



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE DEFECTOS INMUNOLÓGICOS EN PACIENTES CON  
INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA RELACIONADAS CON PRODUCCIÓN O  
RESPUESTA A INTERFERÓN GAMMA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MARTÍNEZ ROBLES LUIS**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SIGIFREDO PEDRAZA SÁNCHEZ**  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN  
**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SADA OVALLE**  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS  
**DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., SEPTIEMBRE, 2016**



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 20 de junio de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS del alumno MARTÍNEZ ROBLES LUIS con número de cuenta 513023761, con la tesis titulada "ESTUDIO DE DEFECTOS INMUNOLÓGICOS EN PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA RELACIONADAS CON PRODUCCIÓN O RESPUESTA A INTERFERÓN GAMMA", realizada bajo la dirección del DR. SIGIFREDO PEDRAZA SÁNCHEZ.

- Presidente: DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ
- Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ
- Secretario: DRA. MARÍA ISABEL SADA OVALLE
- Suplente: DRA. GABRIELA LÓPEZ HERRERA
- Suplente: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 18 de agosto de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS.**

En primer lugar le agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por darme la oportunidad de realizar una maestría para fortalecer mi preparación profesional y con ética en la investigación científica.

A CONACyT por la beca recibida durante mis estudios de maestría (no. de apoyo: 355574) y por el financiamiento para desarrollar este proyecto de investigación (182817) junto con el Fondo de Investigación en Salud y Seguridad Social CONACyT – SS/IMSS/ISSSTE.

A mi comité tutorial:

A la Dra. Martha Legorreta y a la Dra. Isabel Sada, por sus consejos y asesorías como parte de mi comité tutorial.

Al Dr. Sigifredo Pedraza, por darme la oportunidad de ser parte del proyecto junto con su equipo de trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL.**

A Dios, por poner en mi camino a las personas correctas.

A mis padres, por su apoyo incondicional y por confiar siempre en mi.

A mi hermano José Alberto, por su apoyo para que yo siga mis sueños.

A la M. en C. Laura Ventura, por ser una buena amiga además de una excelente maestra, por tu tiempo, paciencia y por todos tus consejos.

A la Dra. Yolanda Gonzales por su invaluable apoyo con la secuenciación, y a la Dra. Teresa Herrera por su apoyo con la BCG.

A Araceli Martínez, Martha Baños, Tere Huerta, José Luis García, Francisco Leal, por apoyarme para seguir adelante a pesar de las adversidades.

A Carlos Núñez, Diego Hernández y Elizabeth Olivares, por sus consejos y apoyo a mis dudas.

A Tere Guerra y Eli, por sus consejos y apoyarme para no darme por vencido.

A Gabriel por su apoyo y orientación con la ilustración.

## **DEDICATORIA.**

A Bertha Robles Garza<sup>†</sup> y Esther<sup>†</sup>, por enseñarme a no rendirme y dar lo mejor de mí hasta el final.

## ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	ii
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN. ....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN. ....	5
2. ANTECEDENTES. ....	7
2.1. Generalidades.....	7
2.2. Inmunodeficiencias Primarias versus Secundarias. ....	7
2.3. Clasificación de las Inmunodeficiencias Primarias.....	8
2.4. La tuberculosis y las infecciones por <i>Mycobacterium spp.</i> ....	8
2. 4. 1. Vacuna Bacilo Calmette-Guérin. ....	11
2. 5. Síndrome de susceptibilidad mendeliana a micobacteriosis. ....	11
2. 5. 1. Genes involucrados en la producción de IFN- $\gamma$ . ....	13
2. 5. 2. Genes involucrados en la respuesta a IFN- $\gamma$ . ....	14
2. 6. Receptor de IFN- $\gamma$ .....	14
2. 7. Mutaciones conocidas en el IFN- $\gamma$ R. ....	17
2. 8. Mutaciones en la señalización con alteraciones en Stat-1. ....	18
3. HIPÓTESIS. ....	21
4. OBJETIVO. ....	22
5. METODOLOGÍA. ....	23
5. 1. Pacientes.....	23
5. 2. Obtención de células mononucleares a partir de muestras de sangre total.....	25
5. 3. Inmortalización de Líneas Celulares de Linfoblastoides transformadas con el Virus de Epstein-Barr (LCL-VEB). ....	25
5. 4. Cuantificación de IL-12p40 mediante ELISA en sandwich.....	26
5. 5. Cuantificación de IL-12p70 mediante ELISA en sandwich.....	27
5. 6. Cuantificación de TNF- $\alpha$ mediante ELISA en sandwich.....	28
5. 7. Cuantificación de IFN- $\gamma$ mediante ELISA en sandwich.....	29
5. 8. Determinación de la expresión del receptor para IL-12 mediante citometría de flujo. ....	30
5. 9. Detección de IFN- $\gamma$ R1 mediante CF en CMN de sangre periférica. ....	30

5. 10. Cinética de fosforilación de Stat-1 en respuesta a IFN- $\gamma$ . .....	30
5. 11. Estimulación con IFN- $\gamma$ para inducir la fosforilación de Stat-1 en LCL-VEB. ....	31
5. 12. Detección de p-Stat-1 (Y701) mediante Citometría de Flujo. ....	31
5. 13. Inhibición de las cinasas que fosforilan Stat-1, con estaurosporina....	31
5. 14. Obtención de extractos citoplásmicos y nucleares de LCL-VEB.....	32
5. 15. Cuantificación de proteínas. ....	32
5. 16. Electroforesis de proteínas. ....	32
5. 17. Transferencia. ....	32
5. 18. Immunobloting para el análisis de la fosforilación de Stat-1.....	33
5. 19. Obtención de DNA genómico a partir de sangre periferica total o células LCL-VEB.....	34
5. 20. Secuenciación de DNA. ....	35
6. RESULTADOS.....	37
7. DISCUSIÓN. ....	57
8. CONCLUSIONES. ....	61
9. PERSPECTIVAS.....	62
10. LITERATURA CITADA.....	63
11. ANEXOS .....	72
11. 1. Materiales.....	72
11. 2. Reactivos. ....	74
11. 3. Preparación de soluciones.....	76
11. 4. Oligonucleótidos para la secuenciación de <i>IFNGR1</i> , <i>IFNGR2</i> Y <i>STAT1</i> . ....	80



## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Participación del eje de IL-12/23 – IFN- $\gamma$ para la eliminación de microorganismos intracelulares.....	13
Figura 2. Activación y desactivación de Stat-1.....	16
Figura 3. Determinación de la producción de IFN- $\gamma$ y la respuesta a IL-12 en muestras de sangre del paciente 1, su madre y donadores. ....	37
Figura 4. Determinación de la producción de IL-12p40 en respuesta a IFN- $\gamma$ en células del paciente y controles sanos.....	38
Figura 5. Fosforilación de Stat-1 en LCL-B EBV estimuladas con 100UI de IFN- $\gamma$ , 1,000UI de IFN- $\gamma$ o 50,000UI de IFN- $\alpha$ .....	39
Figura 6. Determinación de la fosforilación de Stat-1 por <i>Western blot</i> en células LCL-VEB del paciente 1, de la madre del paciente, un sujeto sano y un control negativo.....	40
Figura 7. Expresión de CD119 (IFN $\gamma$ R1) en células CD14+ de tres donadores sanos (negro, naranja y azul), paciente 1 (rojo) y padre del paciente 1 (verde)....	42
Figura 8. La secuenciación del <i>IFNGR1</i> mostró una mutación en el exón 6 en el paciente 1 .....	43
Figura 9. Producción de IFN- $\gamma$ en respuesta a BCG y BCG+IL-12 por células del Paciente 2. ....	44
Figura 10. Expresión de las cadenas $\beta$ 1 y $\beta$ 2 del receptor de IL-12 en células CD3+ estimuladas con PHA.....	45
Figura 11. Respuesta a IFN- $\gamma$ evaluada mediante la producción de IL-12p40 (A) e IL-12p70 (B). ....	46
Figura 12. Evaluación de la funcionalidad del IFN-gR mediante la producción de TNF- $\alpha$ . ....	47
Figura 13. Fosforilación de Stat-1 en CMN estimuladas con 100UI IFN- $\gamma$ , 1,000UI de IFN- $\gamma$ o 50,000UI de IFN- $\alpha$ . ....	49
Figura 14. Fosforilación de Stat-1 en extractos nucleares obtenidos a partir de LCL-VEB de la paciente, su mamá y un control sano.....	50
Figura 15. Cinética de fosforilación de Stat-1 en células LCL-VEB de un control sano y de la paciente en estudio.....	52
Figura 16. Ensayo de inhibición de la fosforilación de Stat-1, con estaurosporina	54
Figura 17. Densitometría de las bandas de pStat-1 en extractos nucleares detectadas por <i>Western blot</i> de la figura 16.....	55
Figura 18. La secuenciación del <i>STAT-1</i> mostró una mutación en el exón 14 en la paciente 2.....	56

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Índices de estimulación para la fosforilación de Stat-1 en células LCL-VEB del Paciente 1, su madre y un control sano, en respuesta a 100UI de IFN- $\gamma$ , 1,000UI de IFN- $\gamma$ y 50,000UI de IFN- $\alpha$ . .....	40
Tabla 2. Índices de estimulación para la fosforilación de Stat-1 en CMN de la Paciente 2, su madre, su padre, hermano y un control sano, en respuesta a IFN- $\gamma$ e IFN- $\alpha$ . .....	50

## ABREVIATURAS.

ATP	Adenosín trifosfato
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CF	Citometro de flujo
CMC	Candidiasis mucocutánea crónica
CMN	Células mononucleares
CPA	Células presentadoras de antígeno
CYBB	Cadena B del citocromo b-245/NADPH oxidasa 2
DC	Células dendríticas ( <i>dendritic cells</i> )
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAF	Factor activador de gamma
GAS	Secuencia activada por gamma
GF	Ganancia de función
HEPES	Ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-etanosulfónico
HCl	Ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
ID	Inmunodeficiencia
IDP	Inmunodeficiencia primaria
IDS	Inmunodeficiencia secundaria
IFN- $\alpha$	Interferón alfa
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IFN- $\gamma$ R1	Cadena 1 del receptor de IFN- $\gamma$
IFN- $\gamma$ R2	Cadena 2 del receptor de IFN- $\gamma$
IL-12	Interleucina 12
IL-12R $\beta$ 1	Cadena $\beta$ 1 del receptor de IL-12
IL-12R $\beta$ 2	Cadena $\beta$ 2 del receptor de IL-12
<i>IRF</i>	Factor regulador de interferón
<i>ISG</i>	Gen estimulado por interferón
IUIS	<i>International Union of Immunological Societies</i>
KCl	Cloruro de potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio monobásico
LCL	Líneas celulares linfoblastoides
M	Molar
MA	Micobacterias ambientales
$\mu$ g/mL	microgramos por cada mililitro
$\mu$ g	microgramos
MSMD	<i>Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases</i>
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N	Normal
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaF	Fluoruro de sodio
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio
NaOH	Hidroxido de sodio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sodio dibásico
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Ortovanadato de sodio
<i>NEMO</i>	Modulador esencial del factor nuclear κB
NP-40	Nonidet P-40
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBA	PBS + SFB + NaN <sub>3</sub>
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PE	Fitoeritrina
PFA	Paraformaldehído
PHA	Fitohemaglutinina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA	Persulfato de amonio
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RPM	Revoluciones por minuto
RPMI	medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
SSF	solución salina fisiológica
SSMIM	Síndrome de susceptibilidad mendeliana a micobacteriosis
Sta	Estaurosporina
STAT-1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
pSTAT-1	STAT-1 fosforilado
Tb	Tuberculosis
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TLR	( <i>Toll Like Receptors</i> ) Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEB	Virus de Epstein-Barr
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WB	<i>Western blot</i>

## RESUMEN.

El MSMD (*Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases*) es un tipo de Inmunodeficiencia primaria que se caracteriza porque los pacientes afectados presentan infecciones recurrentes o persistentes por diferentes microorganismos, principalmente por micobacterias, y es causado por mutaciones en nueve distintos genes que controlan la inmunidad mediada por IFN- $\gamma$ . Las infecciones en esos pacientes son difíciles de curar, a pesar de tratamientos prolongados con antibióticos. Las infecciones provocadas por la vacuna BCG, que se aplica como parte del esquema de vacunación en México a la mayoría de los niños, se deben en la mayoría de los casos por la inmunodeficiencia, del tipo MSMD.

En este trabajo se estudiaron a dos pacientes con infecciones persistentes y recurrentes para su diagnóstico molecular. El primer paciente es masculino de 21 años de edad, presentó reacción adversa a la BCG, a los 2 y 3 años de edad presentó infección micobacteriana, a los 10 años tuvo una infección hepática por *M. bovis*, a los 19 años presentó una infección diseminada por *M. bovis* no BCG e infección por *Candida parapsilosis*; todas ellas fueron tratadas con antimicobacterianos. Los estudios de la respuesta *in vitro* a IFN- $\gamma$  e IL-12 mostraron que las células sanguíneas del paciente no tenían la capacidad de producir IL-12p40 cuando se coestimulaban con BCG+IFN- $\gamma$ , en comparación con controles sanos. Además, se encontró que Stat-1 no se fosforilaba al estimular con IFN- $\gamma$ , en cultivos primarios de células de sangre del paciente o en su línea celular linfoblastoide transformada por el Virus de Epstein-Barr, y se encontró que la cadena 1 del receptor de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R1 o CD119) se sobreexpresaba en monocitos CD14+. La secuenciación del *IFNGR1* mostró la mutación heterocigota 805delT en el exón 6, sólo en el paciente y no en sus padres ni en su hermana, lo que constituye una mutación *de novo*.

El segundo paciente estudiado, es femenino de 7 años de edad, quien ha presentado infecciones persistentes por *C. albicans* en la mucosa oral sin respuesta al tratamiento. Esta paciente presentó una osteomielitis infecciosa en la que se confirmó la presencia de *M. tuberculosis* que se trató con antimicobacterianos. Los estudios de la respuesta *in vitro* a BCG + IL-12 y BCG + IFN- $\gamma$  mostraron que las células sanguíneas de la paciente producían IFN- $\gamma$  normal en respuesta a BCG y BCG + IL-12, mientras que en la coestimulación con BCG + IFN- $\gamma$  produjeron más IL-12p70 en comparación a los controles sanos. Al estimular a su línea celular linfoblastoide transformada con el Virus de Epstein-Barr con IFN- $\gamma$ , Stat-1 se encontró hiperfosforilado y no se desfosforiló con el tiempo, por la acción de las fosfatasas celulares y la hiperfosforilación fue resistente a la inhibición de la fosforilación con estaurosporina. La secuenciación de los genes

para el receptor para IFN- $\gamma$  (*IFNGR1* e *IFNGR2*) resultó normal, pero *STAT1* presentó una mutación en el exón 14; la mutación encontrada se traduce como una sustitución de una treonina por una metionina en la posición 385 de Stat-1 (T385M). La mutación T385M se localiza en el dominio de unión al DNA de Stat-1. El mecanismo hipotético de esta mutación es impedir que la proteína pueda separarse del DNA, por lo tanto permanece en estado fosforilado y activo para la transcripción de genes. A este tipo de mutación se le llama de Ganancia de Función (*GOF*, por sus siglas en inglés). Otras mutaciones *GOF* en Stat-1 conocidas se relacionan con menor producción de IL-17 y susceptibilidad a infecciones por hongos, pero no se habían observado ese tipo de mutaciones relacionadas a infecciones por *Mycobacterium spp*<sup>1</sup>.

Los pacientes con infecciones persistentes o recurrentes por *Mycobacterium spp* o por hongos y con respuesta anormal a la estimulación *in vitro* con IFN- $\gamma$  pueden tener mutaciones en el IFN- $\gamma$ R o en Stat-1, como se evidenció en este trabajo.

## ABSTRACT.

Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases (MSMD) is a rare Primary Immunodeficiency in man and affected individuals are susceptible to persistent or recurrent infections mainly, but not exclusively, by Mycobacteria. MSMD is caused by mutations in nine distinct genes that control IFN- $\gamma$  mediated immune response. Infections in patients with MSMD are persistent in spite of aggressive and long lasting drug treatments. BCG is a vaccine used to prevent some forms of Tuberculosis and it is used in almost all the newborns born alive in Mexico; the infections caused by BCG vaccination in infants are due, probably to Primary Immunodeficiencies in the host, like MSMD.

