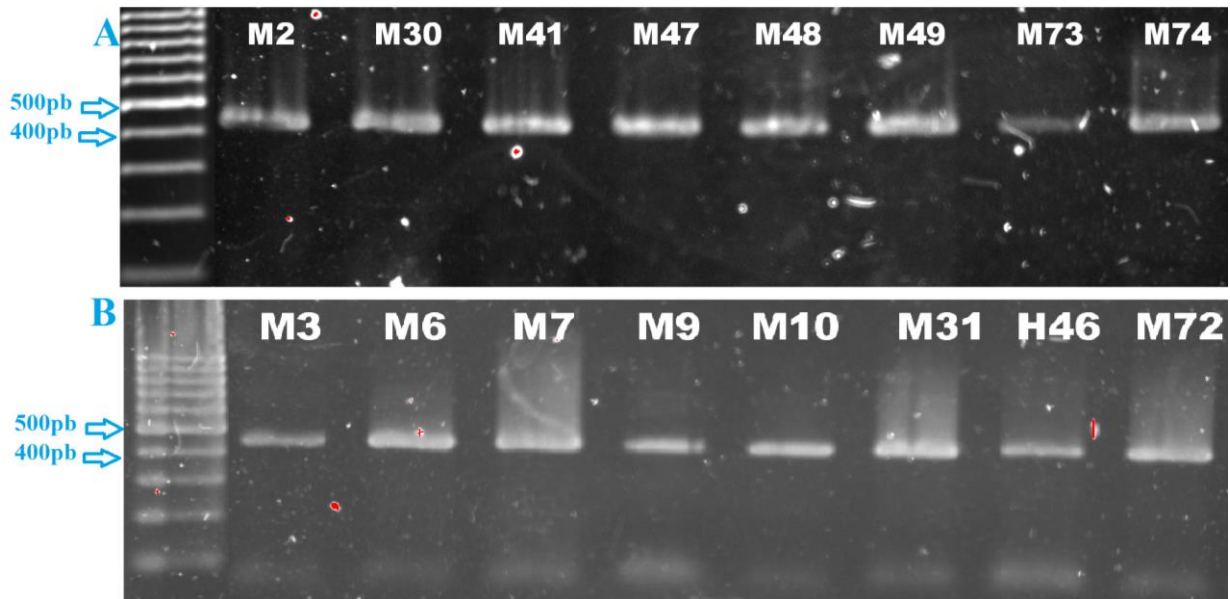


Ilustración 16. Gel de agarosa al 1% de productos de PCR de los controles con cebadores 18S una vez digeridos enzimáticamente.
El primer pozo contiene el marcador de peso molecular tanto para A como para B y el resto corresponde a muestras de mamás.

Tras analizar los productos de PCR con cebadores HUMARA en el secuenciador ABI 310 se pudo observar únicamente un producto representado por un pico correspondiente al alelo inactivo (metilado), en las muestras correspondientes a las posibles portadoras³, para cada individuo el tamaño es diferente pero están dentro del intervalo de 270 – 300pb (tabla 6).

Análisis de las muestras de las posibles portadoras con la técnica HUMARA

Una vez que se llevo a cabo la amplificación por PCR con los cebadores HUMARA de las muestras de las posibles portadoras, se analizaron en un secuenciador automatizado ABI310 con la finalidad de observar con mayor detalle la longitud de los fragmentos correspondientes al alelo inactivo (metilado), amplificados tras la digestión enzimática con la enzima HhaI.

³ El número correspondiente a cada una de las posibles portadoras fue asignado de acuerdo al número que actualmente tiene el paciente con ALX.

Tabla 6. Resultados observados después del análisis en el secuenciador automatizado ABI 310 de las mamás posibles portadoras.

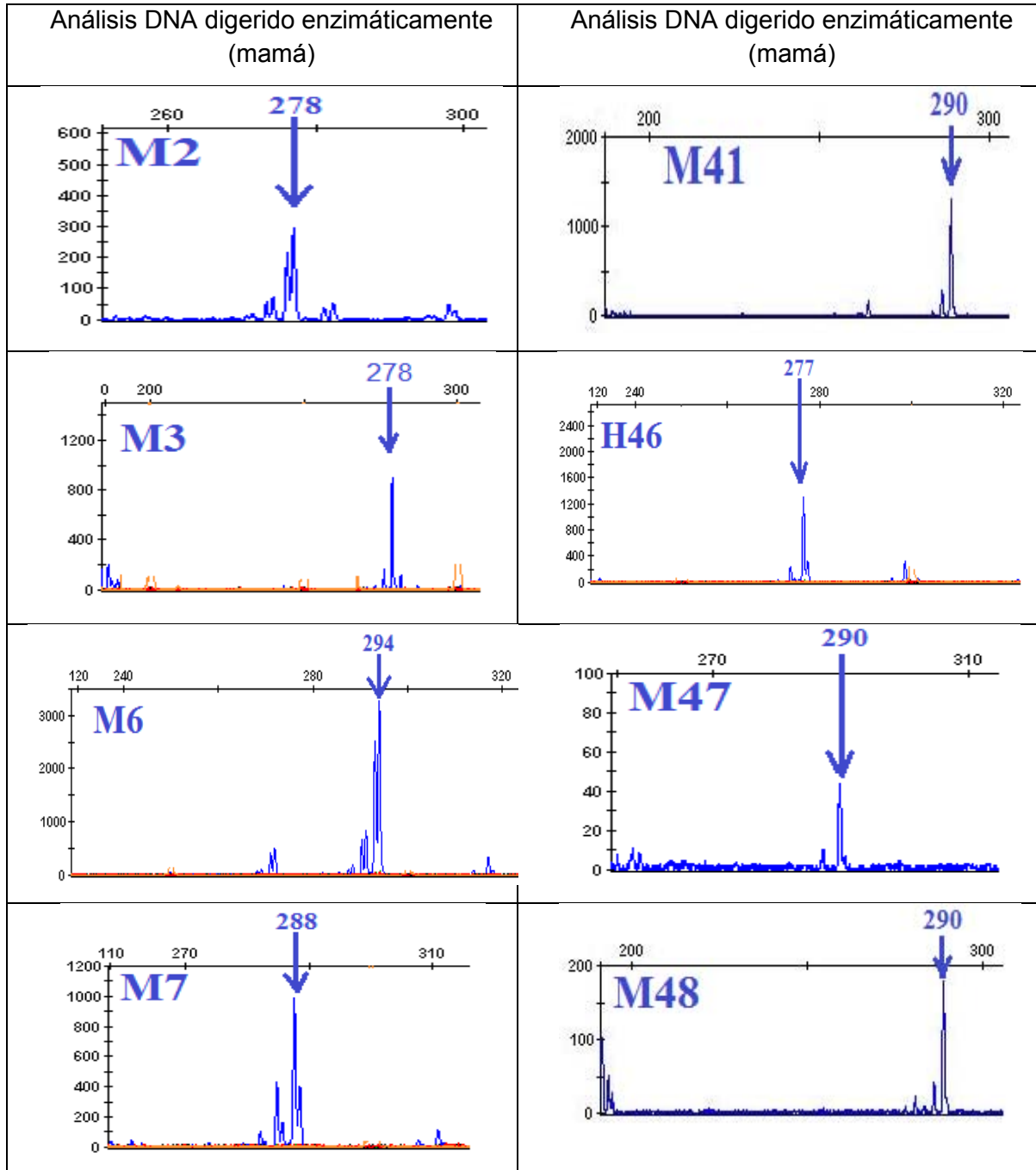
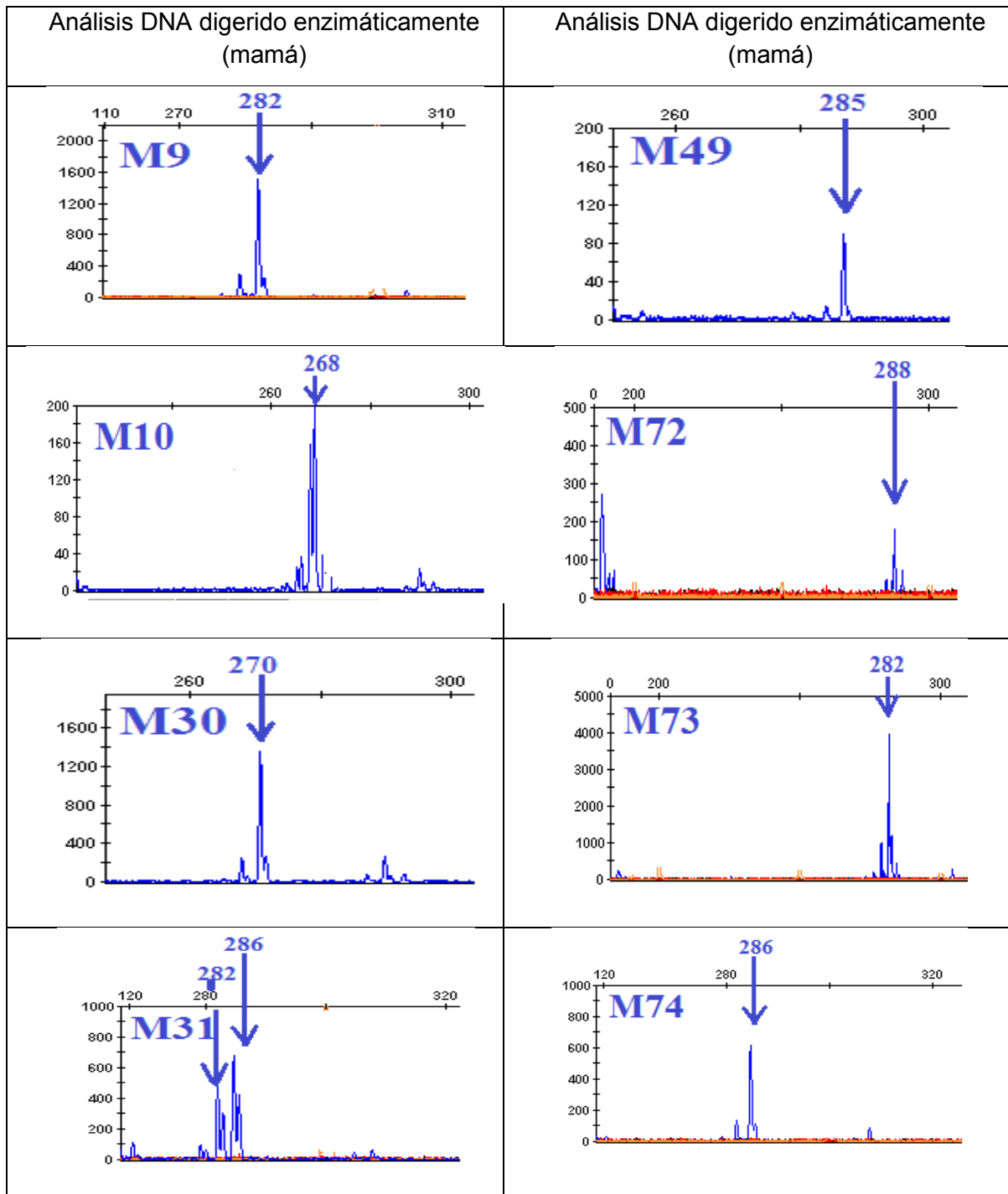