In this work, two patients with persistent and recurrent infections were studied for immunological and genetic diagnosis. First patient, P1 was a male, 21 years old, who developed BCG post-vaccinal infection at 2 and 3 1/2 year old, cured with anti-mycobacterium drugs Mycobacterial infections relapsed in liver at 10 years old, responding well to pharmacological treatment. At 19 years old, P1 had a disseminated mycobacterial infection (agent identified as non BCG *M. bovis*) and a liver *Candida parapsilosis* infections. Immortal B cell lines from patients, their first line relatives and healthy controls were transformed by infection with Epstein-Barr Virus and the Lymphoblastoid Cell Lines (LCL-EBV) obtained were used throughout the studies. *In vitro* stimulation of blood cells from patient show no production of IL-12p40 in response to BCG + IFN- $\gamma$  compared to healthy controls and Stat-1 was not phosphorylated in response to IFN- $\gamma$ , both in blood fresh monocytes or in LCL-EBV, but they responded well to IFN- $\alpha$ , suggesting a fail at the IFN- $\gamma$  receptor level. CD119 (IFN- $\gamma$ R1) was found overexpressed on CD14+ monocytes from patient, compared to healthy controls. The mutation 805delT was found in *IFNGR1* from patient but not in his mother or father, constituting a *de novo* mutation. To our knowledge, patient is doing well with no infections.

Second patient, P2 is a 7 years old girl, who suffered from recurrent *C. albicans* infections in oral cavity, not responding to anti-fungal drugs. P2 had BCG infection after BCG vaccination at 1 year old. Infection did not respond well to drug treatments; Mycobacterial infection relapsed at 3 years old, producing osteomyelitis in clavicle and *M. tuberculosis* was confirmed in lesions. *In vitro* studies of immune response in patient show normal IFN- $\gamma$  production upon BCG or BCG+IL-12 stimulation of blood cells and normal IL-12 receptor expression, whereas BCG + IFN- $\gamma$  costimulation produced very high levels of IL-12p70 in cells from patient as compared to healthy controls. Stimulation of patient's LCL-EBV or blood mononuclear cells with IFN- $\gamma$  showed Stat-1 hyperphosphorylation as compared to healthy controls; Stat-1 hyperphosphorylation in P2 did not disappear in

time by the effect of intracellular phosphatases and it was resistant to Staurosporin inhibition. Sequencing of *IFNGR1* and *IFNGR2* showed wild type genes in patient, but the mutation T385M in Stat-1 exon XIV was found just in cells from P2 and not in her father, mother, or brother. Mutation T385M produces a change of threonine by methionine in position 385 of Stat-1 and it is located in the DNA-binding domain of Stat-1. The hypothetical mechanism for which this mutation causes Stat-1 hyperphosphorylation is that it enables protein to deattach to DNA, causing a continuous molecular conformation aimed to gene transcription. This kind of mutation is called Gain of function (GOF) mutation. Other GOF mutations in Stat-1 reported in literature have been related to lesser IL-17 production and susceptibility to fungal infections, but not to Mycobacterial infections.

Patients with persistent or recurrent infections by *Mycobacterium spp* or by fungi, with anormal *in vitro* response to IFN- $\gamma$  stimulation can be suspected to have mutations in IFN- $\gamma$ R or in Stat-1, as it was demonstrated in the present work.



## 1. INTRODUCCIÓN.

Las inmunodeficiencias (ID) ocurren por alteraciones o defectos en el sistema inmune y las personas afectadas son más propensas a infecciones por distintos microorganismos<sup>2</sup>. Existen dos tipos de inmunodeficiencias, las primarias también llamadas genéticas y las inmunodeficiencias secundarias, también llamadas adquiridas<sup>2</sup>. Las inmunodeficiencias primarias (IDP) ocurren por defectos específicos en el sistema inmune y se originan por mutaciones en diferentes genes que provocan el funcionamiento incorrecto de proteínas que participan en algún mecanismo de defensa, y hacen a las personas que las padecen, susceptibles a infecciones repetidas (recurrentes) o que difícilmente se curan de manera natural o con fármacos (infecciones persistentes)<sup>2,3</sup>. En la reunión del 2015 de la Unión internacional del comité experto de las sociedades inmunológicas para las inmunodeficiencias primarias, las IDP se clasificaron en nueve grandes grupos, uno de los cuales son los defectos genéticos de fagocitos en número, función o ambos; en este grupo se incluye al Síndrome de susceptibilidad mendeliana a las infecciones micobacterianas (SSMIM, mejor conocido por sus siglas en inglés como MSMD: *Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases*)<sup>4</sup>. El MSMD comprende una serie de inmunodeficiencias raras, y de incidencia total no calculada, en la que las personas afectadas se enferman con más frecuencia de infecciones por BCG (bacilo de Calmette-Guérin, cepa vacunal de *M. bovis*), micobacterias ambientales (MA), *Candida spp* y *Salmonella spp*, aunque también se han observado infecciones por *M. tuberculosis*, otras bacterias intracelulares y otros hongos e infecciones virales<sup>5</sup>.

Se le llama susceptibilidad mendeliana porque, se deben a defectos en un solo gen que se hereda siguiendo las leyes de herencia de Mendel<sup>6</sup>. Además, el MSMD representa uno de los mayores grupos de IDP por la cantidad de genes que incluye. En general, el MSMD se caracterizan por una baja producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) o deficiente señalización relacionada a la respuesta a IFN- $\gamma$ <sup>7</sup>.

En la práctica clínica, los médicos observan a pacientes pediátricos o adultos con infecciones persistentes o recurrentes, con diferentes microorganismos, desde virus hasta protozoarios por lo tanto es necesario identificar el defecto asociado a la IDP para realizar el diagnóstico correcto y proponer tratamientos adecuados. La vacunación con BCG, que se aplica en México a todos los niños recién nacidos para prevenir la tuberculosis, produce infecciones en algunos infantes que pone en peligro sus vidas o causa fatalidades en ciertos casos; esas infecciones por BCG se deben muy probablemente a IDP de los niños vacunados. La condición de los individuos que tienen alguna IDP hace que las infecciones que padecen sean persistentes, a pesar de prolongados

tratamientos farmacológicos, o recurrentes, presentándose o reactivándose varias veces el mismo tipo de infección. En esta tesis se abordó esta situación, se estudiaron a dos pacientes con evidencias clínicas de IDP, quienes tuvieron al inicio de sus vidas, infección posterior a la vacunación por BCG.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1. Generalidades.**

La integridad del sistema inmunitario es esencial para la defensa contra los microorganismos infecciosos y sus productos tóxicos, y por tanto para la supervivencia de todos los sujetos<sup>8,9</sup>. Los defectos de uno o más componentes del sistema inmunitario pueden llevar a trastornos graves y a menudo mortales, que se llaman en conjunto enfermedades por inmunodeficiencias<sup>8,9</sup>. Estas enfermedades se clasifican ampliamente en dos grupos<sup>10</sup>. Las IDP o genéticas son defectos génicos que aumentan la susceptibilidad a las infecciones y que se manifiestan con frecuencias en la lactancia y en la infancia, pero a veces pueden manifestarse en etapas posteriores de la vida<sup>11</sup>. Las inmunodeficiencias secundarias (IDS) o adquiridas no son hereditarias, sino que se presentan como consecuencia de la malnutrición, cáncer diseminado, tratamiento con fármacos inmunosupresores o la infección de las células del sistema inmunitario, como por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), microorganismo etiológico del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA)<sup>12,13</sup>.

### **2.2. Inmunodeficiencias Primarias versus Secundarias.**

Las IDP son enfermedades causadas por defectos genéticos (mutaciones) que afectan el desarrollo del sistema inmune y su funcionamiento, mantenimiento y regulación<sup>13</sup>. El resultado, son múltiples fenotipos clínicos que corresponden a susceptibilidad elevada a las infecciones<sup>5</sup>. Algunos de estos defectos también aumentan la susceptibilidad a ciertas formas de cáncer como resultado de infecciones crónicas por microorganismos con potencial oncogénico<sup>14</sup>. La naturaleza del defecto genético puede ser autosómico recesivo, autosómico dominante o ligado al cromosoma X<sup>4</sup>.

Se estima que más de mil genes en el genoma humano participan directamente en las respuestas inmunes y que al mutar, podrían resultar en un fenotipo de IDP<sup>15,16</sup>. El comité de expertos en IDP de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS, por sus siglas en inglés) ha establecido en su clasificación del 2015, más de 230 defectos genéticos en humanos correspondientes a IDP<sup>4</sup>.

La frecuencia de las IDP se estima en 1 de cada 2,000 individuos nacidos vivos y su prevalencia en 1 en cada 5,000 individuos en la población general<sup>3,14,17</sup>. Más del 80% de las IDP se diagnostican antes de los 5 años de edad y son más comunes en niños que en niñas (5:1) ligados al cromosoma X, esto debido a la existencia de síndromes<sup>3,18</sup>.

Existen muchos factores intrínsecos y extrínsecos que pueden afectar negativamente el desarrollo de la respuesta inmune, lo que conduce a estados de IDS que incrementan el riesgo de padecer infecciones con mayor frecuencia y gravedad que lo observado en sujetos inmunocompetentes<sup>19,20</sup>. Diversas condiciones heterogéneas que van desde la malnutrición, los tratamientos con glucocorticoides e inmunomoduladores, el trauma y las cirugías, hasta las enfermedades metabólicas, el cáncer y las infecciones crónicas pueden originar una IDS<sup>19</sup>.

La causa más frecuente de IDS es la malnutrición, sin embargo, la frecuencia de las diferentes IDS varía según la presencia de múltiples factores, como las condiciones raciales y geográficas<sup>10,21</sup>. Por ejemplo, en países en desarrollo las IDS son más frecuentes que en los del primer mundo; esto se debe a la alta prevalencia de enfermedades como la malnutrición proteico-calórica, las carencias de vitaminas, y las enfermedades infecciosas<sup>21,22</sup>. En los países desarrollados, las causas más frecuentes de IDS son las enfermedades metabólicas, los tumores, las enfermedades infecciosas y diversos tratamientos farmacológicos (drogas citotóxicas y glucocorticoides, principalmente)<sup>19</sup>.

En general, el tratamiento para las IDS va dirigido a corregir el trastorno original que causa la inmunodeficiencia; sin embargo, en ocasiones esto no es posible y el riesgo de infecciones se puede reducir por medio de la vacunación, la terapia inmunológica y la profilaxis con antibióticos<sup>19,22</sup>.

### **2.3. Clasificación de las Inmunodeficiencias Primarias.**

Las IDP se clasifican fundamentalmente con base en el componente de la inmunidad afectado y para esto la IUIS (*International Union of Immunological Societies*) estableció en 2015 nueve grupos que incluyen: i) ID combinadas, ii) ID combinadas con características de síndromes bien definidos, iii) deficiencias predominantemente de anticuerpos, iv) ID por desregulación inmune, v) ID por defectos en el número o función de fagocitos, o ambos, vi) defectos en la inmunidad innata, vii) desórdenes autoinflamatorios, viii) defectos en el complemento, y ix) fenocopias de ID<sup>4</sup>.

### **2.4. La tuberculosis y las infecciones por *Mycobacterium spp.***

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, una bacteria que casi siempre afecta a los pulmones<sup>23</sup>. *Mtb* es un microorganismo facultativo intracelular, de lento crecimiento, cubierto de una capa cerosa compuesta por una mezcla de lípidos y polisacáridos, entre los que sobresalen varias lipoproteínas, glucoproteínas, lipomanán, lipoarabinomanán y con un alto contenido de ácido micólico, moléculas

que son reconocidas por las células presentadoras de antígeno (CPA) como lo son los macrófagos y las células dendríticas<sup>24,25</sup>.

La Tb se transmite de persona a persona a través del aire; cuando un enfermo de Tb pulmonar tose, estornuda o escupe, expulsa bacilos tuberculosos al aire<sup>26</sup>. Basta con que una persona inhale unos pocos bacilos para quedar infectada<sup>27</sup>. Se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene Tb latente, es decir, están infectadas por el bacilo pero aún no se han enfermado ni pueden transmitir la infección<sup>23</sup>. En 2014, 9.6 millones de personas se enfermaron de Tb y 1,5 millones murieron por esta enfermedad<sup>23</sup>. Se estima que en ese mismo año, un millón de niños se enfermaron de Tb y 140,000 niños murieron a causa de la enfermedad<sup>23</sup>. La Tb se declaró como un problema de salud pública por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1993<sup>28</sup>.

Existen dos manifestaciones clínicas de la Tb en las zonas endémicas: la tuberculosis diseminada, que afecta con mayor frecuencia a niños y la Tb pulmonar que afecta principalmente a adultos<sup>29</sup>. En los niños la Tb a menudo es diseminada debido a la propagación de la micobacteria después de una primera infección pulmonar<sup>29</sup>. En adultos la infección se limita a los pulmones y refleja la reactivación de la Tb latente de una infección primaria<sup>29,30</sup>.

Los macrófagos alveolares son las primeras células que entran en contacto con la micobacteria cuando ingresa a los pulmones (que se encuentra en el aire en microgotas, proveniente de la tos de un paciente con tuberculosis) con ayuda de los receptores tipo Toll (TLR) y por receptores del complemento se reconoce y captura al microorganismo para ser fagocitado<sup>29,30</sup>. A partir de ese momento, el macrófago se activa y sintetiza una gran cantidad de citocinas proinflamatorias y quimiocinas que atraen a otras células como linfocitos y neutrófilos<sup>31</sup>. La micobacteria se internaliza en el fagosoma y posteriormente el fagosoma se fusiona con los lisosomas, formándose el fagolisosoma en donde las bacterias se mueren y sus componentes se degradan, lo que origina péptidos que se presentaran a linfocitos T en un contexto de moléculas MHC clase II<sup>26,32</sup>. Sin embargo, los bacilos tuberculosos tienen la capacidad de vivir y replicarse en el ambiente hostil de los macrófagos, donde la mayoría de los patógenos se eliminan<sup>28</sup>. *Mtb* tiene la capacidad de inhibir la fusión del fagosoma con el lisosoma, en donde *Mtb* retarda la maduración del fagosoma e inhibe el estallido respiratorio y la acidificación del lisosoma<sup>33-36</sup>. Las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) capturan y transportan la micobacteria a los nódulos linfáticos mediastínicos, donde las CPA activan a los linfocitos T<sup>37</sup>. A menudo, en el sitio original de la infección, se forma una estructura multicelular formada por macrófagos infectados, linfocitos, neutrófilos y células epiteliales que confinan o contienen a micobacterias viables pero que permanecen en un estado de latencia

y a ese sitio de infección y estructura multicelular organizada de confinamiento se le llama granuloma<sup>31</sup>. Los linfocitos T CD4+ que se activan en los ganglios linfáticos por las DC, migran al pulmón y además de activar a los macrófagos inducen la formación del granuloma por medio de IFN- $\gamma$ , IL-1 e IL-2<sup>31,38</sup>. El granuloma está conformado por un núcleo central de células epitelioides y macrófagos que rodea linfocitos T CD4+ y en la periferia por linfocitos T CD8+, y por fibroblastos que forman un halo de fibrosis que pueden llegar a calcificarse<sup>39,40</sup>. Dentro del granuloma, *Mtb* modifica la respuesta inmune a través de IL-10, la cual suprime la activación de macrófagos y de linfocitos T<sup>30</sup>. La inmunidad protectora adquirida contra *Mtb* se regula por células T CD4+, con la ayuda de IFN- $\gamma$  e IL-12<sup>31,38,41</sup>.

Algunos individuos pueden enfrentarse a una infección por *Mycobacterium spp* y eliminarla completamente, antes de que se activen los linfocitos T, a esto se le llama eliminación temprana de la infección, existen evidencias de que esto ocurre en algunos casos, pero no se sabe a que se debe esa eliminación temprana de la infección<sup>42</sup>. Sin embargo, las micobacterias contenidas dentro de los granulomas pueden permanecer en estado de latencia durante largo tiempo y reactivarse en algún momento cuando se da alguna baja en el funcionamiento del sistema inmunitario del hospedero, lo que causa infección<sup>43</sup>. La malnutrición, el uso prolongado de corticoesteroides, la diabetes y el VIH/SIDA son condiciones importantes que incrementan drásticamente la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis<sup>30,44</sup>. Las IDP fueron la primera propuesta a nivel molecular que podría reflejar las alteraciones en la inmunidad para el desarrollo de la Tb en niños<sup>45-47</sup>.

Existen otras especies de micobacterias, distintas a *M. tuberculosis* o que no pertenecen al complejo tuberculosis (complejo tuberculosis: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* y *M. bovis* BCG)<sup>43</sup>, como por ejemplo *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. kansasii*, *M. intracellulare*, o *M. avium*, que se pueden encontrar libres en el ambiente e infectar de manera oportunista a personas inmunosuprimidas. En pacientes con IDP, ocurren este tipo de infecciones micobacterianas oportunistas<sup>5</sup>.

El tratamiento de la Tb consiste en un coctel de fármacos antimicobacterianos que se administran por mas de 6 meses. Los fármacos antimicobacterianos principalmente usados son: isoniacida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina<sup>48</sup>. En el caso de pacientes con alguna IDP estos tratamientos a menudo no son efectivos y su duración se debe prolongar por tiempos mucho más largos (algunos pacientes con IDP han recibido tratamientos antimicobacterianos por más de dos años), esto se debe a que su sistema inmune no es capaz de eliminar completamente la infección y el tratamiento farmacológico por sí mismo no es suficiente<sup>49</sup>.

#### **2. 4. 1. Vacuna Bacilo Calmette-Guérin.**

En 1902, Edmond Isidore Etienne Nocard aisló una cepa virulenta de *M. bovis* (parte del complejo tuberculoso) de una vaca con mastitis tuberculosa<sup>50</sup>. En los siguientes 13 años, Albert Calmette y Camille Guérin del instituto Pasteur, inocularon en un medio con esta cepa de *M. bovis* e hicieron subcultivos a partir de este en diferentes tiempos<sup>50,51</sup>. Esa cepa fue llamada bacilo Calmette-Guérin o BCG<sup>50</sup>. Inicialmente se pensaba usar como vacuna para cabras y ganado<sup>52-54</sup>.

Al principio la vacuna BCG fue probada en animales y posteriormente se hizo la primera aplicación en el ser humano en 1921<sup>50</sup>. Inicialmente la BCG se aplicó por vía oral a los niños en los primeros días de vida<sup>30,50</sup>. La OMS recomienda que en los países con alta mortalidad por tuberculosis, se debe administrar una sola dosis de la vacuna BCG a todos los lactantes, como es el caso de México, donde la BCG forma parte de la cartilla de vacunación<sup>55</sup>.

Actualmente, la BCG es la única vacuna antituberculosa disponible que protege a los lactantes y a los niños contra la meningitis tuberculosa y de la tuberculosis diseminada<sup>29,55</sup>. Sin embargo, la vacuna BCG no protege de la primera infección ni previene la reactivación de la tuberculosis latente, que es la principal fuente de propagación de la micobacteria en la población<sup>55</sup>.

La vacunación con BCG tiene una baja frecuencia de eventos adversos tras su administración. Se estima que la incidencia de casos de propagación de la BCG con consecuencias mortales es de 0,19 a 1,56 por millón de vacunados y se piensa que la gran mayoría de esos casos fatales se han producido en personas vacunadas por error, sin tener conocimiento de alguna condición de ID<sup>55</sup>, pero cabe la posibilidad de que en algunos casos no se sabía que los pacientes padecían algún tipo de IDP. Se han observado reacciones locales como ulceración local extensa y linfadenitis, en menos de 1 de cada mil casos y la mayoría de los casos (>99%) de reacciones adversas a la vacunación con BCG se dan en personas con ID<sup>55</sup>.

Aunado a lo anterior, la vacuna BCG está indicada para los lactantes que viven en zonas endémicas de tuberculosis, pero la vacunación con BCG está contraindicada en personas con ID y para pacientes con tratamientos de inmunosupresores<sup>55</sup>.

#### **2. 5. Síndrome de susceptibilidad mendeliana a micobacteriosis.**

El síndrome de susceptibilidad mendeliana a micobacteriosis (*MSMD*, por sus siglas en inglés) es una condición rara, heredable, caracterizada por la susceptibilidad a micobacterias de baja virulencia, como la vacuna BCG y

micobacterias ambientales no tuberculosas<sup>6,47</sup>. Además, los pacientes también son vulnerables a *M. tuberculosis*<sup>56,57</sup>. Las infecciones micobacterianas se presentan principalmente en la niñez, aunque raramente se han observado en la adolescencia o adultez<sup>7,58-60</sup>. Otras infecciones asociadas que se pueden encontrar en los pacientes son: *Salmonella spp*, *Klebsiella spp*, infecciones por hongos (candidiasis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis, coccidioidomicosis), por parásitos (toxoplasmosis) y algunos virus (citomegalovirus, virus de herpes humano 8, virus de parainfluenza tipo 3, virus sincicial respiratorio y virus de varicella zoster)<sup>5,61,62</sup>. Sin embargo, las infecciones que se presentan en los pacientes que tienen inmunodeficiencia del tipo MSMD, tienen en común que dependen de la producción de IFN- $\gamma$  y de la respuesta a esta citocina, esto constituye el llamado eje IL-12/23 – IFN- $\gamma$ <sup>5,7</sup>. El eje IL-12/23 – IFN- $\gamma$  es una comunicación que se establece entre la CPA y el linfocito T o células NK y se inicia con la activación del macrófago por productos bacterianos que inducen la producción de IL-12. Esta IL-12 se secreta y se une a su receptor en el linfocito T/NK. Los macrófagos, además producen IL-23, importante para activar a los linfocitos T/NK, los cuales responden con la producción de IL-17 e IL-22, citocinas esenciales para la activación de los neutrófilos y para combatir infecciones por hongos como *Candida spp*. Las citocinas IL-12 e IL-23 se relacionan porque son miembros de una familia de moléculas por compartir secuencia de aminoácidos y funciones parecidas o relacionadas que comprende a la IL12, IL-23, IL-27 e IL-35<sup>63</sup>. Una vez que la IL-12 activa a los linfocitos T y/o células NK, esas células comienzan a producir IFN- $\gamma$ , uniéndose a su receptor en los macrófagos, induciendo su activación. La producción de IFN- $\gamma$ , es importante para la inmunidad contra micobacterias, *Salmonella spp* y *Nocardia spp*<sup>61,62</sup> (Figura 1).



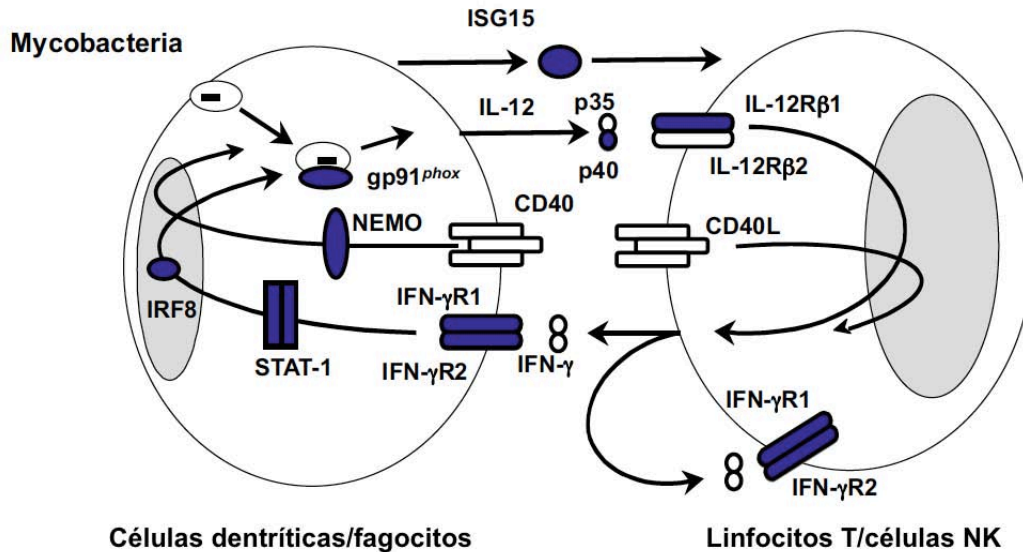


Figura 1. Participación del eje de IL-12/23 – IFN- $\gamma$  para la eliminación de microorganismos intracelulares. Las células fagocíticas y las células presentadoras de antígeno (CPA) interactúan con los linfocitos T y linfocitos NK a través del eje IFN- $\gamma$  – IL-12, como respuesta a microorganismos intracelulares. En el esquema se muestran los productos de los nueve genes causantes de MSMD involucrados en la inmunidad mediada por IFN- $\gamma$ . En azul se indican las proteínas codificadas por los genes identificados y asociados con MSMD. Las mutaciones en *IL12B*, *IL12RB1*, *IRF8*, *ISG15*, *NEMO* impiden la producción adecuada de IFN- $\gamma$ . Las mutaciones en *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IRF8*, *CYBB* dañan la respuesta a IFN- $\gamma$ . Tomado y adaptado de Bustamente *et al*, 2014<sup>5</sup>.

Las mutaciones causantes de MSMD se han encontrado en siete genes autosómicos (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IL12B*, *IL12RB1*, *IRF8* e *ISG15*) y dos ligados al cromosoma X (*NEMO* y *CYBB*). Los productos de los nueve genes causantes de MSMD están involucrados en la inmunidad mediada por IFN- $\gamma$  y controlan la producción (*IL12B*, *IL12RB1*, *IRF8*, *ISG15*, *NEMO*) o la respuesta a IFN- $\gamma$  (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IRF8*, *CYBB*)<sup>5,7,62</sup>.

### 2. 5. 1. Genes involucrados en la producción de IFN- $\gamma$ .

Los genes dentro del circuito de IL-12-IFN- $\gamma$  que participan en la producción de IFN- $\gamma$  son: *IL12B*, que codifica para la subunidad p40, común en IL-12 e IL-23; *IL12RB1*, que codifica para la cadena  $\beta 1$  común en los receptores de IL-12 e IL-23; *IRF8*, un factor de transcripción inducible por IFN- $\gamma$ , de la familia IRF; e *ISG15*, una molécula que induce la producción de IFN- $\alpha/\beta$ ; *NEMO*, que codifica para el modulador esencial del factor nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), que regula la señalización de la vía de NF- $\kappa B$ <sup>5,7,64-68</sup>.

### 2. 5. 2. Genes involucrados en la respuesta a IFN- $\gamma$ .

En el contexto del circuito de IL-12-IFN- $\gamma$ , los genes involucrados en la respuesta a IFN- $\gamma$  son los siguientes: *IFNGR1*, que codifica para la cadena 1 del IFN- $\gamma$ R; *IFNGR2*, que codifica para la cadena 2 del IFN- $\gamma$ R; *STAT1* que codifica para el factor activador de transcripción y transductor de señal 1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*, por sus siglas en inglés Stat-1); *IRF8*, que codifica para un factor de transcripción inducible por IFN- $\gamma$ , de la familia IRF; y *CYBB*, que codifica a gp91<sup>phox</sup>, un componente del complejo de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa<sup>5,7,62,67,69-71</sup>. En todos y cada uno de esos genes mencionados, se han encontrado diferentes mutaciones que producen fallas en la respuesta a IFN- $\gamma$  y susceptibilidad a distintas infecciones<sup>5</sup>.

### 2. 6. Receptor de IFN- $\gamma$ .

Existen tres tipos distintos de familias de interferones en el humano<sup>72</sup>. La familia de IFN tipo I son IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\kappa$  e IFN- $\epsilon$ <sup>73,74</sup>. La familia de IFN tipo II consiste únicamente en IFN- $\gamma$ , también conocido como IFN inmune producido por linfocitos T y células NK<sup>75</sup>. La familia de IFN tipo III la forma IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 e IFN- $\lambda$ 3 (también conocidos como IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente) y recientemente se ha identificado a IFN- $\lambda$ 4<sup>76,77</sup>, el cual tiene funciones similares a citocinas de la familia de IFN tipo I pero su receptor se limita a células epiteliales<sup>78</sup>.

El IFN- $\gamma$  es el único miembro de la familia de interferones del tipo II; el gen de IFN- $\gamma$  se localiza en el cromosoma 12 en el humano<sup>79</sup>, al contrario de los genes para IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  que no tienen intrones, el gen para el IFN- $\gamma$  cuenta con tres intrones<sup>80</sup>. La proteína humana del IFN- $\gamma$  está formada por 166 aminoácidos que incluye una secuencia hidrofóbica de 23 residuos de aminoácidos<sup>81</sup>, el homodímero está unido de forma no covalente por dos sitios de glicosilación, este homodímero representa la forma activa de la proteína<sup>81,82</sup>. Diferentes poblaciones celulares desde el sistema inmune innato (por ejemplo: células NK, células NKT, macrófagos y monocitos) y el adaptativo (por ejemplo: células Th1, linfocitos T citotóxicos y linfocitos B) pueden secretar IFN- $\gamma$ ; su síntesis se regula por las citocinas IL-12 e IL-18 secretadas por las CPA<sup>75</sup>.

El IFN- $\gamma$  tiene múltiples actividades en la respuesta inmune: i) favorece el desarrollo de células Th1 sobre Th2, ii) activa a los macrófagos para la destrucción de microorganismos intracelulares mediante el estallido respiratorio e induce a una

mayor expresión de HLA-I/II en DC, así como la producción de IL-12, y iii) favorece el cambio de isotipo de anticuerpos en los linfocitos B<sup>83</sup>.

El IFN- $\gamma$ R está constituido por dos cadenas 1/ $\alpha$  (IFN- $\gamma$ R1/IFN- $\gamma$ R $\alpha$ ) de unión al ligando, codificadas en el cromosoma 6 en el humano, y dos cadenas 2/ $\beta$  (IFN- $\gamma$ R2/IFN- $\gamma$ R $\beta$ ) de transducción de señal, que son codificadas en el cromosoma 21 en el humano<sup>84</sup>. Ambos tipos de cadenas pertenecen a la familia de receptores de citocinas de clase II, IFN- $\gamma$ R2 es la responsable de la respuesta de IFN- $\gamma$ , porque aparentemente la cadena IFN- $\gamma$ R1 se expresa constitutivamente<sup>84,85</sup>. Cuando el IFN- $\gamma$  se une a IFN- $\gamma$ R, Jak1 que es una cinasa que se localiza intracelularmente se une a la cadena IFN- $\gamma$ R1, mientras que la cadena IFN- $\gamma$ R2 se une a la cinasa Jak2<sup>85</sup>. Las cinasas Jak1 y Jak2 se fosforilan entre sí y a su vez fosforilan a Stat-1<sup>86</sup>. La señalización de IFN- $\gamma$  lleva a la activación de la molécula de Stat-1, su translocación como homodímero desde el citoplasma hacia el núcleo para la unión a su sitio de activación en el DNA para la transcripción (Figura 2)<sup>85,86</sup>.

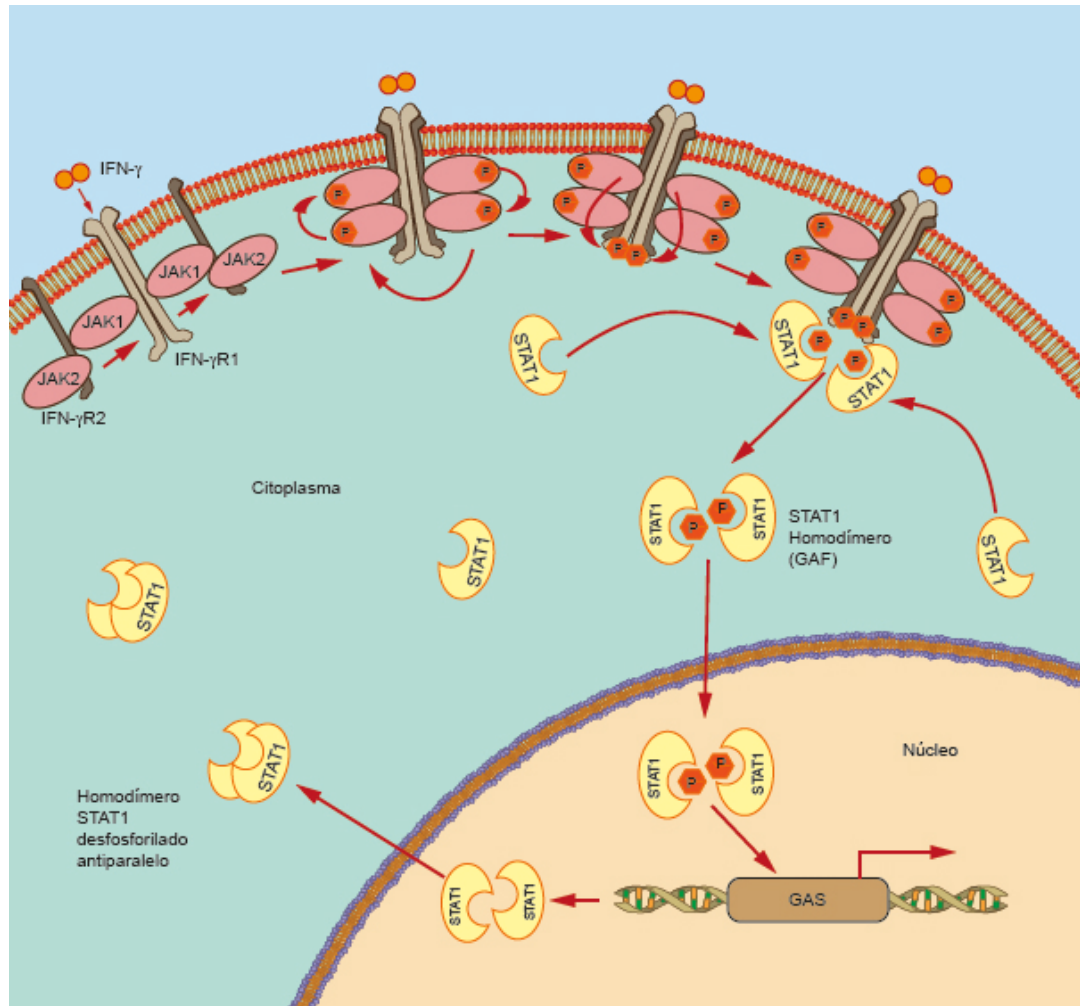


Figura 2. Activación y desactivación de Stat-1. La activación del Stat-1 ocurre cuando IFN- $\gamma$  en su forma activa de dímero se une al IFN- $\gamma$ R formado por un dímero de IFN- $\gamma$ R1 mas un dímero de IFN- $\gamma$ R2, posteriormente se reclutan las cinasas Jak1 y Jak2, las cuales se unen al receptor para iniciar una serie de reacciones enzimáticas en las cuales transfieren un grupo fosfato obtenido a partir del adenosín trifosfato (ATP). Después el grupo fosfato se transfiere al IFN- $\gamma$ R1 en dónde se recluta a Stat-1 para fosforilarse y dar lugar a su forma activa de homodímero conocido como Factor Activador de Gamma (GAF), el cual se transloca al núcleo para unirse a la Secuencia Activada por Gamma (GAS) e iniciar la transcripción de genes. Una vez finalizada la transcripción de los genes blanco por GAF, que es desfosforilado por las fosfatasas de núcleo en donde adquiere una forma antiparalela para poder salir de núcleo y en citoplasma desintegrar el homodímero para que la proteína pueda utilizarse de nuevo<sup>85,86</sup>.