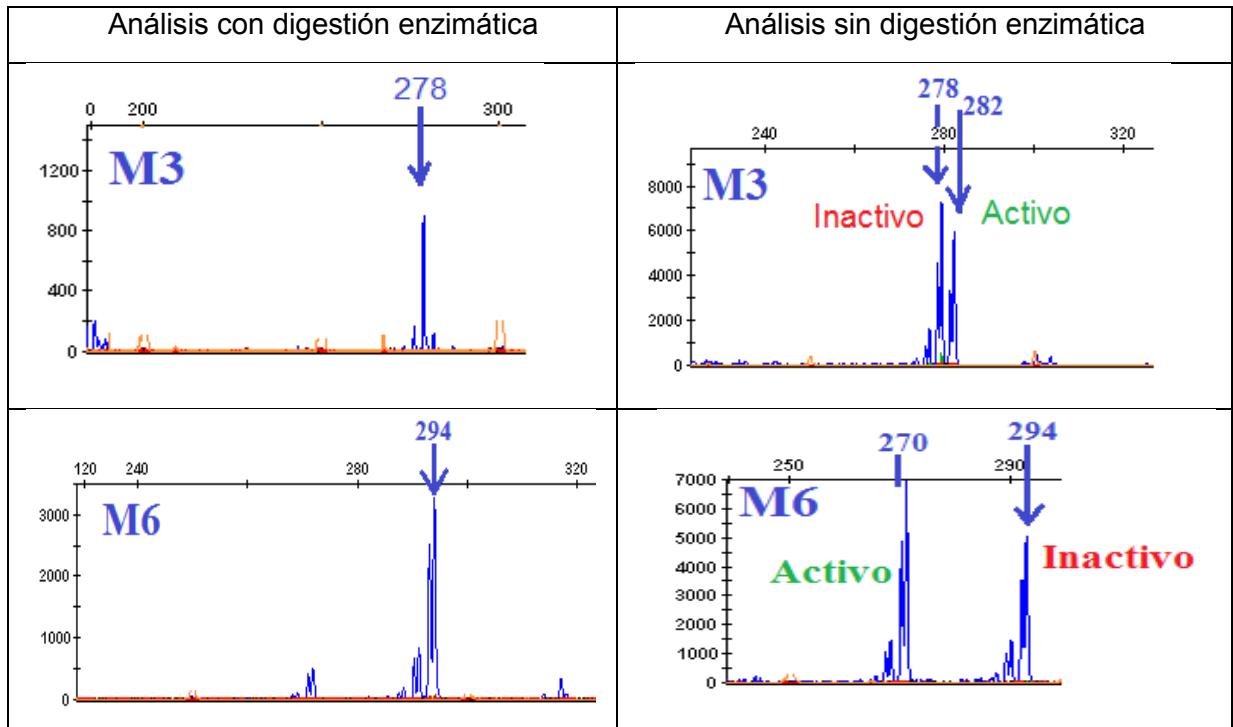
Tabla 6 continuación. Resultados observados después del análisis en el secuenciador automatizado ABI 310 de las mamás posibles portadoras.



Identificación de ambos alelos (inactivo y activo) de las posibles portadoras

Con la finalidad de determinar si la metodología empleada funcionaba adecuadamente, se procedió a realizar la PCR con cebadores HUMARA para las muestras de gDNA obtenido de linfocitos B, de las mismas mamás pero dichas muestras no fueron sometidas al proceso de digestión enzimática y de la misma manera que las anteriores fueron analizadas en un secuenciador automatizado ABI 310, como resultado, se observan los dos alelos de las mamás (materno y paterno respectivamente) y comparando con el resultado del análisis de los productos sometidos a digestión enzimática, se logró identificar tanto el alelo activo (no metilado) como el inactivo (metilado), concluyendo que el proceso de digestión realizado es eficiente (tabla 7)⁴.

Tabla 7. Resultados de muestras de DNA digerido enzimáticamente y sin ningún tratamiento previo de mamás, analizado por secuenciador automatizado ABI 310.



⁴ Sólo se analizaron algunas mamás de ésta manera, debido a la disponibilidad de muestra.

Tabla 7 continuación. Resultados de muestras de DNA digerido enzimáticamente y sin ningún tratamiento previo de mamás, analizado por secuenciador automatizado ABI 310.