La producción de IFN- $\gamma$  y la respuesta a esta citocina es fundamental, ya que participa en el control de infecciones por *Mycobacterium spp*, *Salmonella spp*, *Klebsiella spp* y *Candida spp*<sup>5,61,62</sup>.

## 2. 7. Mutaciones conocidas en el IFN- $\gamma$ R.

En 1996, se publicaron los primeros casos sobre la etiología genética de MSMD, en unos pacientes con infecciones recurrentes o persistentes por BCG, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* y salmonelosis, en donde se identificó una mutación en *IFNGR1*, el cual codifica para la cadena 1/ $\alpha$  del IFN- $\gamma$ R, causa que los monocitos y macrófagos de esos pacientes no respondieran a la activación normal inducida por IFN- $\gamma$ <sup>70,71</sup>.

Se han descrito dos formas génicas de la deficiencia recesiva de IFN- $\gamma$ R1, con o sin expresión del receptor en la superficie<sup>87-92</sup>. El fenotipo celular de las deficiencias recesivas en IFN- $\gamma$ R1 se caracterizan por la falta de respuesta a IFN- $\gamma$  *in vitro*, en términos de producción de IL-12p40 y una baja capacidad de unión de Stat-1 a la secuencia activada por gamma (GAS, por sus siglas en inglés) en leucocitos de los pacientes<sup>70,88,91,93,94</sup>. El fenotipo clínico de estos pacientes se caracteriza por infecciones diseminadas por BCG o MA (por ejemplo: *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. mageritense*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum*)<sup>88,95-97</sup>. También se han identificado pacientes con infecciones por *M. tuberculosis* que murieron de la infección diseminada a pesar del tratamiento<sup>88,98</sup>. Las infecciones se presentan en la infancia antes de los tres años de edad<sup>88</sup>. Otras infecciones que presentan los pacientes son causadas por virus (CMV, HHV8, RSV, PRV-3 y VSV) y bacterias (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*)<sup>70,87-89,98-100</sup>. No obstante que ambas formas recesivas sean similares *in vitro* y clínicamente, los pacientes con el fenotipo recesivo sin expresión de IFN- $\gamma$ R1 presentan infecciones mas agresivas<sup>5,88</sup>.

La forma autosómica dominante de la deficiencia de IFN- $\gamma$ R1 se describió por primera vez en 1999<sup>101</sup>. Grandes cantidades de IFN- $\gamma$ R1 se detectan en la superficie celular debido a la acumulación de IFN- $\gamma$ R1 truncados que carecen del dominio intracelular<sup>101</sup>. La acumulación de IFN- $\gamma$ R1 no funcionales que carecen de los sitios de unión y señalización para Jak1 y Stat-1, impiden la función de los dímeros de IFN- $\gamma$ R1 a pesar de la presencia de receptores codificados por el alelo normal de *IFNGR1*<sup>88,101</sup>. Todas las mutaciones confieren un fenotipo de respuesta celular similar que se caracteriza por una respuesta débil a IFN- $\gamma$  *in vitro*<sup>88,101</sup>. Las características clínicas de los pacientes son menos agresivas que aquellos con deficiencia autosómica recesiva en IFN- $\gamma$ R1<sup>5,88</sup>. Los pacientes son susceptibles a la vacuna BCG y a MA (*M. abcessus*, *M. avium*, *M. asiaticum*, *M. bohemicum*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. kansaii*, *M. scrofulaceum*), también se han reportado pacientes con una baja prevalencia de infecciones por *Salmonella spp*, *Coccidioides spp*, *Histoplasma capsulatum* y *M. tuberculosis*<sup>5,88,102-106</sup>. En el 72% de los pacientes, la infección afecta a los huesos y en algunos pacientes incluso

se desarrolla osteomielitis sin involucrar a los organos<sup>92,102,105-113</sup>. En la mayoría de los casos, las infecciones micobacterianas se controlan muy bien con tratamiento prolongado de antibióticos, con o sin administración de IFN- $\gamma$  recombinante, dependiendo si la mutación es homocigota o heterocigota<sup>49,114,115</sup>.

Además, se han reportado mutaciones en IFN- $\gamma$ R2, aunque con menor frecuencia en comparación a las mutaciones recesivas y/o dominantes en IFN- $\gamma$ R1<sup>5</sup>. Existen dos formas de mutaciones recesivas completas en IFN- $\gamma$ R2, que pueden expresar o no el receptor en la superficie de la membrana celular; en todos los casos la respuesta a IFN- $\gamma$  se encuentra abatida<sup>116-118</sup>. Las manifestaciones clínicas empiezan a temprana edad, ocasionadas por infecciones por BCG, *M. abcessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. porcium* y *M. simiae*.<sup>116,117,119-121</sup>

Asimismo, en el IFN- $\gamma$ R2 se han identificado mutaciones parciales recesivas, que predisponen a infecciones micobacterianas causadas por BCG, *M. abcessus*, *M. bovis*, *M. elephantis*, *M. fortuitum* y *M. simiae*, con baja probabilidad de desarrollar osteomielitis<sup>119,122,123</sup>. En este tipo de deficiencia, existe una baja expresión de IFN- $\gamma$ R2 en la superficie celular, pero nunca se ha encontrado abatida dicha expresión<sup>5</sup>. Aunado a lo anterior, la respuesta a IFN- $\gamma$  está dañada, pero no abatida<sup>119,122,124,125</sup>. Tanto en pacientes con deficiencias completas como en pacientes con deficiencias parciales en IFN- $\gamma$ R2 se recomienda el uso de antibióticos como profilaxis<sup>5</sup>. Igualmente, las mutaciones mono alélicas contribuyen a formas autosómicas dominantes parciales de deficiencia en IFN- $\gamma$ R2<sup>126</sup>. Estas mutaciones se caracterizan por una baja expresión de IFN- $\gamma$ R2 en la superficie celular, por lo tanto, la fosforilación de Stat-1 y la formación del complejo DNA - Homodímero de Stat-1 está disminuido en las células de los pacientes después de estimularlas con IFN- $\gamma$ <sup>126</sup>.

## **2. 8. Mutaciones en la señalización con alteraciones en Stat-1.**

Después de la unión del IFN- $\gamma$  a su receptor en la membrana y de la fosforilación de las cadenas del receptor y de la propia fosforilación de Jak1 y Jak2, Stat-1 se fosforila en la tirosina 701 por Jak2<sup>127</sup>. Stat-1 (Stat: Signal transducer and Activator of Transcription) pertenece a una familia de factores de transcripción llamados Stat, de los cuales existen siete tipos distintos: Stat-1, Stat-2, Stat-3, Stat-4, Stat-5a, Stat-5b y Stat-6. Junto con las cuatro cinasas Jak: Jak-1, Jak-2, Jak-3 y Tyk-2<sup>86,127</sup> son las moléculas que dirigen la activación celular de gran parte del sistema inmune y por lo tanto su funcionamiento adecuado es fundamental para la eliminación de microorganismos patógenos y para el control

de los mecanismos que esos microbios pueden inducir, como la activación de macrófagos<sup>128</sup>.

Para funcionar como factor de transcripción, Stat-1 forma homo o heterodímeros, ya sea con otra molécula de Stat-1 (también llamado factor activador de gamma, GAF) o con Stat-2; Stat-1 tiene 750 aminoácidos, que forman dominios desde el extremo amino-terminal, el dominio de espiral (*coiled-coil*), el dominio de unión al DNA, el dominio SH2 por el que interacciona con otras moléculas, la región de unión (*linker*) y hacia el extremo carboxilo terminal el dominio de transactivación (TA)<sup>129</sup>. Stat-1 está íntimamente involucrado en la respuesta celular mediada por citocinas incluyendo los interferones (IFN) de tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ), tipo II (IFN- $\gamma$ ) y tipo III (IFN- $\lambda$ )<sup>130,131</sup>.

Cuando Stat-1 tiene una mutación en su estructura primaria, se compromete el funcionamiento de la molécula<sup>130</sup>. Se han descrito mutaciones tanto recesivas como dominantes en Stat-1<sup>130</sup>; las mutaciones recesivas pueden tener una deficiencia parcial o completa de la molécula y ambos casos se asocian a infecciones por virus y bacterias intracelulares<sup>132-137</sup>. En cuanto a las mutaciones dominantes, se puede encontrar una deficiencia parcial de Stat-1, con una pérdida de función que predispone a los pacientes a infecciones por micobacterias ambientales como *M. avium*, también pueden presentar reacción adversa a la BCG<sup>7,138-140</sup>. En el contexto de las mutaciones dominantes, en particular las mutaciones de ganancia de función (GF) en Stat-1 hacen que la molécula presente una fosforilación persistente, por lo tanto su actividad es constante<sup>141-143</sup>. Las células de los pacientes con ese tipo de mutación, muestran una respuesta fuerte a IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-27<sup>1,141,142,144</sup>. Por otra parte, se han reportado mutaciones dominantes en Stat-1 con ganancia de función, las cuales se asocian a infecciones por *C. albicans*, infección conocida como candidiasis mucocutánea crónica (CMC)<sup>141,142</sup> y también ocurren infecciones por otros hongos en pacientes con este tipo de mutaciones<sup>145,146</sup>.

La CMC se caracteriza por infecciones por *C. albicans* en membranas mucosas, piel y uñas<sup>147</sup>. Por lo general las infecciones se presentan a corta edad en los pacientes y pueden persistir hasta la adultez, además de que en algunos casos se puede observar retraso en el crecimiento y en el inicio de la pubertad<sup>147</sup>. La CMC ocurre como consecuencia de alguna inmunodeficiencia primaria producida por mutaciones en diferentes genes que afectan la inmunidad dependiente de IL-22 e IL-17, estos genes son: *CARD9*, *CLEC7A*, *IL17RA*, *IL17F*, *STAT3* y *STAT1*<sup>1,5,148</sup>. Se ha estimado que el 50% de los casos de CMC presentan mutaciones en *STAT1*<sup>147</sup>. Por otra parte, también se han observado infecciones por *C. albicans* en pacientes con mutaciones en *IL12RB1*<sup>65</sup>, dicho gen es el que presenta más mutaciones reportadas para MSMD<sup>5,7</sup>.

Las mutaciones de GF en Stat-1 se han encontrado en los diferentes dominios de la proteína; el dominio de espiral es donde se han encontrado más mutaciones, las cuales impiden la desfosforilación de Stat-1, llevando a la GF<sup>141,144,146</sup>.

En algunos trabajos de mutagénesis dirigida en el dominio de unión al DNA, se puede inducir la resistencia a la desfosforilación, comprobando que algunos residuos de aminoácidos en las proteínas son importantes para el anclaje correcto al DNA o para ser blanco de las fosfatasas, enzimas encargadas de la eliminación del grupo fosfato en la tirosina 701 de Stat-1, y de tal forma GAF puede separarse de la molécula de DNA<sup>129,149</sup>. Takezaki, *et al*, reportaron los dos primeros casos de pacientes con mutaciones en el dominio de unión al DNA, encontrando que esas mutaciones al igual que las del dominio de espiral, interfieren con la desfosforilación de Stat-1 y confieren la propiedad de GF<sup>150</sup>, aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual la desfosforilación de Stat-1 no se lleva a cabo en el núcleo. Las mutaciones de GF en Stat-1 se han asociado a infecciones por hongos, en la mayoría de los casos por *C. albicans*<sup>1,141-144,150,151</sup>, aunque también se han reportado casos de coccidioidomicosis e histoplasmosis y mucormicosis<sup>145,146</sup>.



### **3. HIPÓTESIS.**

Entre los pacientes en estudio podremos encontrar mutaciones en *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IL12B*, *IL12RB1*, *IRF8*, *ISG15*, *NEMO* o *CYBB*, genes ya descritos en la literatura para MSMD, los cuales causan defecto específico en funcionamiento del sistema inmune, con una consecuente susceptibilidad a distintas infecciones y también existe la posibilidad de encontrar nuevas mutaciones en los genes mencionados.

#### **4. OBJETIVO.**

Identificar los defectos inmunológicos y genético en dos pacientes con infecciones persistentes o recurrentes por *Mycobacterium spp* y otras infecciones asociadas.

## 5. METODOLOGÍA.

### 5. 1. Pacientes.

En este trabajo se estudiaron dos pacientes con infecciones persistentes y recurrentes, con el fin de identificar el origen de su IDP y para comprender los mecanismos inmunológicos relacionados con la biología de las infecciones que presentaron.

Los criterios de inclusión fueron el consentimiento informado firmado por los padres de los pacientes, que los pacientes presentaran infecciones comprobadas o de sospecha clínica por *Mycobacterium spp* o *Salmonella spp*, infecciones recurrentes o persistentes por mala respuesta a terapéutica para *Mycobacterium spp*, *Salmonella spp*, *Candida spp* u otras infecciones, reacción post-vacunal a la BCG con evolución mínima de tres meses que hayan presentado fiebre y/o linfadenitis. Como criterios de exclusión fueron: serología positiva para el Virus de la inmunodeficiencia humana, diagnóstico de cáncer o Diabetes mellitus o tratamiento con esteroides o inmunosupresores.

El paciente 1, es masculino con 20 años de edad, hijo de padres sanos no consanguíneos, originario de la Ciudad de México y sin antecedentes infecciosos en su familia. Recibió la vacuna BCG al nacimiento y le causó infección con una adenitis cervical y axilar desde los dos años de edad, la cual mejoraba con tratamientos farmacológicos pero volvió a aparecer a los tres años y se curó con tratamiento con isoniazida + rifampicina + claritromicina. A los 10 años tuvo una infección micobacteriana hepática, la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dió positiva para el complejo tuberculoso, que se curó con tratamiento antimicobacteriano. Posteriormente, a los 19 años volvió a presentar una infección hepática, osteomielitis y tuberculosis miliar, lo que le causó choque séptico y estuvo cerca de fallecer, pero la atención médica adecuada y oportuna en el hospital lo sacó de la crisis; durante esa hospitalización se obtuvieron cultivos positivos para *M. bovis* no BCG y para *Candida parapsilosis* y en ese momento se comenzó a estudiar para diagnóstico de ID. El paciente tuvo también lesiones cutáneas virales por el virus del papiloma humano. Hasta donde tuvo seguimiento, el paciente presentó muy buena evolución con el uso de los fármacos antimicobacterianos. El paciente fue canalizado del servicio de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

La paciente 2, es femenina de 7 años de edad, nacida de padres sanos y no consanguíneos, originarios del estado de Oaxaca. La paciente recibió la vacuna BCG al nacimiento, la cual le provocó una adenitis axilar al año de edad y fue tratada con resección quirúrgica de los nódulos linfáticos inflamados. La madre

refiere que su hija recibió el esquema completo de vacunación sin haber presentado ninguna otra reacción adversa. Al año y a los tres años de edad tuvo neumonías (sin identificación del agente infeccioso) que requirieron hospitalización por aproximadamente una semana en cada ocasión; durante la segunda neumonía, se encontraron bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en jugo gástrico de la paciente, pero no se observó desarrollo en los cultivos y la prueba PPD aplicada a la paciente también fue negativa. A los 5 años de edad presentó un absceso supraclavicular derecho ulcerado con osteomielitis que requirió hospitalización. En biopsias del tejido blando de ese absceso y del hueso de la clavícula se observó una fuerte inflamación en los tejidos, con BAAR Positivo +++, con mas de 10 bacilos por campo, en 100 campos, en el tejido blando, y de 9 bacilos BAAR en 100 campos en hueso) lo que confirmó el diagnóstico clínico de una infección micobacteriana deseminada. En la biopsia del tejido del absceso se realizó una PCR para el Complejo Tuberculoso (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* y *M. bovis* BCG), la cual resultó positiva. Posteriormente, una prueba de Gen Xpert para *M. tuberculosis* con resistencia a rifampicina en el mismo tejido resultó altamente positiva para *M. tuberculosis* (sin resistencia a rifampicina), lo que sugiere que esa era la especie de micobacteria que causó la infección en la paciente. Después, la paciente recibió tratamiento con antimicobacterianos inicialmente con rifampicina, pirazinamida, etambutol e isoniacida por un mes y después con isoniacida + rifampicina por 16 meses más, por requerirlo clínicamente y los síntomas de la enfermedad desaparecieron. La paciente fue diagnosticada con hepatitis crónica, de etiología desconocida y una posibilidad es que se trate de efectos adversos del uso de IFN- $\gamma$  que recibió por dos meses, o por los medicamentos como fluconazol o ketokonazol que ha recibido para sus infecciones por *C. albicans*; la otra posibilidad es que la hepatitis sea de otro origen y se encuentra en estudios para hepatitis autoinmune, con resultados negativos para autoanticuerpos contra DNA, anti-cardiolipina, anti-nucleares y también ha sido negativa para infección por virus de hepatitis A, B o C. Las otras infecciones recurrentes que ha presentado, son la candidiasis oral, con 3 ó 4 episodios por año que desaparecen con tratamiento con fluconazol o con nistatina. Hasta el último seguimiento, la paciente tuvo una ligera infección de oído tratada con cefuroxima por siete días y toma nistatina para la candidiasis oral.

La paciente fue canalizada a nuestro laboratorio para estudiarla por posible ID, del servicio de Infectología, del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

## **5. 2. Obtención de células mononucleares a partir de muestras de sangre total.**

Se obtuvieron 20 mL de sangre periférica total de pacientes con sospecha de inmunodeficiencia y de sus familiares de primera línea (mamá, papá y hermanos), mediante punción venosa con el sistema de vacío BD Vacutainer en tubos con heparina de sodio. Asimismo se obtuvieron muestras de sangre de donadores sanos para utilizar sus muestras como valores de referencia. Todas las muestras de los pacientes y testigos se obtuvieron con consentimiento informado. A partir de las muestras de sangre, se obtuvieron células mononucleares (CMN) por gradiente de densidad de *Lymphoprep*, como se indica a continuación, para la obtención de las células mononucleares se utilizaron tubos cónicos estériles de 15 mL. La sangre heparinizada se diluyó 1:2 con solución salina fisiológica (SSF), 5 mL sangre + 5 mL SSF y se mezcló, se agregaron 5mL de *Lymphoprep* hasta el fondo del tubo con ayuda de una pipeta Pasteur. A continuación los tubos se centrifugaron por 30 minutos a 1,500 revoluciones por minuto (rpm), a temperatura ambiente, sin freno. Después, las CMN que formaron un anillo entre el *Lymphoprep* y el plasma, se separaron con ayuda de una pipeta Pasteur y se colocaron las células en un tubo cónico estéril de 15 mL con SSF para lavar las células dos veces, se centrifugo durante 5 minutos a 1,500 rpm. Las células se contaron en una cámara de Neubauer, se determinó la viabilidad por exclusión de azul de tripano (la viabilidad normalmente tiene que ser mayor al 90%) y se resuspendieron a concentraciones conocidas, en medio RPMI 1640 suplementado con glutamina 2mM, HEPES 10mM, antibióticos (penicilina 100U/mL, estreptomicina 100µg/mL y amfotericina B 0.025µg/mL) y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB).

## **5. 3. Inmortalización de Líneas Celulares de Linfoblastoides transformadas con el Virus de Epstein-Barr (LCL-VEB).**

Las CMN separadas por gradiente de densidad con *Lymphoprep* de los pacientes y sus familiares, se cultivaron con el Virus de Epstein-Barr (VEB) derivado de la línea celular B95-8, obtenida del mono *Saguinus oedipus*. Cuando las células se han inmortalizado exitosamente, al microscopio se observan células refringentes, amorfas o alargadas (en proceso de división celular) con la presencia de prolongaciones parecidas a pseudópodos. Para la transformación con VEB, las CMN se ajustaron a una concentración de  $10^6$  células/mL en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%, a 37°C y en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se hicieron en placas de 24 pozos para cultivo celular. Brevemente, se agregaron 0.5 mL de VEB (sobrenadantes libres de células de cultivos de la línea productora del VEB, B95-8 crecida a confluencia) a cada pozo con 1 mL de CMN. Las células se incubaron con el virus de 1 a 2 horas, a 37°C y en una atmósfera

de CO<sub>2</sub> al 5%, en presencia de 10 µg/mL de PHA y posteriormente se lavaron con RPMI 1640 simple centrifugando a 1,500 rpm por 5 minutos. Las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% y se cultivaron en presencia de 1 mg/mL de ciclosporina A, se cambió el 50% del medio tres veces por semana. La ciclosporina A se agregó a los cultivos sólo por 10 días. Las células se revisaron diariamente hasta ver claramente su transformación con la aparición y persistencia de clonas de células, lo cual se logró después de aproximadamente 20 días de cultivo. Las células bien establecidas se transfirieron a botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> para su expansión y para los experimentos.

#### **5. 4. Cuantificación de IL-12p40 mediante ELISA en sandwich.**

La determinación de IL-12p40 se realizó en sobrenadantes de cultivo de sangre periférica total diluida 1:2 con RPMI 1640. Las muestras de sangre diluida con RPMI 1640 se estimularon con medio de cultivo (sin estímulo), BCG (20 µL del sobrenadante de un stock que se agitó con vortex por un minuto y que se dejó reposar por otro minuto; el stock contiene ~9x10<sup>8</sup> UFC/mL, por lo tanto en 20 µL hay ~18x10<sup>6</sup> UFC), BCG + 50UI de IFN-γ, BCG + 100UI de IFN-γ, BCG + 500UI de IFN-γ y BCG + 1,000UI de IFN-γ, y se incubaron por 48 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se cosecharon los sobrenadantes libres de células a las 48 horas, se almacenaron a -70°C hasta la determinación de las citocinas. La producción de IL-12p40 se determinó en los sobrenadantes mediante ELISA en sándwich, empleando un kit comercial R&D systems, se siguieron las recomendaciones del fabricante (sensibilidad analítica de 31.25pg/mL).

Para el ELISA en sándwich, primero se sensibilizó la placa de 96 pozos con el anticuerpo de captura de IL-12p40 diluido en PBS a una concentración de 4 µg/mL, se emplearon 100 µL del anticuerpo de captura por pozo, se incubó la placa toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con 100 µL por pozo con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Luego, se bloqueó la placa con una solución bloqueadora comercial (SuperBlock, Thermo Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron tres veces los pozos de la placa con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Después, en los pozos correspondientes se colocaron 100 µL de las diferentes concentraciones conocidas del estándar de IL-12p40, del blanco y de las muestras, cada condición se realizó por duplicado. Se incubó la placa por dos horas, a temperatura ambiente y se lavó tres veces con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Luego, se colocaron 100 µL por pozo del anticuerpo de detección de IL-12p40 a una concentración de 6 µg/mL, se incubó por dos horas a temperatura ambiente y se lavó con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Posteriormente, se preparó la estreptavidina acoplada a peroxidasa de rabano a una dilución de 1:40, se colocaron 100 µL por pozo y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente,

protegido de la luz. Se lavó tres veces la placa con PBS y Tween 20 al 0.05%, se preparó una solución de sustrato, en la cual se mezclaron partes iguales del reactivo A y del reactivo B, se colocaron 100  $\mu$ L por pozo de la solución de sustrato y se dejó incubar por 20 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Finalmente, se detuvo la reacción con 50  $\mu$ L por pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2N y se realizó la lectura de las densidades ópticas de cada pozo de la placa de ELISA en un lector a 450nm con referencia de 570nm.

### **5. 5. Cuantificación de IL-12p70 mediante ELISA en sandwich.**

La determinación de IL-12p70 se realizó en sobrenadantes de cultivo de sangre periférica total diluida 1:2 con RPMI 1640. Las muestras de sangre diluida con RPMI 1640 se estimularon con medio de cultivo (sin estímulo), BCG (20  $\mu$ L del sobrenadante de un stock que se agitó con vortex por un minuto y que se dejó reposar por otro minuto; el stock contiene  $\sim 9 \times 10^8$  UFC/mL, por lo tanto en 20  $\mu$ L hay  $\sim 18 \times 10^6$  UFC), BCG + 50UI de IFN- $\gamma$ , BCG + 100UI de IFN- $\gamma$ , BCG + 500UI de IFN- $\gamma$  y BCG + 1,000UI de IFN- $\gamma$ , y se incubaron por 48 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se cosecharon los sobrenadantes libres de células a las 48 horas, se almacenaron a -70°C hasta la determinación de las citocinas. La producción de IL-12p70 se determinó en los sobrenadantes mediante ELISA en sándwich, empleando un kit comercial R&D systems, se siguieron las recomendaciones del fabricante (sensibilidad analítica de 15.625pg/mL).

Para el ELISA en sándwich, primero se sensibilizó la placa de 96 pozos con el anticuerpo de captura de IL-12p70 diluido en PBS a una concentración de 4  $\mu$ g/mL, se emplearon 100  $\mu$ L del anticuerpo de captura por pozo, se incubó la placa toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con 100  $\mu$ L por pozo con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Luego, se bloqueó la placa con una solución bloqueadora comercial (SuperBlock, Thermo Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron tres veces los pozos de la placa con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Después, en los pozos correspondientes se colocaron 100  $\mu$ L de las diferentes concentración conocidas del estándar de IL-12p70, del blanco y de las muestras, cada condición se realizó por duplicado. Se incubó la placa por dos horas a temperatura ambiente y se lavó tres veces con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Luego, se colocaron 100  $\mu$ L por pozo del anticuerpo de detección de IL-12p70 a una concentración de 6  $\mu$ g/mL, se incubó por dos horas a temperatura ambiente y se lavó con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Posteriormente, se preparó la estreptavidina acoplada a peroxidasa de rabano a una dilución de 1:40, se colocaron 100  $\mu$ L por pozo y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Se lavó tres veces la placa con PBS mas Tween 20 al 0.05%, se preparó una solución de sustrato, en la cual se mezclaron partes iguales del

reactivo A y del reactivo B, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  por pozo de la solución de sustrato y se dejó incubar por 20 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Finalmente, se detuvo la reacción con 50  $\mu\text{L}$  por pozo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 2N y se realizó la lectura de las densidades ópticas de cada pozo de la placa de ELISA en un lector a 450nm con referencia de 570nm.

### **5. 6. Cuantificación de TNF- $\alpha$ mediante ELISA en sandwich.**

La determinación de TNF- $\alpha$  se realizó en sobrenadantes de cultivo de sangre periférica total diluida 1:2 con RPMI 1640. Las muestras de sangre diluida con RPMI 1640 se estimularon con medio de cultivo (sin estímulo), BCG (20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de un stock que se agitó con vortex por un minuto y que se dejó reposar por otro minuto; el stock contiene  $\sim 9 \times 10^8$  UFC/mL, por lo tanto en 20  $\mu\text{L}$  hay  $\sim 18 \times 10^6$  UFC), BCG + 50UI de IFN- $\gamma$  y BCG + 500UI de IFN- $\gamma$ , se incubaron por 48 horas a 37°C en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Se cosecharon los sobrenadantes libres de células a las 48 horas, se almacenaron a -70°C hasta la determinación de las citocinas. La producción de TNF- $\alpha$  se determinó en los sobrenadantes mediante ELISA en sándwich, estandarizó en el laboratorio (sensibilidad analítica de 15.625pg/mL).

Para el ELISA en sándwich, primero se sensibilizó la placa de 96 pozos con el anticuerpo de captura de TNF- $\alpha$  diluido en PBS a 2  $\mu\text{g/mL}$ , se emplearon 50  $\mu\text{L}$  del anticuerpo de captura por pozo, se incubó la placa toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 50  $\mu\text{L}$  por pozo con PBS con Tween 20 al 0.05%. Luego, se bloqueó la placa con 100  $\mu\text{L}$  de una solución bloqueadora comercial (SuperBlock, Thermo Scientific) durante 30 minutos a 37°C, se lavaron tres veces los pozos de la placa con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Después, en los pozos correspondientes se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones conocidas del estándar de TNF- $\alpha$ , blanco y muestras, cada condición se realizó por duplicado. Se incubó la placa por dos horas a 30°C y se lavó tres veces con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Luego, se colocaron 50  $\mu\text{L}$  por pozo del anticuerpo de detección de TNF- $\alpha$  acoplado a biotina a una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$ , se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente y se lavó seis veces con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Posteriormente, se preparó la estreptavidina acoplada a fosfatasa alcalina a una dilución de 1:2,000, se colocaron 50  $\mu\text{L}$  por pozo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Se lavó seis veces la placa con PBS y Tween 20 al 0.05%, se preparó una solución de sustrato, en la cual se disolvió una pastilla de p-nitrofenilfosfato en dietanolamina al 1M con  $\text{MgCl}_2$  al 0.5mM, se colocó 50  $\mu\text{L}$  por pozo del sustrato y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Finalmente, se detuvo la



reacción con 50  $\mu\text{L}$  por pozo de NaOH al 1M y se leyó la placa en un lector de ELISAs a 405nm.

### **5. 7. Cuantificación de IFN- $\gamma$ mediante ELISA en sandwich.**

La determinación de IFN- $\gamma$  se realizó en sobrenadantes de cultivo de sangre periférica total diluida 1:2 con RPMI 1640. Las muestras de sangre diluída con RPMI 1640 se estimularon con medio de cultivo (sin estímulo), 20 ng/mL de IL-12 recombinante humana, BCG, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PHA, BCG + 20 ng/mL de IL-12 ó 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PHA + 20 ng/mL de IL-12, y se incubaron por 48 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se cosecharon los sobrenadantes libres de células a las 48 horas, se almacenaron a -70°C hasta la determinación de las citocinas. La producción de IFN- $\gamma$  se determinó en los sobrenadantes mediante ELISA en sándwich, empleando un kit comercial R&D systems, se siguieron las recomendaciones del fabricante (sensibilidad analítica de 7.8125pg/mL).

Para el ELISA en sándwich, primero se sensibilizó la placa de 96 pozos con el anticuerpo de captura de IFN- $\gamma$  diluido en PBS a una concentración de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se emplearon 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo de captura por pozo, se incubó la placa toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con 100  $\mu\text{L}$  por pozo con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Luego, se bloqueó la placa con una solución bloqueadora comercial (SuperBlock, Thermo Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron tres veces los pozos de la placa con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Después, en los pozos correspondientes se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones conocidas del estándar de IFN- $\gamma$ , del blanco y de las muestras, cada condición se realizó por duplicado. Se incubó la placa por dos horas a temperatura ambiente y se lavó tres veces con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Luego, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  por pozo del anticuerpo de detección de IFN- $\gamma$  a una concentración de 50 ng/mL, se incubó por dos horas a temperatura ambiente y se lavó con PBS mas Tween 20 al 0.05%. Posteriormente, se preparó la estreptavidina acoplada a peroxidasa de rabano a una dilución de 1:40, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  por pozo y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Se lavó tres veces la placa con PBS mas Tween 20 al 0.05%, se preparó una solución de sustrato, en la cual se mezclaron partes iguales del reactivo A y del reactivo B, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  por pozo de la solución de sustrato y se dejó incubar por 20 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Finalmente, se detuvo la reacción con 50  $\mu\text{L}$  por pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2N y se realizó la lectura de las densidades ópticas de cada pozo de la placa de ELISA en un lector a 450nm con referencia de 570nm.

### **5. 8. Determinación de la expresión del receptor para IL-12 mediante citometría de flujo.**

Se obtuvieron CMN de sangre periférica total de los pacientes y sus familiares de primer grado, así como de un testigo sano no familiar y se cultivaron  $1 \times 10^6$  células por pozo en placas de cultivo de 24 pozos en RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%. Las células se estimularon con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PHA y se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de  $\text{CO}_2$  por 3 días. Transcurrido el tiempo de estimulación, se cosecharon las CMN y se realizó la tinción para citometría de flujo (CF), con los anticuerpos anti-CD3PerCP (347344) + anti-IL-12R $\beta$ 1PE (556065), CD3PerCP + anti-IL-12R $\beta$ 2PE (550723), todos de la marca Becton-Dickinson, y se emplearon controles de isotipo de ratón IgG1PE y control de isotipo de rata IgGPE. Se incubaron las células con cantidades saturantes de los anticuerpos (CD3PerCP + IL12R $\beta$ 1PE ó CD3PerCP + IL-12R $\beta$ 2) y sus controles de isotipo correspondientes por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Posterior a la incubación, se lavaron las células con 1 mL de PBA (PBS + 1% de SFB + 0.1% de azida de sodio), las células se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en paraformaldehído (PFA) al 1% en PBS y se adquirieron por lo menos 10,000 eventos en un citómetro *FACSCalibur* de *Becton-Dickinson* calibrado para leer tres fluorescencias. Las gráficas se realizaron y se analizaron con el programa *CellQuest Pro* (*Becton-Dickinson*, San José, Ca, U.S.A.)