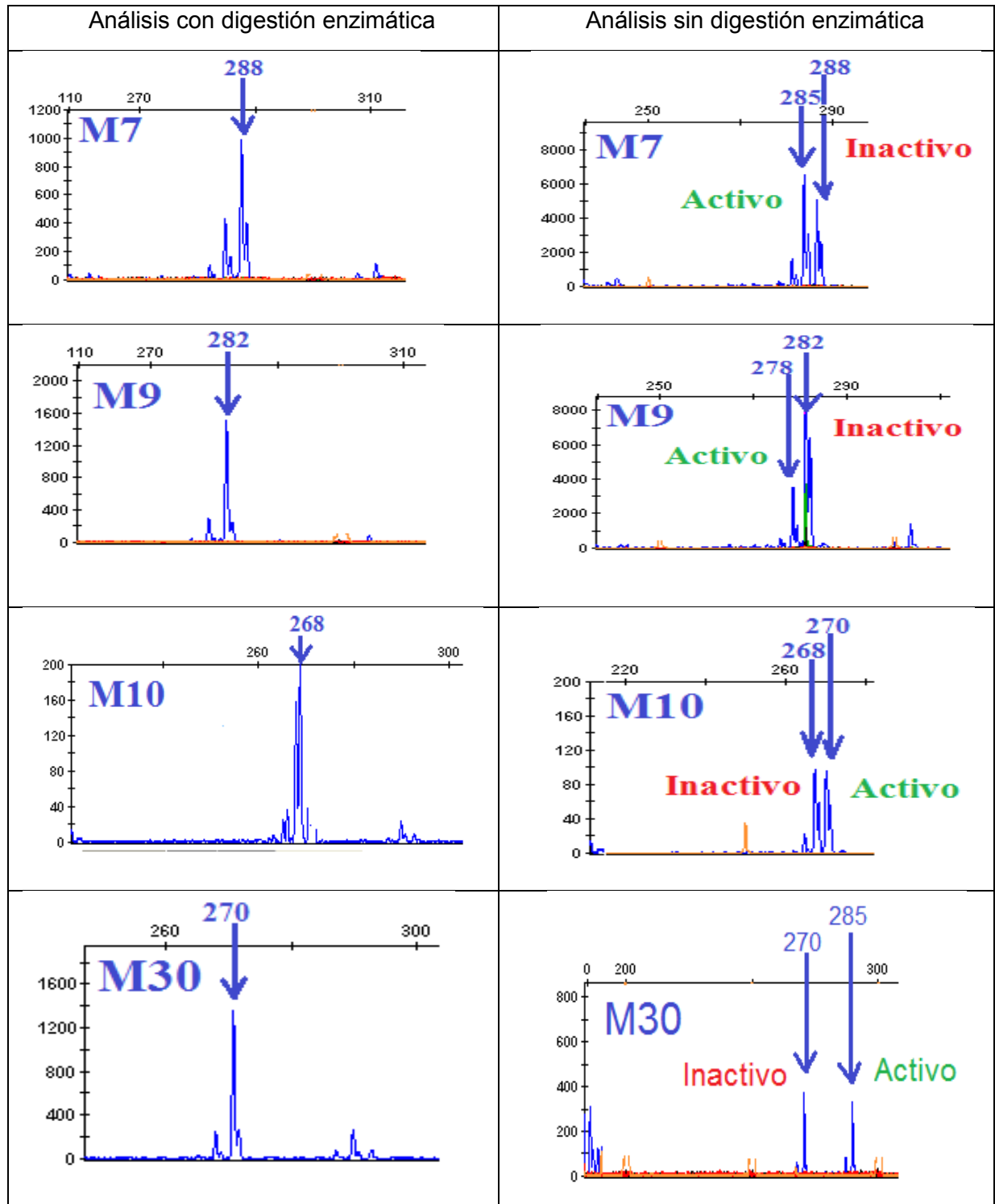
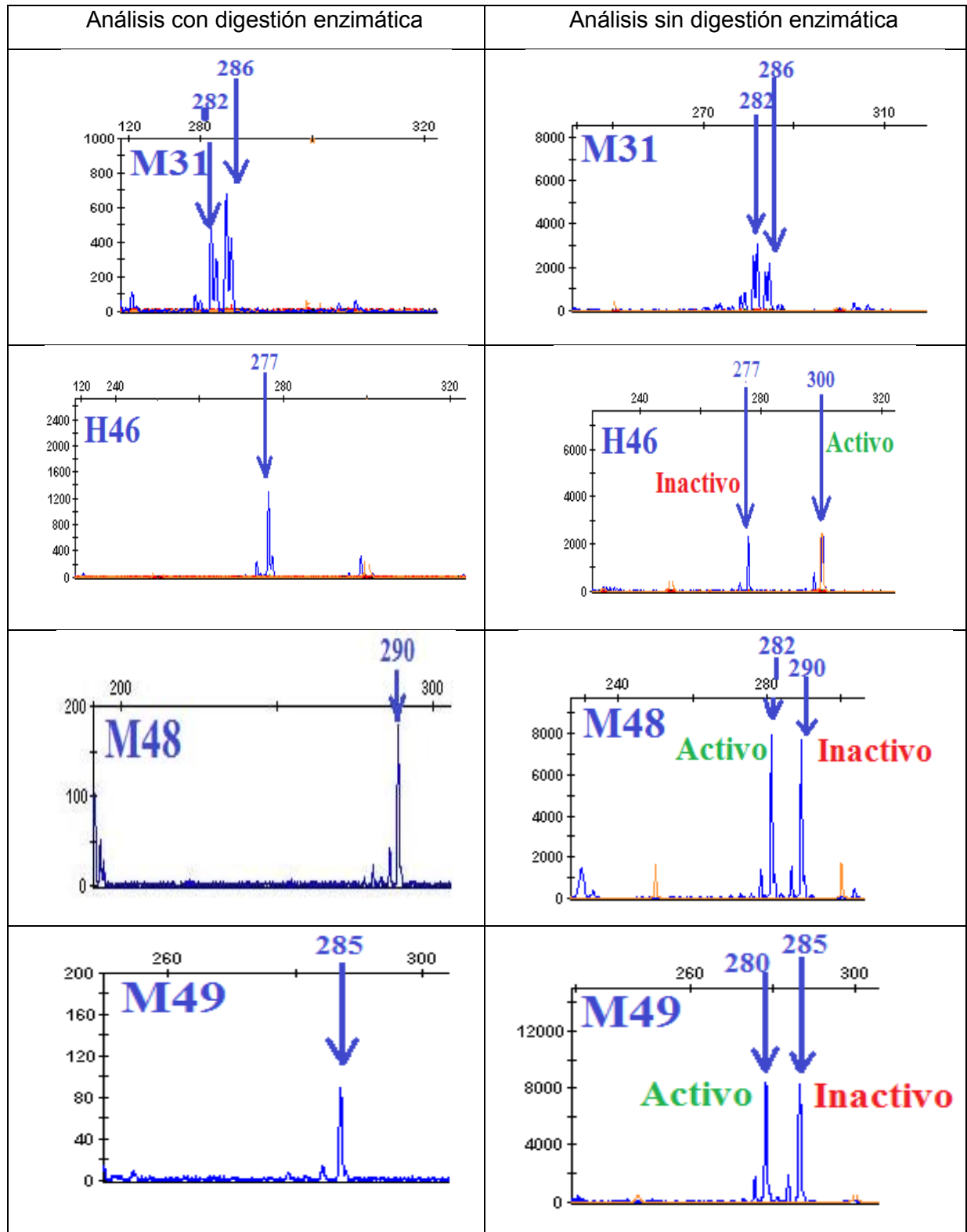
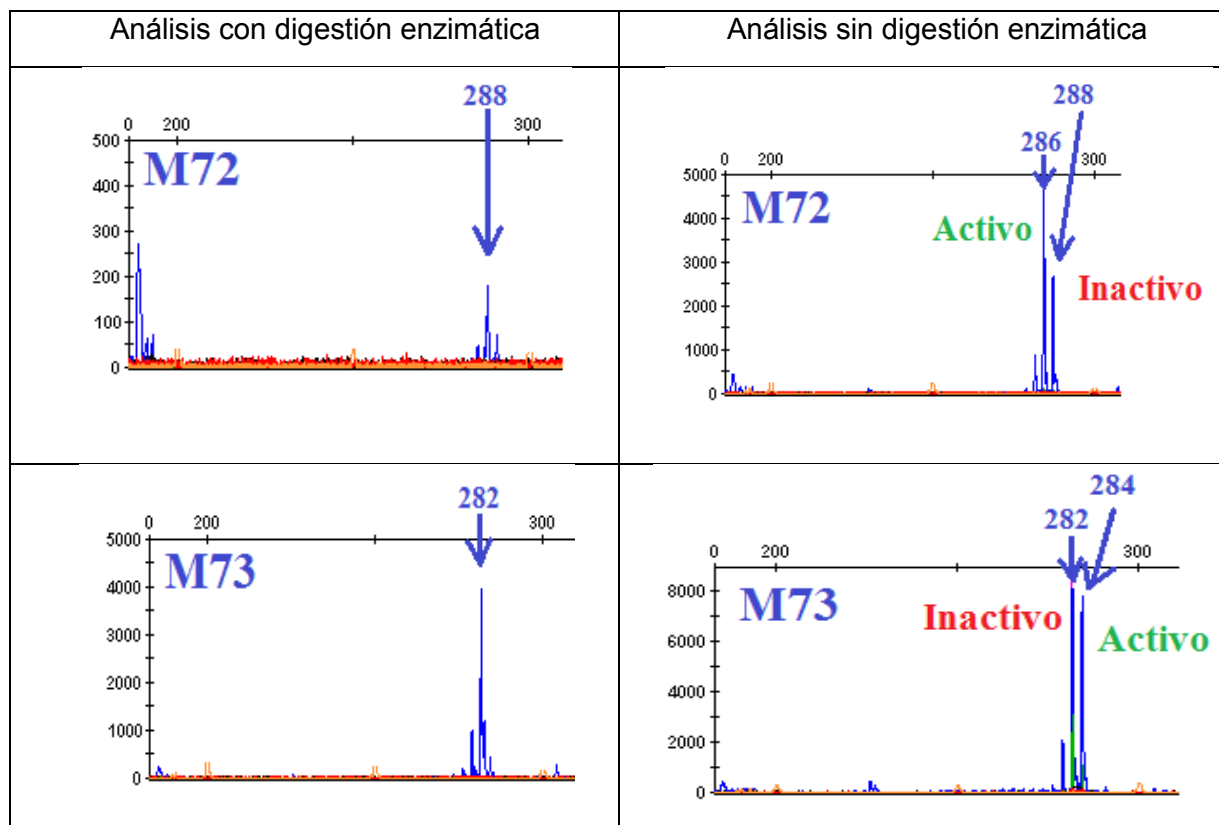


Tabla 7 continuación. Resultados de muestras de DNA digerido enzimáticamente y sin ningún tratamiento previo de mamás, analizado por secuenciador automatizado ABI 310.



H representa Hermana

Tabla 7 continuación. Resultados de muestras de DNA digerido enzimáticamente y sin ningún tratamiento previo de mamás, analizado por secuenciador automatizado ABI 310.

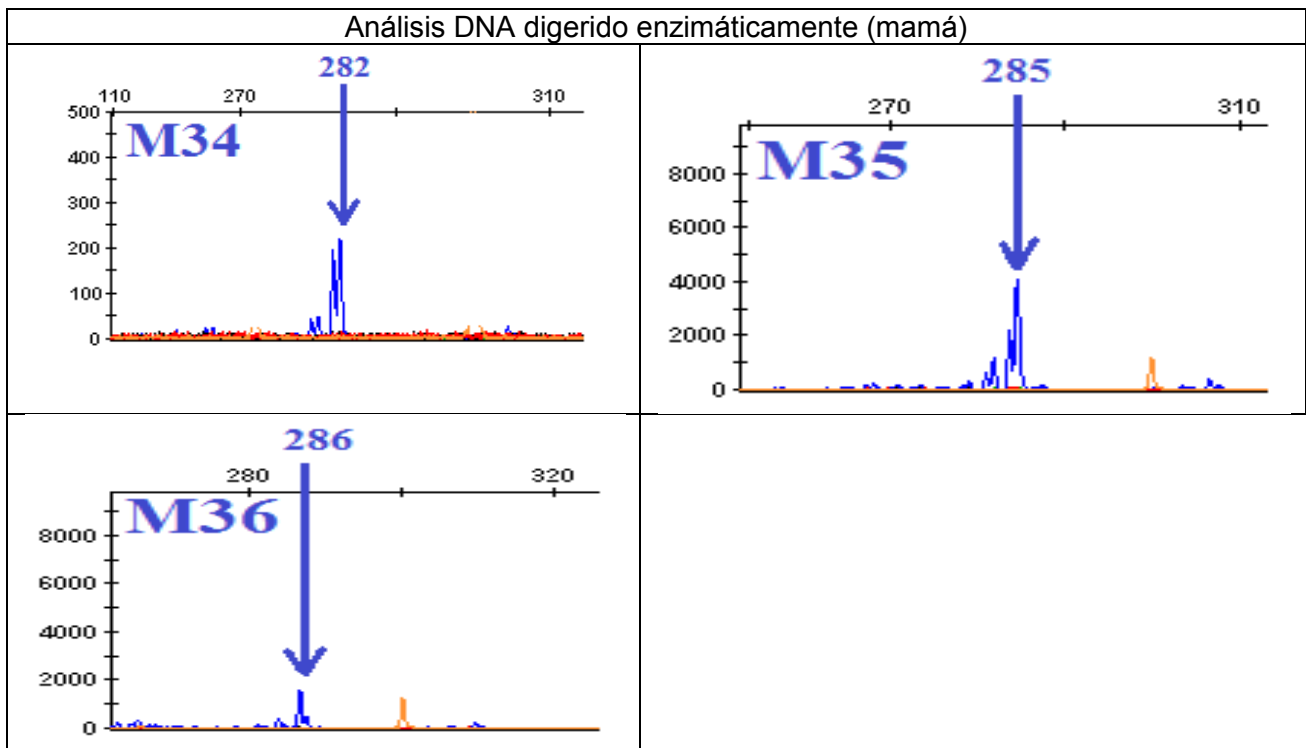


Ensayo HUMARA en líneas de células B inmortalizadas con el virus de Epstein-Bar (EBV)

Un método alternativo para realizar la técnica HUMARA consiste en obtener líneas inmortalizadas de células B utilizando sobrenadantes de cultivos que contengan al virus de EBV. La generación de estas líneas celulares podría reemplazar la purificación de células B por el método de MACS. Por lo que uno de nuestros objetivos consistió en determinar si estas líneas celulares podrían ser utilizadas para determinar el estado de portadora de ALX.

Para este ensayo, se contaba con líneas celulares previamente inmortalizadas con EBV de tres posibles portadoras (M34, M35 y M36), de las cuáles se obtuvo el DNA y se llevo a cabo el ensayo HUMARA para analizarlas, en la tabla 8 se muestran los resultados de las muestras digeridas enzimáticamente después del análisis con el secuenciador automatizado ABI 310 y se observa sólo un pico, que representa al alelo inactivo (metilado).

Tabla 8. Resultados del análisis con secuenciador ABI 310 de las muestras del control positivo y mamás obtenidas de células infectadas con EBV después de la digestión enzimática.



Igual que para las muestras anteriores, las muestras de DNA digeridas fueron utilizadas para amplificar por PCR el gen 18S, los resultados son mostrados en la ilustración 17, en el cual se observan bandas en todas las muestras que representan la amplificación de éste gen y por tanto el buen estado del DNA y veracidad de los resultados.

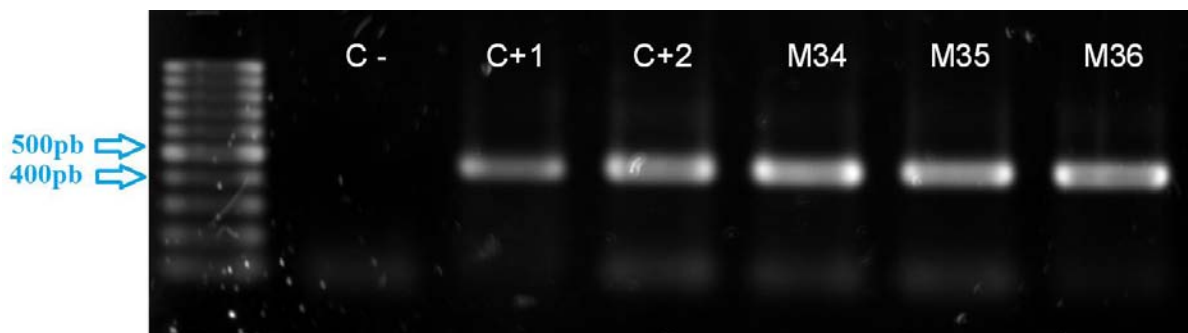
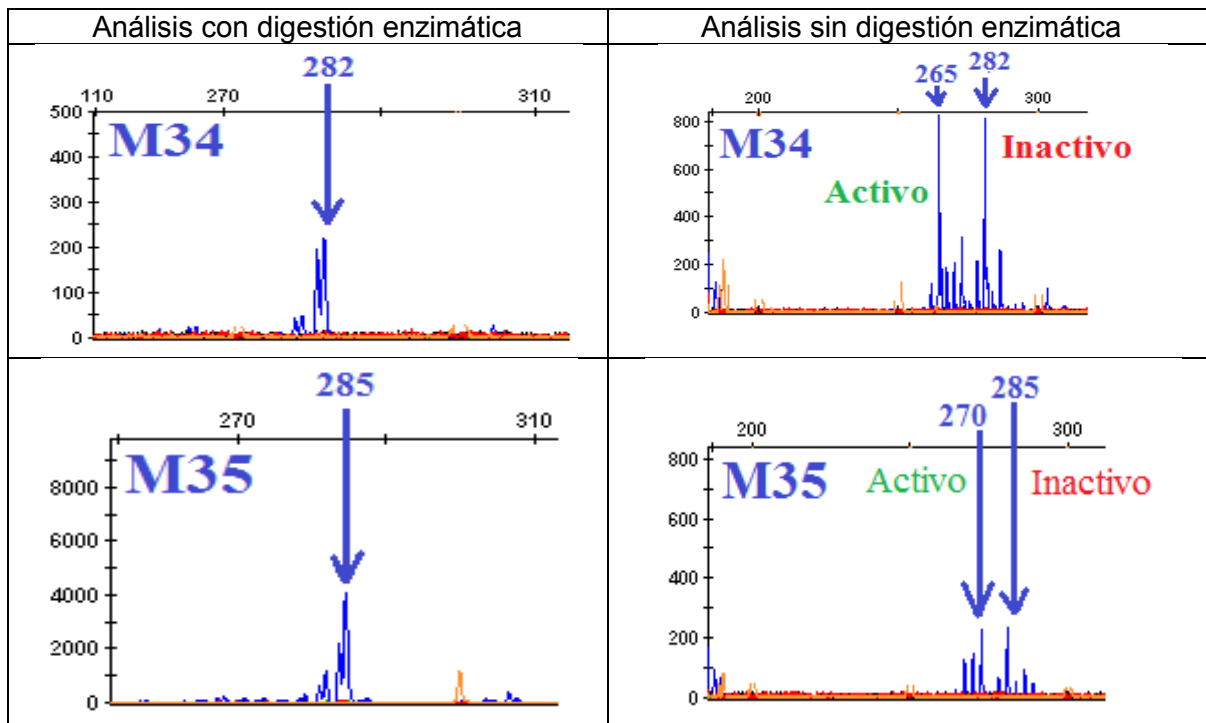


Ilustración 17. Gel de agarosa al 1% de productos de PCR de las muestras de DNA digeridas, obtenido por células infectadas con EBV de mamás con cebadores 18S.