### **5. 9. Detección de IFN- $\gamma$ R1 mediante CF en CMN de sangre periférica.**

Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de sangre con heparina en tubos de citometría, se utilizaron tres tubos por paciente, familiares y controles. El primer tubo se marcó como sin tinción, el segundo con anticuerpos para CD14-FITC + control de isotipo-PE y el tercer tubo con anticuerpos para CD14-FITC + CD119-PE (12-1199-42, eBioscience) y se agregaron los anticuerpos respectivos en cantidades saturantes. Luego, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para lisar los eritrocitos se agregó 1 mL por tubo de FACS lysing solution (349202, Becton Dickinson) a 1x en agua destilada, se agitó e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBA, se centrifugaron a 1,500 rpm por 10 minutos. Finalmente, se resuspendieron las células en 400  $\mu\text{L}$  de PFA al 1% para su análisis en el citómetro de flujo *FACSCalibur* de *Becton-Dickinson*, se adquirieron al menos 10,000 eventos por cada muestra.

### **5. 10. Cinética de fosforilación de Stat-1 en respuesta a IFN- $\gamma$ .**

Las LCL-VEB se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 1% de SFB un día antes del estímulo. Se cultivaron  $5 \times 10^6$  células de LCL-VEB ( $1 \times 10^6$  células por

tubo) bajo las siguientes condiciones: sin estímulo, 15, 30, 45, 60 y 90 minutos con IFN- $\gamma$  (todos los puntos de la cinética se estimularon con 1,000UI de IFN- $\gamma$ ). Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con 1% de SFB a 37°C, al transcurrir cada uno de los tiempos de estimulación con IFN- $\gamma$ , se detuvo el estímulo con 1 mL de PBS frío.

#### **5. 11. Estimulación con IFN- $\gamma$ para inducir la fosforilación de Stat-1 en LCL-VEB.**

Las LCL-VEB se prepararon con RPMI 1640 suplementado con 1% de SFB un día antes del estímulo. Se tomaron  $5 \times 10^6$  células por condición ( $1 \times 10^6$  células por tubo) y se colocaron en RPMI 1640 simple a 37°C. Se realizó la activación con 100UI o con 1,000UI de IFN- $\gamma$  o con 25,000UI IFN- $\alpha$  por 30 minutos y se detuvo la estimulación con 1 mL de PBS frío.

#### **5. 12. Detección de p-Stat-1 (Y701) mediante Citometría de Flujo.**

La detección intracelular de pStat1 (Y701) por CF, se hizo con el protocolo basado en la metodología original de Nolan y Krutzik<sup>85</sup>. Brevemente, después de la activación de las células con IFN- $\gamma$  o IFN- $\alpha$  (LCL-VEB o células mononucleares) como se indica en los dos apartados anteriores, la fosforilación de Stat-1 (Y701), se preservó por fijación con paraformaldehído (PFA) al 4% (concentración final 2%) se incubó por 10 minutos a 37°C; después las células se lavaron por centrifugación y se permeabilizaron en una solución con 90% de metanol frío + 10% de una solución permeabilizadora comercial (FacsPerm II, de *Becton-Dickinson*) por 30 minutos. Nuevamente se lavaron las células por centrifugación, se decantó el sobrenadante y se incubaron con el anticuerpo anti-p-Stat-1 (Y701)-PE por 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron y se resuspendieron en PFA al 1% y fueron analizadas el mismo día en un citómetro de flujo *FACSCalibur* de *Becton-Dickinson*.

#### **5. 13. Inhibición de las cinasas que fosforilan Stat-1, con estaurosporina (Sta).**

Las células LCL-VEB se prepararon con RPMI 1640 suplementado con 1% de SFB un día antes del estímulo. Se cultivaron  $5 \times 10^6$  células de LCL-VEB bajo las siguientes condiciones: sin estímulo, IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ +Sta 15 minutos, IFN- $\gamma$ +Sta 30 minutos y IFN- $\gamma$ +Sta 60 minutos. Las LCL-VEB se estimularon primero con 1,000UI de IFN- $\gamma$  por 30 minutos y luego se incubaron con 1  $\mu$ M de Sta por 15, 30 y 60 minutos.

#### **5. 14. Obtención de extractos citoplásmicos y nucleares de LCL-VEB.**

Las células estimuladas con IFN- $\gamma$  se lavaron con PBS y se centrifugaron a 17,000xg durante 1 minuto a 4°C. El botón, se resuspendió en 1 mL de amortiguador de lisis de membrana (10 mM HEPES [pH 7.9], 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.05% NP-40, 25 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF), se incubó por 30 minutos en frío y se centrifugó de nuevo a 17,000xg por 1 minuto a 4°C. Se recolectó el sobrenadante, el cual se almacenó como extracto citoplásmico. Luego, se añadieron 15  $\mu$ L del amortiguador de lisis nuclear (20 mM HEPES [pH 7.9], 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 25% glicerol, 1 mM PMSF, 25 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), se agitó en vórtex durante 20 segundos y se incubó en frío por 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 17,000xg por 1 minuto a 4°C. El sobrenadante se recolectó en un tubo nuevo y se almacenó como extracto nuclear. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford.

#### **5. 15. Cuantificación de proteínas.**

Primero se realizó una curva patrón con albúmina estándar (1  $\mu$ g/ $\mu$ L), se etiquetaron 5 tubos eppendorf de la siguiente manera: Blanco, 2, 4, 8 y 16. Para diluir una parte del reactivo en cuatro partes de agua se colocaron 800 $\mu$ L de agua destilada en los tubos etiquetados. Se adicionaron 2 $\mu$ g, 4 $\mu$ g, 8 $\mu$ g y 16 $\mu$ g de albúmina estándar a los tubos de 2, 4, 8 y 16 respectivamente, el tubo Blanco no se le adicionó estándar. A cada tubo se le agregaron 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford (BioRad) y se agitó. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se midió la absorbancia a 595nm.

#### **5. 16. Electroforesis de proteínas.**

Las proteínas de los extractos nucleares o citoplásmicos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Se cargaron 10 $\mu$ g de proteína de los extractos en geles de poliacrilamida PAGE-SDS al 10% y se transfirieron a membrana de PVDF.

#### **5. 17. Transferencia.**

Se cortaron 4 piezas de papel filtro y una pieza de membrana PVDF, todos del tamaño del gel. Se realizó un corte pequeño en el extremo superior izquierdo para identificar el frente de la membrana. Se activó la membrana con metanol y se enjuagó con agua destilada. Se humedecieron dos piezas de papel filtro en el amortiguador de transferencia y se colocaron sobre la fibra en el cassette de transferencia. Se recortó el gel, dejando únicamente el área de interés con ayuda del marcador de peso molecular (de 50kDa a 130kDa). Se colocó el gel sobre el

papel filtro de tal forma que la parte izquierda del gel quede del lado derecho del papel filtro. Se colocó la membrana sobre el gel, en este caso la marca realizada también debe quedar del lado derecho del papel filtro, se eliminaron las burbujas existentes entre la membrana y el gel. Se colocaron las otras dos piezas de papel filtro previamente humedecidos con amortiguador de transferencia. El cassette se cerró y se transfirió a 100 volts por una hora en frío.

### 5. 18. Immunobloting para el análisis de la fosforilación de Stat-1.

Primero se realizó el bloqueo de la membrana con una solución bloqueadora comercial (SuperBlock, Thermo Scientific) por 30 minutos en agitación constante a temperatura ambiente. Se lavó la membrana con TBS-Tween 0.1% hasta eliminar cualquier residuo del SuperBlock. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario con su dilución correspondiente en TBS con 1% de albúmina, como se indica a continuación:

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Tiempo de incubación</b>	<b>Dilución</b>
Anti-lamina B	1 hora	1:1000
Anti-tubulina	1 hora	1:2000
Anti-Stat-1	1 hora	1:6500
Anti-pStat-1	24 horas	1:1500

Posteriormente se realizaron 2 lavados con TBS-Tween 0.1% de 10 minutos y 3 lavados de 5 minutos. Se preparó e incubó la membrana con el anticuerpo secundario diluido en TBS con albúmina al 1% como se indica a continuación:

<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Reconoce</b>	<b>Tiempo de incubación</b>	<b>Dilución</b>
Anti-cabra	Anti-lamina B	1 hora	1:1000
Anti-ratón	Anti-tubulina	1 hora	1:10000
Anti-conejo	Anti-Stat-1	1 hora	1:15000
Anti-conejo	Anti-pStat-1	1 hora	1:15000

Después del tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, se realizó un lavado de 10 minutos con TBS-Tween 0.1%, dos lavados de 5 minutos y un lavado de 5 minutos (éste último con TBS sin Tween 20). Luego, se preparó la

solución de revelado SuperSignal (Thermo), se mezclaron las soluciones en partes iguales y se incubó por 5 minutos y se reveló en un cuarto oscuro.

### **5. 19. Obtención de DNA genómico a partir de sangre periférica total o células LCL-VEB.**

A partir de sangre fresca o de células LCL-VEB de los pacientes, sus familiares o los sujetos sanos se obtuvo DNA genómico. Las muestras de sangre fresca se centrifugaron a 3,500 rpm por 10 minutos, luego con ayuda de una pipeta Pasteur se recuperó el anillo de leucocitos y se colocó en un tubo de 2 mL. En el caso de las células LCL-VEB, el DNA genómico se obtuvo a partir de un millón de células. Una vez que se colocaron las células en un tubo de 2 mL, se les añadieron 800  $\mu$ L de buffer TKM1 (Tris-HCl 10 mM KCl 10 mM,  $MgCl_2$  10 mM y EDTA 2 mM con pH = 7.6) con tritón (agregar 75  $\mu$ L de tritón por cada 3 mL de solución de TKM1), inmediatamente se congelaron los tubos a  $-70^{\circ}C$ . Una vez congelados los tubos, se colocaron en temperatura ambiente para descongelar y se volvieron a congelar a  $-70^{\circ}C$ . Se descongelaron los tubos y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 1 minuto en microcentrifuga, el sobrenadante se descartó. Se añadió 1.5 mL de amortiguador TKM1 y se agitó suavemente, se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 250  $\mu$ L de acetato de sodio 0.2 M a cada tubo, 25  $\mu$ L de SDS al 10% y 5  $\mu$ L de proteinasa K [20 mg/mL] (la proteinasa K se preparó en un amortiguador de Tris-HCl 20 mM,  $Na_2EDTA$  4 mM, NaCl 100 mM, con pH = 7.4), se aplicó vortex brevemente y se incubó por 30 minutos a  $55^{\circ}C$ . Se agregaron 120  $\mu$ L de fenol tamponado en tris con pH = 7.5-7.8 y se aplicó vortex hasta obtener una emulsión. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos. Se tomó la fase acuosa que se observa completamente transparente y mucosa, se colocó en un tubo nuevo de 1.5 mL. La fase orgánica se observa en el fondo del tubo de color amarillo o café. Después, a la fase acuosa se le realizó una extracción con 120  $\mu$ L de fenol tamponado, se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 minutos y se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo de 1.5 mL. Se añadieron 120  $\mu$ L de cloroformo a la fase acuosa y se homogenizó en vortex hasta obtener una suspensión de color amarillo claro, se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 minutos. Se recuperaron las fases acuosas en un tubo nuevo de 1.5 mL, se añadió 900  $\mu$ L de etanol absoluto, se mezcló por inversión hasta que el DNA precipitó, se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se lavó con 1 mL de etanol al 80% para eliminar las sales, se aplicó vortex para solubilizar los iones contaminantes, luego se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante, se repitió el lavado. Se secaron los botones de DNA en campana de flujo laminar hasta que los botones quedaron translúcidos. Se resuspendieron los botones en 100  $\mu$ L de  $H_2O$  ultrapura o inyectable, se aplicó vortex tratando de resuspender por completo.

Se incubó a 55-60°C durante 2 horas, se agitó periódicamente para disolver el DNA. Se tomó una alícuota para cuantificar en NanoDrop 1000. El stock se conservó a -20°C.

### 5. 20. Secuenciación de DNA.

A partir del DNA genómico obtenido de sangre periférica total o de células LCL-VEB, se amplificaron siete exones para *IFNGR1* y 22 exones para *STAT-1* (Anexo 10. 5. Oligonucleótidos para la secuenciación). Se preparó una mezcla para PCR con H<sub>2</sub>O grado biología molecular, 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, desoxirribonucleótidos de trifosfato (dNTPs), enzima Taq polimerasa, los oligonucleótidos delantero (F) mas reverso (R) y se añadió 1 µL de DNA de cada muestra. Se colocaron los tubos de reacción de PCR en el termociclador MyCycler, BIO RAD. Las condiciones de ciclado y temperaturas de amplificación empleadas fueron:

94°C por 5'

94°C por 45" <sup>2</sup>

54°C por 45"                    38  
  ciclos

72°C por 1'

72°C por 7'

4°C hasta su uso.

Una vez amplificados los exones, se realizó una PCR de marcaje en la cual se usaron 1 µL del producto de la primera PCR, oligonucleótidos F o R, BigDye<sup>®</sup> Terminator y H<sub>2</sub>O de grado biología molecular. Las amplificaciones marcadas se obtuvieron con las siguientes condiciones de ciclado y temperaturas de amplificación:

96°C por 1'

96°C por 10" <sup>2</sup>

50°C por 10"                    25  
  ciclos

60°C por 5"

4°C hasta su uso.

Posteriormente, el producto de amplificación marcado se purificó por medio de la filtración en gel de Sephadex-100 (Sigma-Aldrich), el cual tiene propiedades

cromatográficas para la separación de fragmentos de DNA de doble cadena y los productos purificados se secuenciaron en el analizador de secuencias ABI Prism 377 (Perkin-Elmer Applied Biosystem). La secuencia referencia para *IFNGR1* o *STAT-1* se obtuvo de Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) y las alineaciones de las secuencias se realizaron usando el software SeqMan Pro (DNASTAR).



## 6. RESULTADOS.

### Paciente 1.

En el paciente 1, primero determinamos la producción de IFN- $\gamma$  y la respuesta a IL-12, y encontramos una producción de IFN- $\gamma$  normal en respuesta a BCG y las células del paciente respondieron a la coestimulación con BCG+IL-12, aumentando la producción de IFN- $\gamma$  (Figura 3).

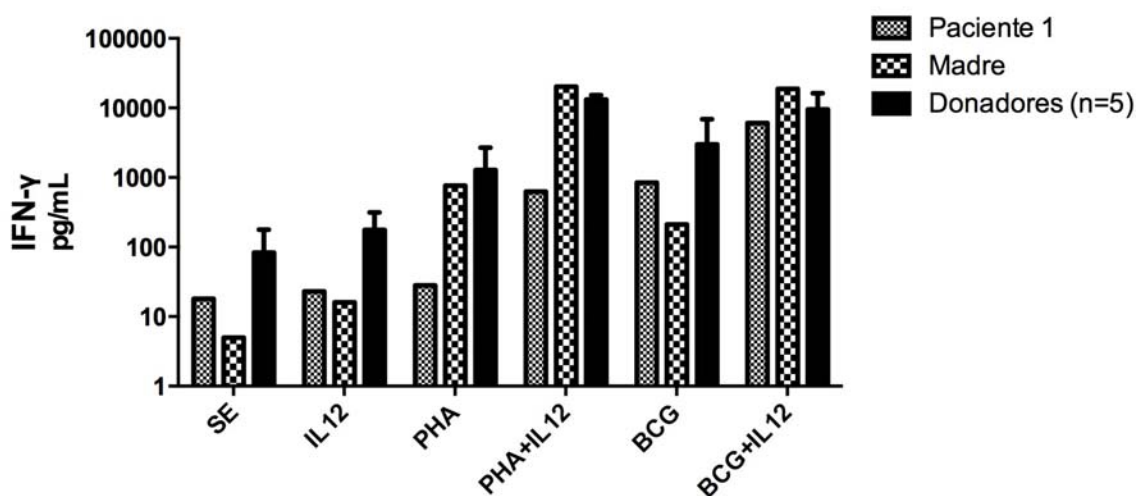


Figura 3. Determinación de la producción de IFN- $\gamma$  y la respuesta a IL-12 en muestras de sangre del paciente 1, su madre y donadores (media, n=5). Las muestras de sangre diluidas 1:2 con RPMI 1640 simple se estimularon con: sin estímulo, 20 ng/mL de IL-12, 10  $\mu$ g/mL de PHA, 10  $\mu$ g/mL de PHA + 20 ng/mL de IL-12, BCG ó BCG + 20 ng/mL de IL-12. La producción de IFN- $\gamma$  se determinó por ELISA de sandwich en los sobrenadantes de 48 horas. Se muestran las medias con desviación estándar. El gráfico se realizó en el programa GraphPad Prism versión 6.

Aunado a los resultados anteriores, podemos observar que el receptor para IL-12 funciona adecuadamente, debido a que cuando se coestimula con BCG+IL-12 aumenta la producción de IFN- $\gamma$ , en comparación con la producción de la estimulación de BCG, indicando una expresión normal del receptor y que el receptor es funcional.

Cuando se determinó la respuesta a IFN- $\gamma$  mediante la producción de IL-12p40, se encontró una producción en respuesta a BCG y no se observó un aumento en respuesta a IFN- $\gamma$  (BCG+IFN- $\gamma$  comparado con BCG) en las células del paciente (Figura 4). Estos resultados sugieren que podía haber un defecto en el receptor para IFN- $\gamma$  o en la señalización intracelular, como por ejemplo alguna posible mutación en Stat-1.

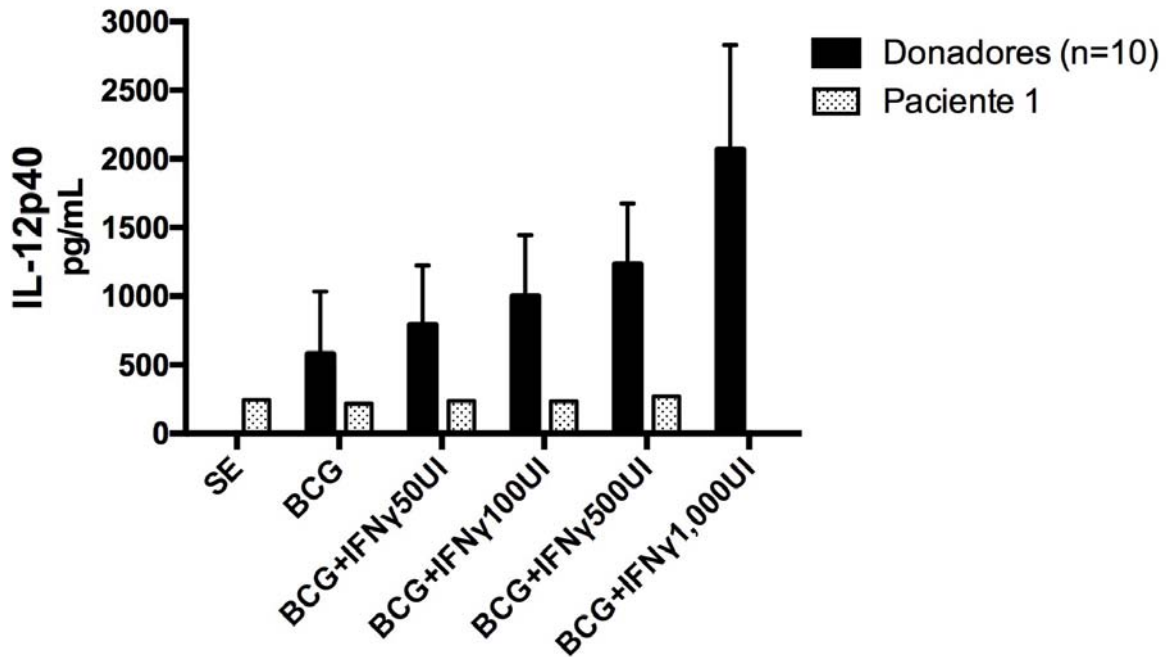


Figura 4. Determinación de la producción de IL-12p40 en respuesta a IFN- $\gamma$  en células del paciente y controles sanos (media, n=10). Las muestras de sangre se diluyeron 1:2 con RPMI simple se estimularon con: sin estímulo, BCG, BCG + 50UI de IFN- $\gamma$ , BCG + 100UI de IFN- $\gamma$ , BCG + 500UI de IFN- $\gamma$  ó BCG + 1,000UI de IFN- $\gamma$ . La IL-12p40 se determinó por ELISA de sandwich en los sobrenadantes de los cultivos a las 48 horas. Se muestran las medias con desviación estándar. El gráfico se realizó en el programa GraphPad Prism versión 6.

Los resultados anteriores nos llevaron a plantearnos la pregunta de si el posible defecto en el paciente estaría en el IFN- $\gamma$ R o en la señalización intracelular inducida por IFN- $\gamma$ , posiblemente por una mutación en *STAT-1*. Como no fue posible obtener repetidas veces sangre y CMN del paciente, decidimos trabajar con su línea celular transformada por el Virus de Epstein Barr (LCL-VEB) para estudiar la fosforilación de Stat-1 en respuesta a IFN- $\gamma$ . Se realizó el ensayo de fosforilación de Stat-1 y se evaluó por CF. Para la estrategia de análisis, se adquirieron las células y se evaluaron en un Dot plot de tamaño contra granularidad, la población de interés se seleccionó con una ventana para posteriormente visualizar la fluorescencia de de pStat-1 PE en un histograma. Finalmente, se realizó un histograma de todas las condiciones (*Overlay*) para el control, otro para el paciente y otro para la mamá. Al comparar el resultado de la fosforilación de Stat-1 en línea celular del paciente contra las líneas celulares de testigos sanos, se observó una menor fosforilación de Stat-1 en las células del paciente en respuesta a IFN- $\gamma$ , pero en cambio se vió una buena respuesta a la estimulación con IFN- $\alpha$  (Figura 5 y Tabla 1), lo que sugirió que el problema o la

anomalía en las células del paciente se debía probablemente a algún defecto en el IFN- $\gamma$ R y no en Stat-1 que sí se fosforiló en respuesta a IFN- $\alpha$ .

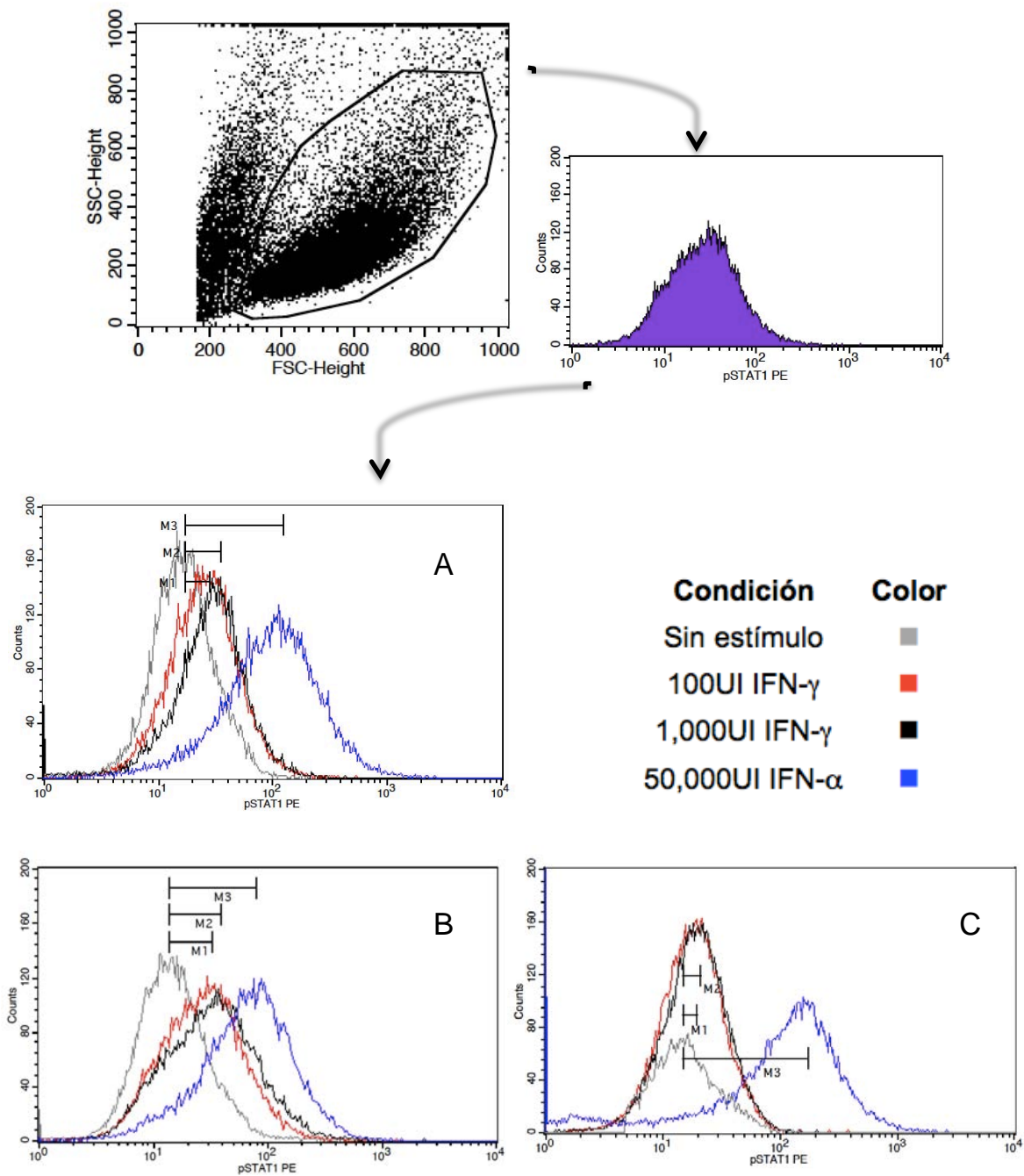


Figura 5. Fosforilación de Stat-1 en LCL-B EBV estimuladas con 100UI de IFN- $\gamma$ , 1,000UI de IFN- $\gamma$  o 50,000UI de IFN- $\alpha$ . Las células LCL-VEB de un sujeto sano (A), de la mamá del paciente (B) y del paciente 1 (C), se estimularon por 30 min con IFN- $\gamma$  (100 y 1,000UI) ó IFN- $\alpha$  (50,000UI), se fijaron y se procesaron para detectar pStat-1 intracelularmente por citometría de flujo. M1 = rango de sin estímulo a 100UI de IFN- $\gamma$ , M2 = rango de sin estímulo a 1,000UI de IFN- $\gamma$ , M3 = rango de sin estímulo a 50,000 UI de IFN- $\alpha$ .

	Control	Madre	Paciente 1
IFN- $\gamma$ 100UI	1.9	1.54	1.13
IFN- $\gamma$ 1,000UI	2.42	1.73	1.19
IFN- $\alpha$ 50,000UI	4.91	6.92	8.35

Tabla 1. Índices de estimulación para la fosforilación de Stat-1 en células LCL-VEB del Paciente 1, su madre y un control sano, en respuesta a 100UI de IFN- $\gamma$ , 1,000UI de IFN- $\gamma$  y 50,000UI de IFN- $\alpha$ . Los índices se calcularon a partir de histogramas de citometría de flujo (figura 5) se dividió la intensidad media de fluorescencia para Stat-1PE de células estimuladas con IFN- $\gamma$  o IFN- $\alpha$  entre la intensidad media de fluorescencia para Stat-1PE de células sin estimular .

Para complementar y ampliar los resultados obtenidos por CF, se hicieron ensayos de *Western blot* (WB) para estudiar las formas desfosforiladas y fosforiladas de Stat-1 y en el padre del paciente y en un testigo sano. Estos experimentos se hicieron también con células LCL-VEB del paciente y testigos. Por WB, observamos un aumento en la fosforilación de Stat-1 en respuesta a 100 o 1,000UI de IFN- $\gamma$  en las líneas celulares de la madre o en las de un testigo sano; en las células del paciente encontramos una baja fosforilación de Stat-1 en respuesta a IFN- $\gamma$ , sugiriendo un posible defecto en el receptor para IFN- $\gamma$  (Figura 6).

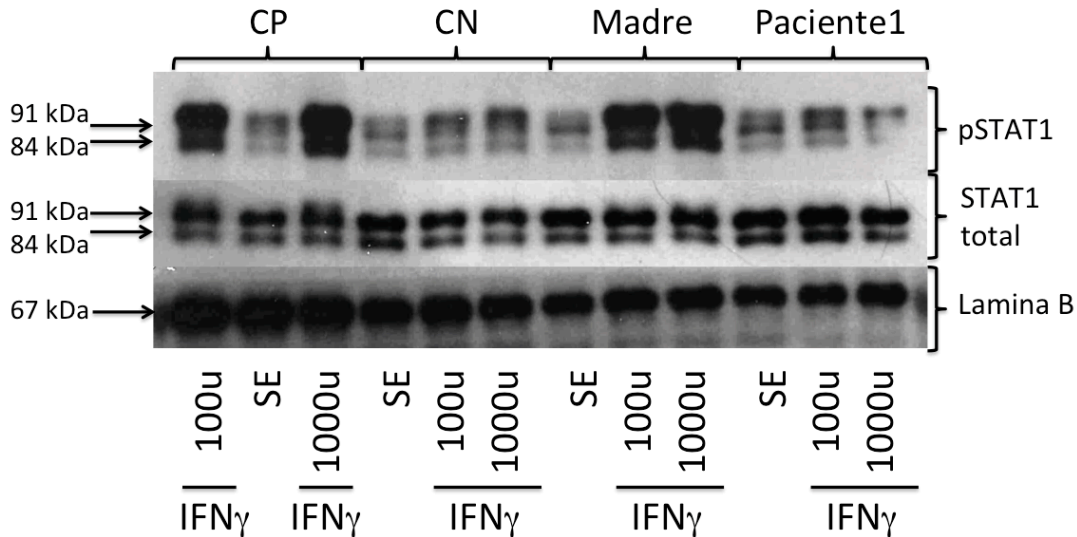


Figura 6. Determinación de la fosforilación de Stat-1 por *Western blot* en células LCL-VEB del paciente 1, de la madre del paciente, un sujeto sano y un control negativo. Las células se estimularon con 100 o 1,000 UI de IFN- $\gamma$  por 30 minutos, se obtuvieron los extractos nucleares para *Western blot* para Stat-1 total y pStat-1. CP = control positivo (testigo sano), CN = control negativo (paciente con IDP estudiado en la Unidad de Bioquímica del INCMNSZ), SE = sin estímulo. Se utilizó el programa ImageJ64 para la edición de las películas de *Western blot*. Se muestran las medias con desviación estándar. El gráfico se realizó en el programa GraphPad Prism versión 6.

Los resultados anteriores, sugirieron una posible mutación en el IFN- $\gamma$ R y nos avocamos a investigar esta posibilidad. El IFN- $\gamma$ R tiene dos cadenas, la cadena IFN- $\gamma$ R1 y la IFN- $\gamma$ R2, en ambas cadenas se han reportado mutaciones pero las mutaciones en IFN- $\gamma$ R1 se han presentado en un mayor número de pacientes comparado con las mutaciones en IFN- $\gamma$ R2<sup>5</sup>, por lo tanto decidimos evaluar la expresión del IFN- $\gamma$ R1 y asegurarnos que su expresión fuera normal, de tal manera que la falta de fosforilación de Stat-1 no se debiera a una expresión anormal de IFN- $\gamma$ R1. Se realizó una tinción con anticuerpos monoclonales anti-IFN- $\gamma$ R1 (CD119) conjugado con PE y un anticuerpo anti-CD14 acoplado a FITC y se evaluó por CF la expresión de esas moléculas en células mononucleares del paciente y testigos sanos. Para la estrategia de análisis, se seleccionaron a las células CD14+ en una gráfica de CD14 contra granularidad, después se evaluó la fluorescencia para CD119 PE en un histograma de las células CD14+. Posteriormente, se realizó un histograma de tipo *Overlay* para evaluar la fluorescencia de las células de los controles, el papá del paciente y el paciente 1. Encontramos que las células CD14+ del paciente 1 tienen una mayor expresión del IFN- $\gamma$ R1 en comparación con las células CD14+ de su padre y de tres testigos sanos (Figura 7). La mayor expresión del IFN- $\gamma$ R1 en el paciente se confirmó con la comparación de la intensidad media de fluorescencia para ese receptor, con tres testigos sanos y su padre.