El primer pozo contiene el marcador de peso molecular, el segundo un control negativo (sin DNA), el tercero un control positivo, el cuarto un control positivo diferente, y los demás a las muestras de mamás obtenidas de líneas celulares inmortalizadas con EBV.

De la misma manera con el gDNA obtenido de la línea celular infectada por EBV, se realizó la PCR con cebadores HUMARA para las muestras de las mismas mamás pero sin que fueran sometidas al proceso de digestión enzimática y fueron analizadas en el secuenciador automatizado ABI 310 de la misma manera, como resultado, en la tabla 9, se observan los dos alelos de las mamás representadas por dos picos (materno y paterno respectivamente) y al compararlo con el resultado del análisis de los productos sometidos a digestión enzimática, podemos identificar tanto el alelo activo (no metilado) como el inactivo (metilado), igual que en las muestras obtenidas de la purificación de linfocitos B con el equipo MACS.

Tabla 9. Resultados del análisis con secuenciador automatizado ABI 310 de las muestras de mamás obtenidas de células infectadas por EBV sin ningún tratamiento previo, comparada con las muestras digeridas enzimáticamente.



Confirmación de que los alelos inactivos presentes en las portadoras de ALX corresponden a los alelos activos heredados a pacientes con ALX

Para confirmar la efectividad de la técnica de HUMARA, se procedió a analizar los amplificadores presentes en los pacientes con ALX y compararlos con los obtenidos de las muestras de las posibles portadoras. A continuación se muestran los resultados de las muestras de DNA obtenidas de los linfocitos B de las mamás y que fueron sometidas a digestión enzimática, comparadas con las muestras de sus hijos, es importante mencionar que para las muestras de DNA de los hijos no fueron sometidas a ningún tratamiento previo y sus muestras de DNA provienen de PBMCs. Con esta comparación presentada en la tabla 10, podemos corroborar que efectivamente el alelo materno el cual se encuentra inactivo en la muestra de la mamá, es el alelo que se hereda al hijo y por lo tanto es el observado en el análisis de la muestra del paciente; el paciente al ser varón, sólo tiene un cromosoma X, que se encuentra activo y es el heredado de la mamá. En cada una de las imágenes se observa que el pico amplificado en las mamás, es decir, el alelo inactivo corresponde con el observado en el hijo, es decir, es del mismo tamaño.

Tabla 10. Análisis de las muestras de DNA digerido de mamás y muestras de DNA de hijos sin digestión, por secuenciador automatizado ABI310.

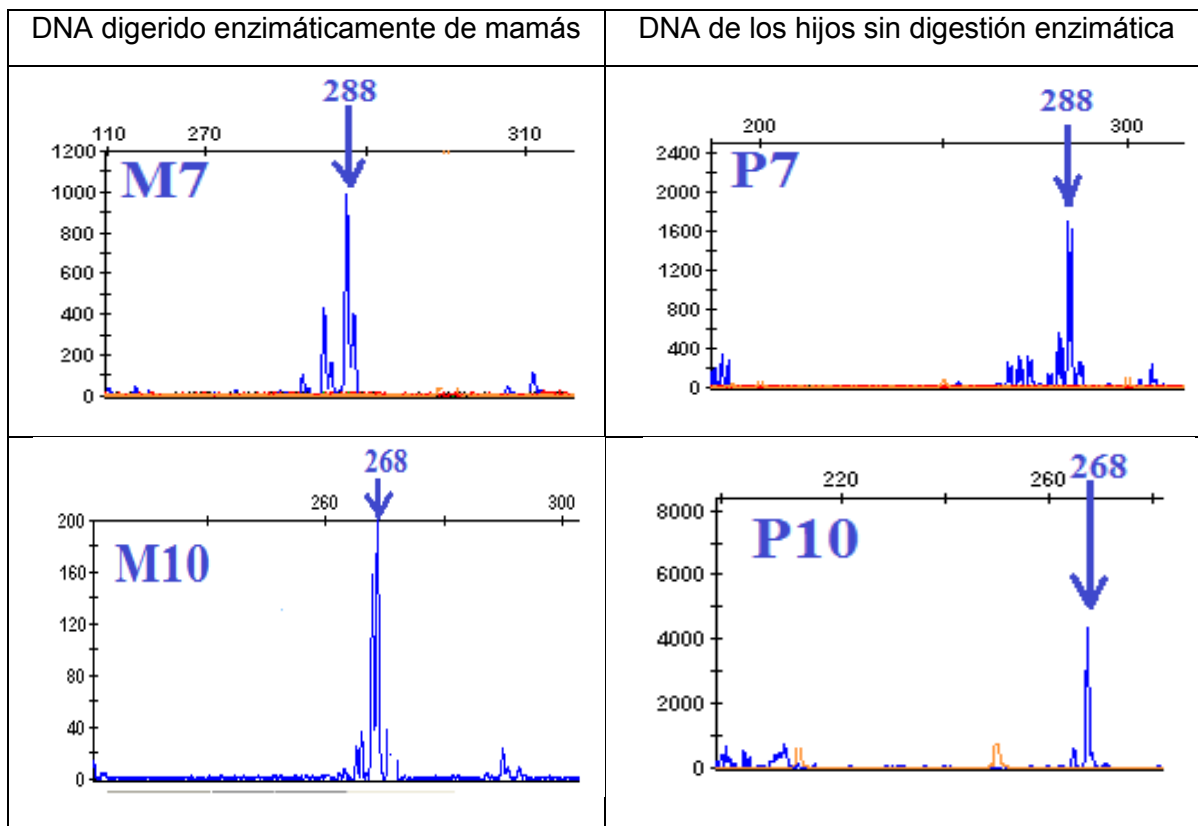


Tabla 10 continuación. Análisis de las muestras de DNA digerido de mamás y muestras de DNA de hijos sin digestión, por secuenciador automatizado ABI310.

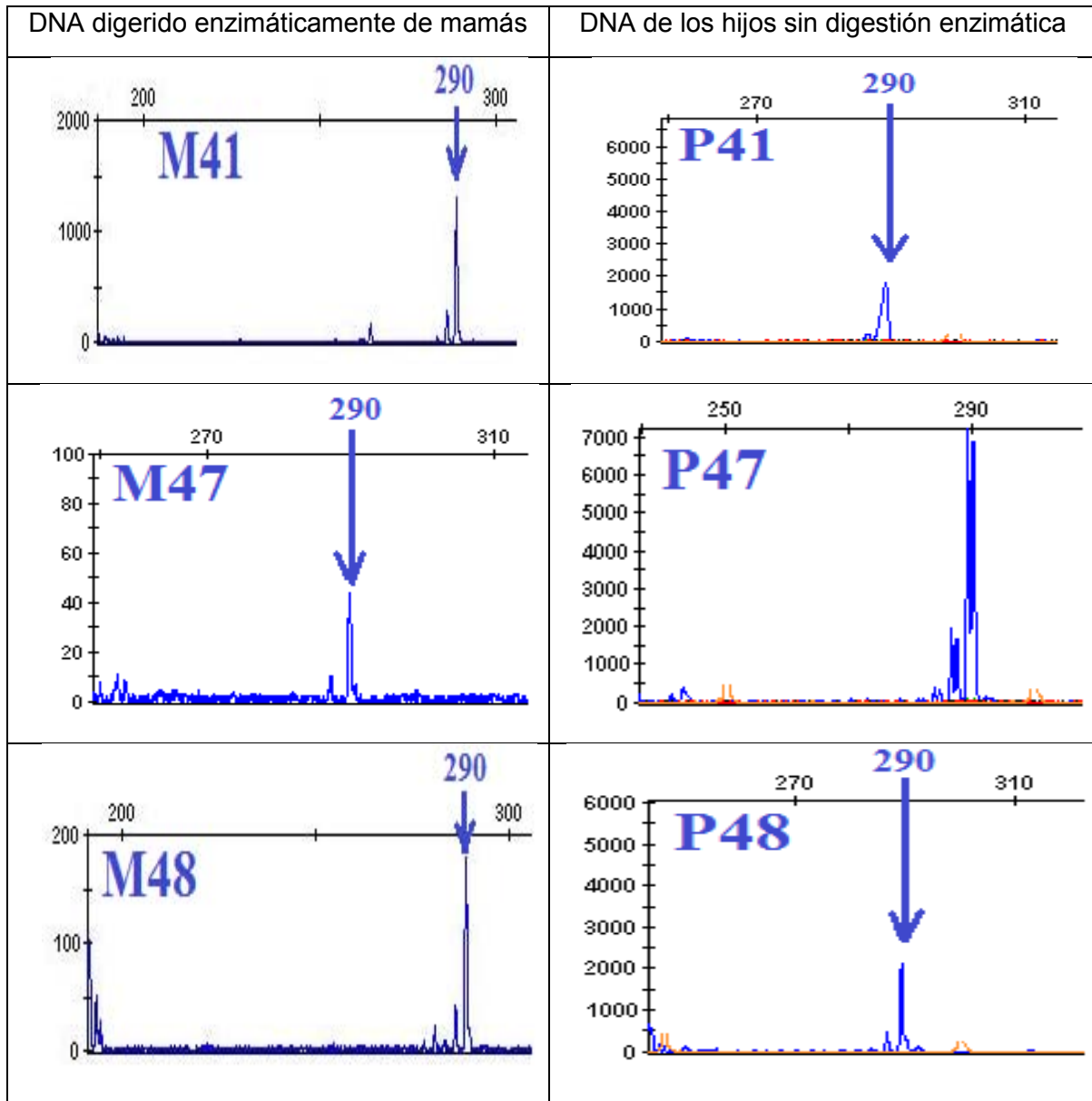
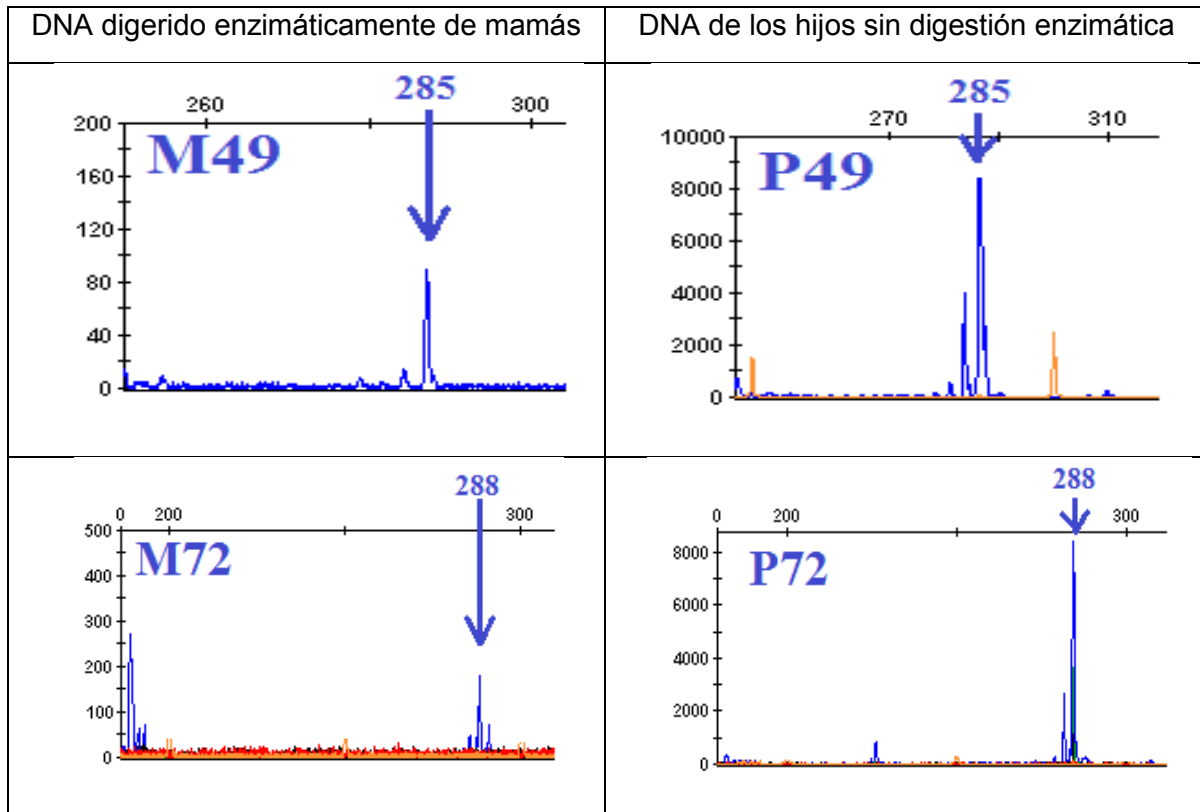
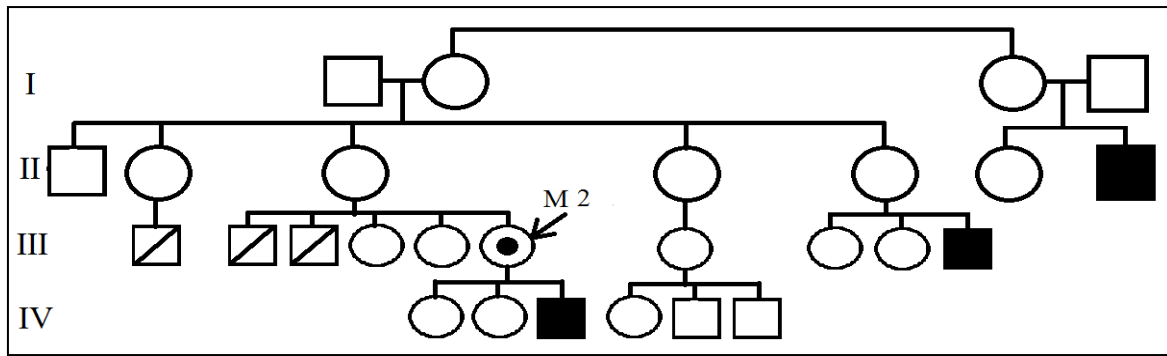


Tabla 10 continuación. Análisis de las muestras de DNA digerido de mamás y muestras de DNA de hijos sin digestión, por secuenciador automatizado ABI310.

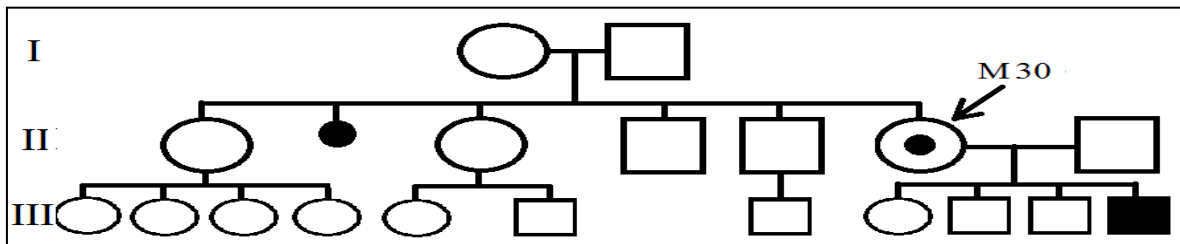


Finalmente, cabe mencionar que en este proyecto, se utilizó un control positivo adicional de una mujer portadora de ALX, como puede observarse en la ilustración 18, la genealogía de la mamá 2 (M2), indica una herencia claramente ligada al cromosoma X, dado que se han identificado tres casos de ALX en esta familia (ilustración 18). Por otra parte, en las ilustraciones 19 y 20 se muestra la genealogía de las mamás 30 y 48 (M30, M48), indicando que sólo se ha identificado un caso de ALX en cada una de sus familias y para quienes, en este trabajo, se identificó que ambas mujeres son portadoras de esta enfermedad (tabla 6).



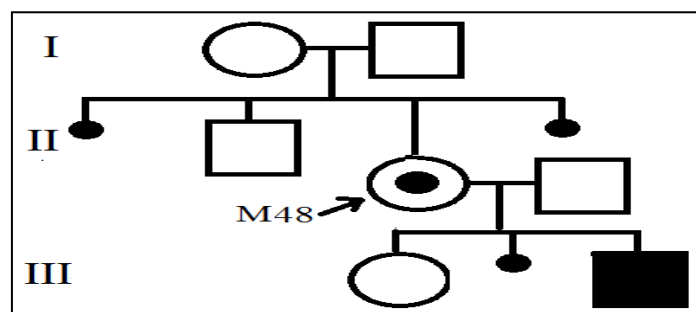
○ Mujer □ Hombre ● Portadora ◻/◻ Fallecido ↓ Aborto ■ Enfermo

Ilustración 18. Genealogía de la mamá 2.



○ Mujer □ Hombre ● Portadora ◻/◻ Fallecido ↓ Aborto ■ Enfermo

Ilustración 19. Genealogía de la mamá 30.



○ Mujer □ Hombre ● Portadora ◻/◻ Fallecido ↓ Aborto ■ Enfermo

Ilustración 20. Genealogía de la mamá 48.

DISCUSIÓN:

El ensayo HUMARA tiene diferentes aplicaciones pero ninguna reportada para la identificación del estado de portadoras de enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X, como en este trabajo presentado.

Para la determinación del estado de portadoras de la ALX, utilizamos el ensayo HUMARA, el cual analizando DNA microsatélite, nos permitió distinguir o identificar el fenómeno de inactivación del cromosoma X, que comprende:

- Digestión enzimática del DNA
- Amplificación por PCR del exón 1 del gen *AR* con cebador marcado con un fluorocromo (5-FAM)
- Análisis de los productos de PCR en secuenciador automatizado

Es importante mencionar que se amplifica este exón porque como ya se mencionó anteriormente, cerca de los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción HhaI utilizada, se encuentran los repetidos CAG del DNA microsatélite y el número de repetidos difiere en cada individuo, además de que el gen *AR* se encuentra en el brazo largo del cromosoma X (Cr. Xq12) y es primordial porque se busca identificar portadoras de enfermedades ligadas al cromosoma X (Autuoro M, Pirnie S, & Carmichael G, 2014).

Gracias a esta característica pudimos utilizar dicha herramienta molecular para diagnosticar el estado de portadoras de ALX, explicado de la siguiente manera:

Una característica importante de la inactivación del cromosoma X es la metilación del DNA el cual indica inactivación (Briggs F. & Reijo Pera, 2014)(DNA metilado estará inactivo y DNA no metilado permanecerá activo); para poder identificar la diferencia de metilación, utilizamos la enzima sensible a metilación HhaI para el proceso de digestión que al ser sensible a metilación, cortará el DNA no metilado, dejando únicamente el DNA metilado. Después al amplificar el exón 1 del gen *AR* por PCR, sólo se amplificará el DNA que no fue digerido por la enzima HhaI, es decir, se amplificará el correspondiente al cromosoma inactivo, teniendo dos posibles resultados después de ser analizados en el secuenciador automatizado ABI310:

- Dos productos de diferente tamaño para mujeres sanas (alelos materno y paterno inactivos).
- Un producto para mujeres portadoras (alelo materno inactivo).

Analizando los resultados obtenidos:

Primeramente para los controles utilizados, sabemos que en varones no hay inactivación del cromosoma X ya que sólo tienen uno y es heredado de la mamá, razón por la cual utilizamos gDNA obtenido de células B de un varón sano donde al no haber inactivación del cromosoma X y ser sometido al ensayo HUMARA, su gDNA es cortado por la enzima sensible a metilación HhaI, haciendo imposible la amplificación por PCR con los cebadores correspondientes para el gen *AR* en el gel de agarosa al 2% (Ilustración 13) y por ello no se observa ningún producto (banda), ni picos después del análisis de fragmentos con el secuenciador automatizado ABI 310 (Ilustración 14), por estas razones, la muestra fue tomada como control negativo.

En mujeres sanas la inactivación del cromosoma X es completamente al azar, es decir, en unas células B se inactivará el cromosoma paterno y en otras el materno (Fearon R, Winkelstein A., Civin I, Pardoli M, & Vogelstein, 1987), después de realizar el ensayo HUMARA en la muestra, se amplificará el exón 1 del gen *AR* del cromosoma X materno inactivo y del cromosoma X paterno inactivo, razón por la cual en mujeres sanas se pueden observar dos picos correspondientes a estos dos alelos; ese es el motivo por el que ésta muestra fue tomada como control positivo (Ilustración 14). Y como se mencionó anteriormente los fragmentos amplificados están en el intervalo de tamaño de 260 – 300 pb y varía en cada individuo. Una de las ventajas de utilizar el secuenciador automatizado ABI310 es que nos permite conocer el número exacto o más aproximado de repetidos CAG del exón 1 del gen *AR*.

En el análisis de las 16 mamás posibles portadoras, todas a excepción de una, resultaron portadoras de la enfermedad ALX porque en el resultado del análisis de las muestras de DNA sometidas a digestión enzimática con el secuenciador automatizado, sólo se observa un pico que es el correspondiente al alelo inactivo (metilado) (tabla 5), este alelo es el que porta la mutación y como consecuencia sólo en mujeres portadoras la inactivación ocurre sesgada (lionización), de manera que en todas sus células B maduras, el único alelo que permanecerá activo es el sano. A diferencia de la mamá 31 que después del análisis con el secuenciador automatizado muestra los dos picos correspondientes a los alelos materno y paterno aún después de ser sometidos a la digestión enzimática.

Conjuntamente para validar o asegurar la veracidad de los resultados obtenidos, además de siempre incluir en cada corrida los controles positivo y negativo, se realizaron varios análisis:

- DNA digerido enzimáticamente fue amplificado por PCR con cebadores *18S*.
- DNA sin digestión enzimática, fue amplificado por PCR con cebadores *AR* y comparado con el resultado obtenido del DNA digerido enzimáticamente.
- DNA sin digestión enzimática de pacientes fue amplificado por PCR con cebadores *AR* y comparado con el resultado de sus mamás.

Todas las muestras de DNA sometido a digestión enzimática fueron amplificadas por PCR con los cebadores para el gen *18S* (Ilustraciones 16 y 17) y se observó amplificación en todas ellas, confirmando el buen estado del DNA y pudiéndose tomar como validación de la condición de las muestras y los resultados obtenidos después de realizar el ensayo HUMARA.

Todas las muestras de gDNA (controles y mamás) obtenidas de los linfocitos B que fueron digeridas enzimáticamente, posteriormente fueron amplificadas por PCR con cebadores *18S* y visualizadas en gel de agarosa al 1% (Ilustraciones 9 y 10), esto con la finalidad de comprobar o corroborar el buen estado del gDNA, debido a que en el control negativo después de que los productos de PCR amplificados con cebadores HUMARA se analizaran en el secuenciador automatizado ABI 310 no se observan picos y se podría argumentar que el DNA ya no estaba en buen estado y por eso se observa dicho resultado.

Después se analizaron las muestras de DNA de cada mamá pero sin que fueran sometidas a digestión enzimática, observando los dos picos correspondientes al exón 1 del gen *AR* de los alelos activo (metilado) e inactivo (no metilado), se observan dos picos, ya que al no ser sometidos al proceso de digestión enzimática, el DNA está completo y por lo tanto las secuencias que son reconocidas por los cebadores para dicho exón están intactas en ambos cromosomas.

Además comparando los resultados del análisis del DNA sin ningún tratamiento previo y después de ser digeridos enzimáticamente, nos permite discernir entre el alelo activo y el inactivo de la siguiente manera: observamos que uno de los picos coincide (en tamaño) en las dos figuras (tabla 6) que corresponde al alelo inactivo (mutado y metilado), por lo tanto, el otro pico observado es el alelo activo (sano y no metilado).

De la misma manera se analizaron las muestras de DNA obtenidas de sangre periférica de los hijos de algunas de las mamás analizadas previamente y que resultaron portadoras de ALX; el DNA de éstos niños no fue sometido a digestión enzimática con la finalidad de observar el alelo activo materno heredado, que es el que posee la mutación y éste fragmento coincide en tamaño al alelo materno inactivo; por tanto, éste es el alelo heredado de la mamá y responsable de la enfermedad en el hijo (tabla 8).

Ahora nos enfocaremos a los resultados obtenidos de las líneas celulares inmortalizadas previamente con EBV de las posibles portadoras.

En este caso, los resultados obtenidos no son confiables en las muestras que no tienen tratamiento con la enzima de digestión HhaI, ya que los picos resultantes después del análisis de fragmentos con el secuenciador ABI 310 no se observan bien definidos, se observaron varios picos correspondientes a amplificadores pequeños de los repetidos CAG que pueden ser errores de la enzima Taq polimerasa utilizada en la reacción de PCR (tabla 7) o bien, mutaciones producidas durante la generación y/o propagación *in vitro* de éstas líneas celulares, dificultando la identificación de los alelos activo e inactivo, sin embargo, para el análisis de las muestras digeridas enzimáticamente se puede distinguir un pico correspondiente al alelo inactivo. Esta modalidad para identificar el estado de portadoras no es muy confiable por las siguientes razones, no se distinguen los alelos activo e inactivo de las muestras sin digestión enzimática y para este ensayo no se contaba con control negativo, por lo que los resultados tampoco pueden ser verificados.

Se proporcionó la genealogía de 3 mamás en particular antes presentadas, analizadas a continuación:

En la familia de la mamá número 2, existen tres casos de ALX, por lo que es una portadora obligada y también fue utilizada como un control más en el que se sabía que sólo debía observarse un pico después del análisis de fragmentos con el secuenciador automatizado ABI 310; en este caso es importante y recomendable realizar la prueba en las hijas ya que existe la probabilidad del 50% de que ellas sean portadoras de la enfermedad igual que su mamá y así poder dar el consejo genético (Guízar-Vázquez, 2001)(Ilustración 18).

Por otra parte en las familias de las mamás 30 y 48 no existe otro caso de ALX reportado en la familia, únicamente el de sus hijos, ambas resultaron portadoras de ALX y como en el caso anterior es recomendable hacer la misma prueba para las hijas de éstas mamás porque tienen el 50% de probabilidad de ser portadoras de ALX, también éste ensayo es importante en ambos casos porque al determinar que ambas mamás son portadoras se

descarta una mutación de *novo* en las familias de los varones que padecen la enfermedad (Strachan & Read, 2010)(Ilustraciones 19 y 20).

CONCLUSIONES:

La técnica de HUMARA es una prueba que además de hacer posible la identificación de algunos tipos de cáncer, pruebas de paternidad, en este estudio nos permitió identificar portadoras de enfermedades ligadas al cromosoma X.

En este estudio se ha estandarizado la técnica HUMARA para la posible identificación de portadoras de ALX y hacer posible el consejo genético con el fin de mejorar la calidad de vida de las familias.

En este ensayo pudimos identificar el alelo activo e inactivo de cada mamá, comparando muestras digeridas enzimáticamente y muestras sin tratamiento previo como una forma más de validar los resultados obtenidos además de los controles utilizados.

En algunas mamás pudimos comparar las muestras digeridas enzimáticamente y las muestras de sus hijos sin ningún tratamiento previo, encontrando el mismo alelo en ambas muestras que es el alelo que contiene la mutación y responsable de la ALX; además utilizado como una confirmación más del resultado obtenido.

Comparando los resultados obtenidos del gDNA obtenido del método MACS con el del obtenido de células inmortalizadas con EBV, observamos que el primero es mucho más claro y existen más formas de comprobar y validar los resultados, a diferencia de los resultados obtenidos con las células inmortalizadas con EBV donde no se observan claramente los picos que representan los alelos.

REFERENCIAS:

1. Abbas A, K. (2008). *Celular and Molecular Immunology*. España: McGrawHill.
2. Ahn, J., & Lee, J. (2008). X chromosome: X inactivation. *Nature Education* , 1(1).
3. Aranguren-Méndez, J., Román - Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review. *Arch. Latinoam. Prod. Anim* , 13(1):1-6.
4. Autuoro M, J., Pirnie S, P., & Carmichael G, G. (2014). Noncoding RNAs in Imprinting and X Chromosome Inactivation . *Biomolecules* , 4(1):76-100.
5. Banelli, B., Casciano, I., Gatteschi, B., Levaggi, A., Carli, F., Bighin, C., y otros. (2010). Pathological and Molecular characteristics distinguishing contralateral metastatic from new primary breast cancer. *Annals of Oncology* , 1237-1242.
6. Belmont J, W. (2005). Genetic control of inactivation and processes leading to X-inactivation skewing. *Am J Human Genetic* , 13:635 - 640.
7. Boudewijs, M., Van Dongen, J. J., & Langerak, A. W. (2007). The Human Androgen Receptor X-Chromosome Inactivation Assay for Clonality Diagnostics of Natural Killer Cell Proliferations. *Journal of Molecular Diagnostics* , 337-343.
8. Briggs F., S., & Reijo Pera, R. A. (2014). X Chromosome inactivation: recent advances and a look forward. *Current Opinion in Genetics & Development* , 28: 78-82.
9. Bruton O, C. (1952). Agammaglobulinemia. *Pediatrics* , 9:722-728.
10. Busque, L., Jiguang, Z., DeHart, D., Griffith, B., Willman, C., Carroll, R., y otros. (1994). An expression based clonality assay at the human androgen receptor locus (HUMARA) on chromosome X. *Nucleid Acids Research* , 697-698.
11. Centre for Genetics Resource Book. (2007). Recuperado el 1 de Marzo de 2015, de <http://www.genetics.edu.au>
12. Chaligné, R., & Heard, E. (2014). X-Chromosome inactivation development and cancer. *FEBS Letters* , 2514-2522.
13. Conley, M., Mathias, D., Treadaway, J., Miregishi, Y., & Rohrer, J. (1998). Mutations in Btk in Patients with Presumed X-linked Aggamaglobulinemia. *The American Society of Human Genetics* , 62:1034-1043.
14. Cutler A., R., Huda Y., Z., Moseley B., A., Rosenblatt M., H., & Belmont W., J. (1992). Methylation of Hpall and Hhal Sites Near the Polymorphic CAG Repeat in the Human Androgen-Receptor Gene Correlates with X-Chromosome Inactivation. *The American Society of Human Genetics* , 51:1229-1239.

15. Desiderio, S. (1997). Role of Btk in B cell development and signaling. *Genetic effect on immunity* , 534-540.
16. Fearon R, E., Winkelstein A., J., Civin I, K., Pardoli M, D., & Vogelstein, B. (1987). Carrier detection in linked agammaglobulinemia by analysis of X-chromosome inactivation. *The New England Journal of Medicine* , Vol.316 No.8 427-431.
17. Gamberale, R. (2004). Ontogenia B: el delicado equilibrio entre la diversidad y la autoinmunidad. *Revista Quimica Viva* .
18. Gathmann, B., Grimbacher, B., Beauté, J., Dudoit, Y., Mahlaoui, N., Fischer, A., y otros. (2009). The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2006 - 2008. *Clinical and Experimental Immunology* , 157(Suppl1):3-11.
19. Geier K., J., & Schlissel S., M. (2006). Pre-BCR signals and the control of Ig gene rearrangements. *Seminars in immunology* , 31-39.
20. Guízard-Vázquez, J. (2001). *Genética Clínica: Diagnóstico y manejo de enfermedades hereditarias*. México: El Manual Moderno.
21. <http://esid.org/Working-Parties/Registry/ESID-Database-Statistics>. (s.f.).
22. http://www.biologie.uni-erlangen.de/genetik/resact_winkler-Dateien. (s.f.).
23. Janeway CA Jr, T. P. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science.
24. Khan W, N., Alt F, W., Gerstein R, M., Malynn B, A., I, L., G, R., y otros. (1995). Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* , 3(3):283-299.
25. López-Herrera, G., Vargas-Hernández, A., González-Serrano, M. E., Berrón-Ruiz, L., Rodríguez-Alba, J. C., Espinosa-Rosales, F., y otros. (2013). Bruton's tyrosine kinase—an integral protein. *Journal of Leukocyte Biology* , 243-250.
26. Mattson P, T., M, V., & Smith C, I. (1996). X-linked agammaglobulinemia (XLA): a genetic tyrosine kinase (Btk) disease. *BioEssays* , 18(10):825-834.
27. Menno, C. v. (2006). An Antibody- Deficiency Syndrome Due to Mutations in the CD19 Gene. *New England Medicine* , 354:1901-1912.
28. Moschese, V., Orlandi, P., Di Matteo, G., Chini, L., Carsetti, R., Di Cesare, S., y otros. (2004). Insight into B cell development and differentiation. *ACTA PÆDIATR SUPPL* , 445: 48-51.
29. Mundo-Ayala, J., & Jaloma-Cruz, A. (2008). Evaluación del patrón de inactivación del cromosoma X en portadoras sintomáticas y mujeres con hemofilia. *Gaceta Médica Mexicana* , Vol. 144 No.2.

30. Raif, S. G., Luigi, D. N., Jean-Laurent, C., Chapel, H., Conley, M. E., Fischer, A., y otros. (2007). The International Union of Immunological Societies (IUIS) Primary Immunodeficiency Diseases (PID) Classification Committee. *J Allergy Clinical Immunology* , 120(4):776-794.
31. Roitt M, I. (2008). *Inmunología, fundamentos*. México: Médica Panamericana.
32. Strachan, T., & Read, A. (2010). *Human Molecular Genetics*. New York: Garland Publishing.