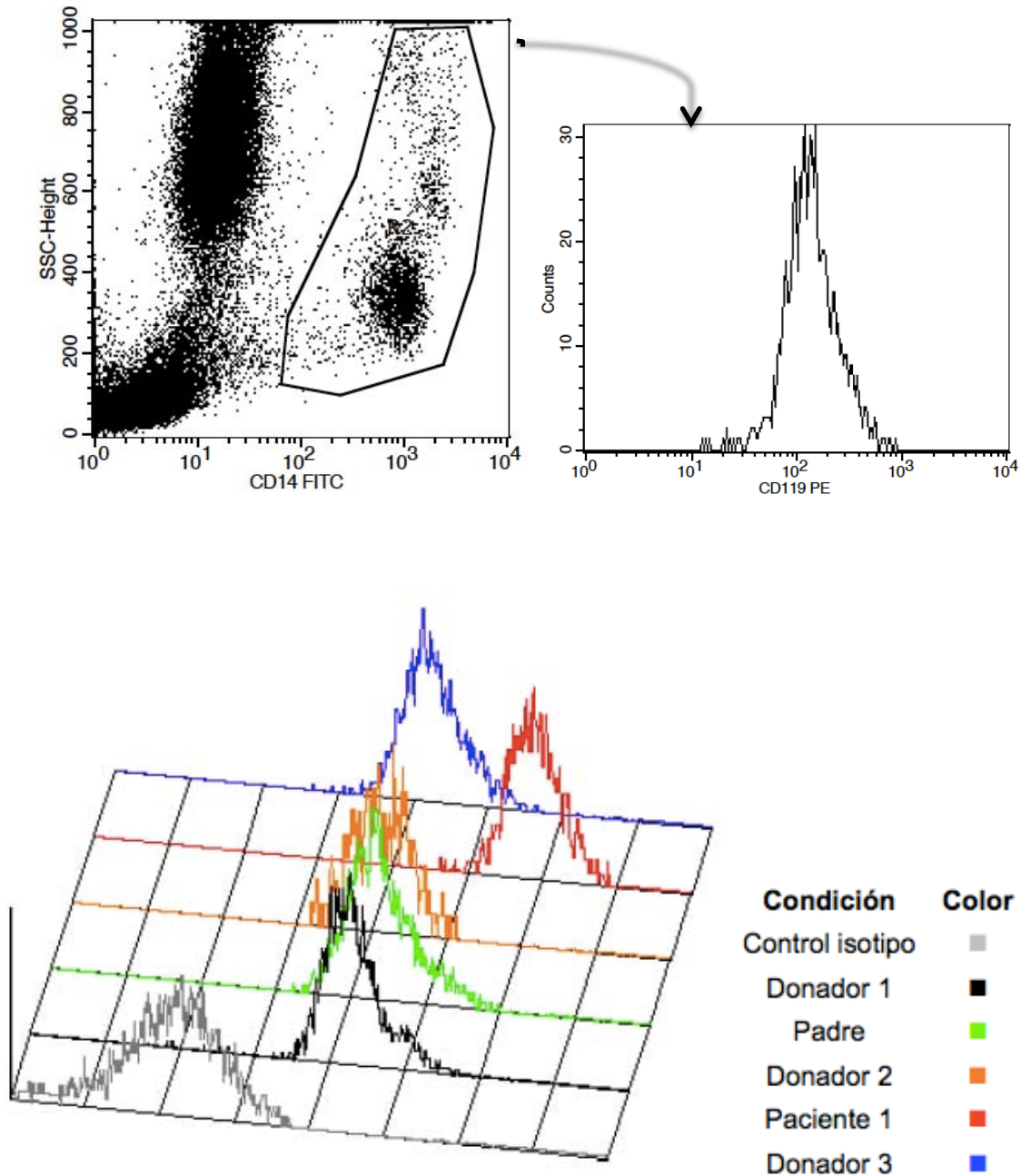


Figura 7. Expresión de CD119 (IFN $\gamma$ R1) en células CD14+ de tres donadores sanos (negro, naranja y azul), paciente 1 (rojo) y padre del paciente 1 (verde). Las CMN del paciente y testigos se incubaron con anticuerpos anti-CD14FITC y anti-CD119PE y se analizaron por citometría de flujo.

Los resultados anteriores apoyaron la posibilidad de que el paciente podía tener una mutación en el IFN- $\gamma$ R, por lo tanto se realizó la secuenciación para los genes de la cadena 1 y la cadena 2 del IFN- $\gamma$ R, aunque antes también se hizo la secuenciación para Stat-1, la cual se encontró normal para el paciente. La secuenciación del IFN- $\gamma$ R se hizo para los genes completos (*IFNGR1* e *IFNGR2*,



en total se secuenciaron los 14 exones para los genes de las dos cadenas del IFN- $\gamma$ R). En esa secuenciación se encontró una mutación heterocigota en el exón 6 de *IFNGR1*. La mutación corresponde a una delección de una timina en la posición 805 (805delT) del *IFNGR1* (Figura 8). La mutación no se encontró en la madre, padre o hermana del paciente, por lo que la evidencia indica que se trata de una mutación *de novo* (Figura 8).

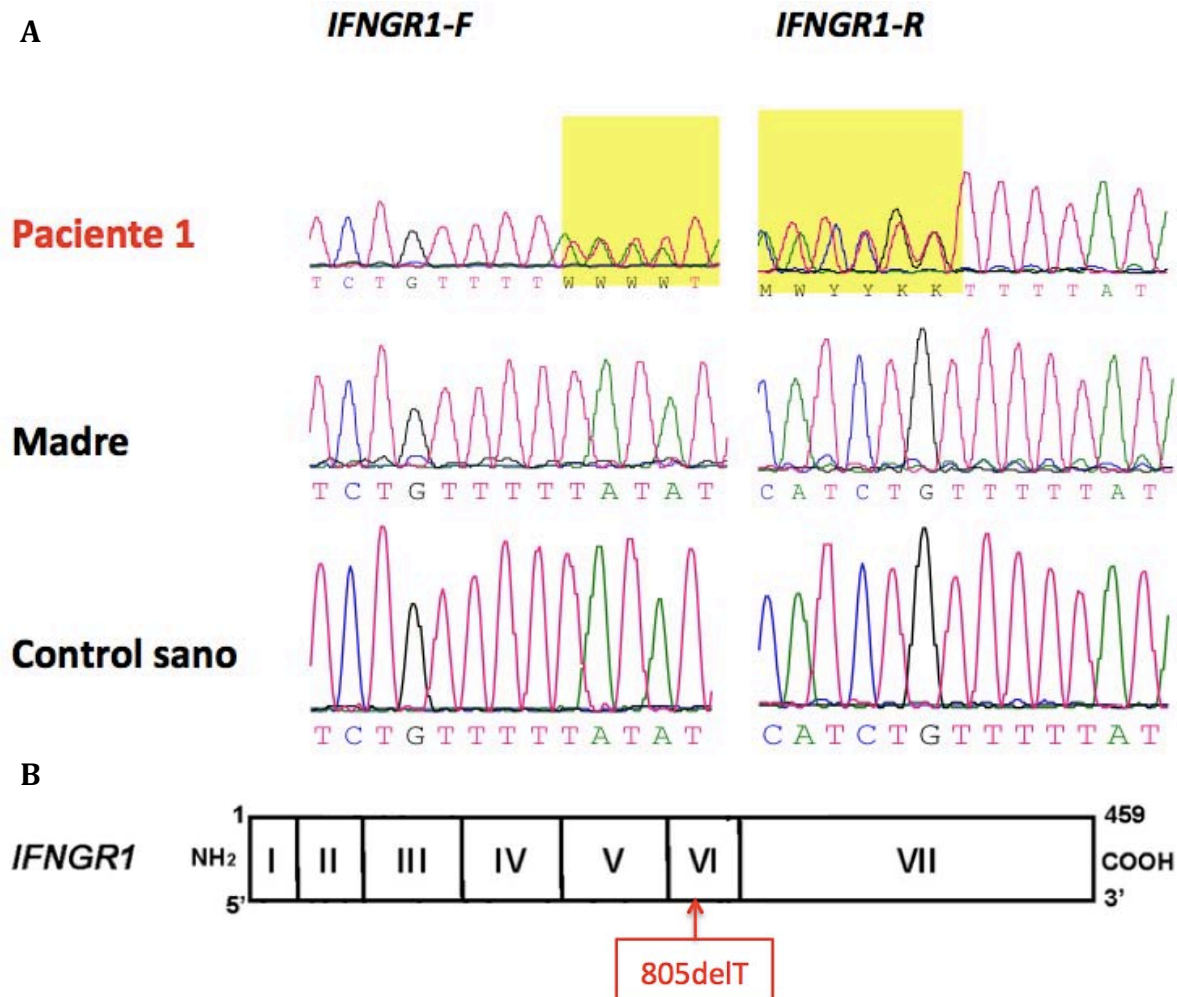


Figura 8. La secuenciación del *IFNGR1* mostró una mutación en el exón 6 en el paciente 1. **A**, Electroferograma de la secuenciación del gen de *IFNGR1* (*F*=*Forward*, *R*=*Reverse*) del paciente, su madre y un control; en el área sombreada de amarillo se indica el sitio de la mutación encontrada. **B**, Esquema del *IFNGR1*; la mutación que se encontró en el paciente se localiza en el exón 6, de *IFNGR1*, se detectó una delección de una timina en la posición 805 (805delT). A=adenina, C=citosina, G=guanina, K=guanina o timina, M=adenina o citosina, T=timina, W=adenina o timina, Y=citosina o timina.

## Paciente 2.

El estudio de la paciente 2 se hizo de manera similar al del Paciente 1. Inicialmente, se determinó la producción de IFN- $\gamma$  y la respuesta a IL-12, y se encontró que las células de la paciente respondieron a la estimulación con BCG, sintetizaron IFN- $\gamma$  y aumentó al coestimular con BCG+IL-12 (Figura 9).

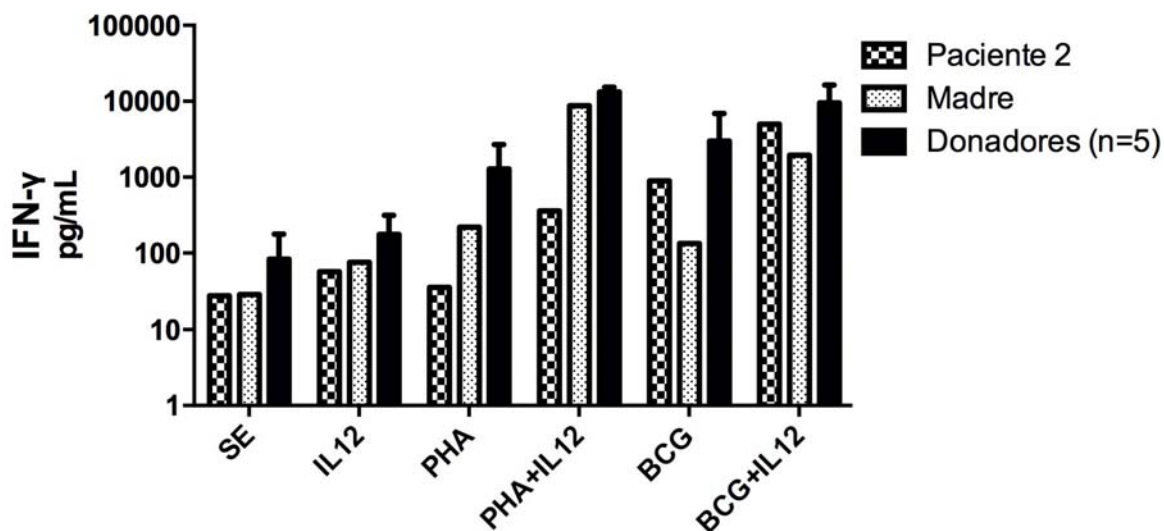


Figura 9. Producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a BCG y BCG+IL-12 por células del Paciente 2. Las muestras de sangre se diluyeron 1:2 con RPMI 1640 simple, se estimularon con: sin estímulo, 20 ng/mL de IL-12, 10  $\mu$ g/mL de PHA, 10  $\mu$ g/mL de PHA + 20 ng/mL de IL-12, BCG ó BCG + 20 ng/mL de IL-12. Se probó en los sobrenadantes de 48 horas, por ELISA, la concentración de IFN- $\gamma$  producido por las células en las muestras de sangre. Simultáneamente, se probaron muestras de sangre de la paciente, su madre y de donadores sanos (n=5). Se muestran las medias con desviación estándar. El gráfico se realizó en el programa GraphPad Prism versión 6.

La determinación de la expresión del IL-12R (cadenas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2) en blastos T estimulados con PHA por 3 días fue normal, mostró una expresión comparable a las células del padre de la paciente y a otro testigo sano (Figura 10). Para el análisis de las cadenas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 del IL-12R, se estimularon las CMN con PHA por 3 días, se recuperaron y se realizó una tinción para citometría de flujo. Se adquirieron las células en el citómetro, analizando primero en un gráfico de tipo *dot plot* de granularidad contra CD3PerCP y se seleccionó a la población de células CD3+, luego se evaluó la expresión de ambas cadenas del IL-12R mediante histogramas separados, y se compararon con los controles de isotipo (Figura 10). Estos resultados sugirieron que la paciente no tenía problemas con el IL-12R, por lo que el defecto tenía que buscarse en otra vía de activación y señalización, del eje IL-12/IFN $\gamma$ .



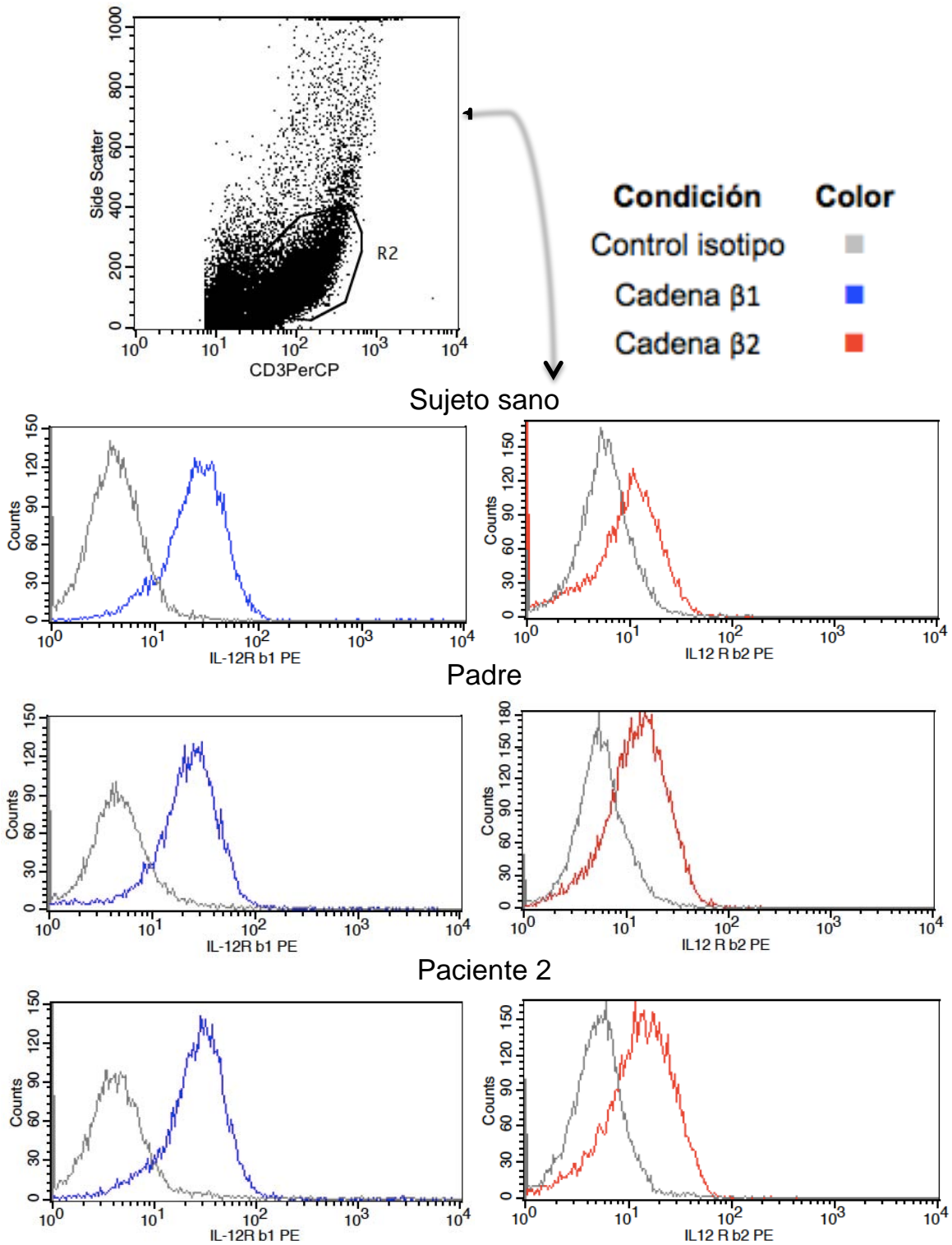


Figura 10. Expresión de las cadenas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 del receptor de IL-12 en células CD3<sup>+</sup> estimuladas con PHA. Las CMN de un testigo sano, del padre y de la paciente 2 se estimularon con PHA por 3 días, luego se recuperaron las células y se les realizó una tinción con anticuerpos anti-CD3, anti-IL-12 $\beta$ 1 y anti-IL-12 $\beta$ 2 para citometría de flujo.

Al estudiar la producción de IL-12 y la respuesta a IFN- $\gamma$  en sangre total diluida 1:2 con RPMI 1640, se encontró primero una producción baja de IL-12p40 en respuesta a BCG y hubo un aumento relativamente mayor en la coestimulación con BCG+IFN- $\gamma$  a dosis bajas, mientras que con dosis altas de IFN- $\gamma$  no se observó una producción tan elevada como en los controles (Figura 11A). Sin embargo, al medir la cantidad de IL-12p70 en los mismos sobrenadantes, se encontró que la producción de IL-12p70 se incrementó en las células de la paciente en relación con las células de donadores sanos (Fig. 11B).

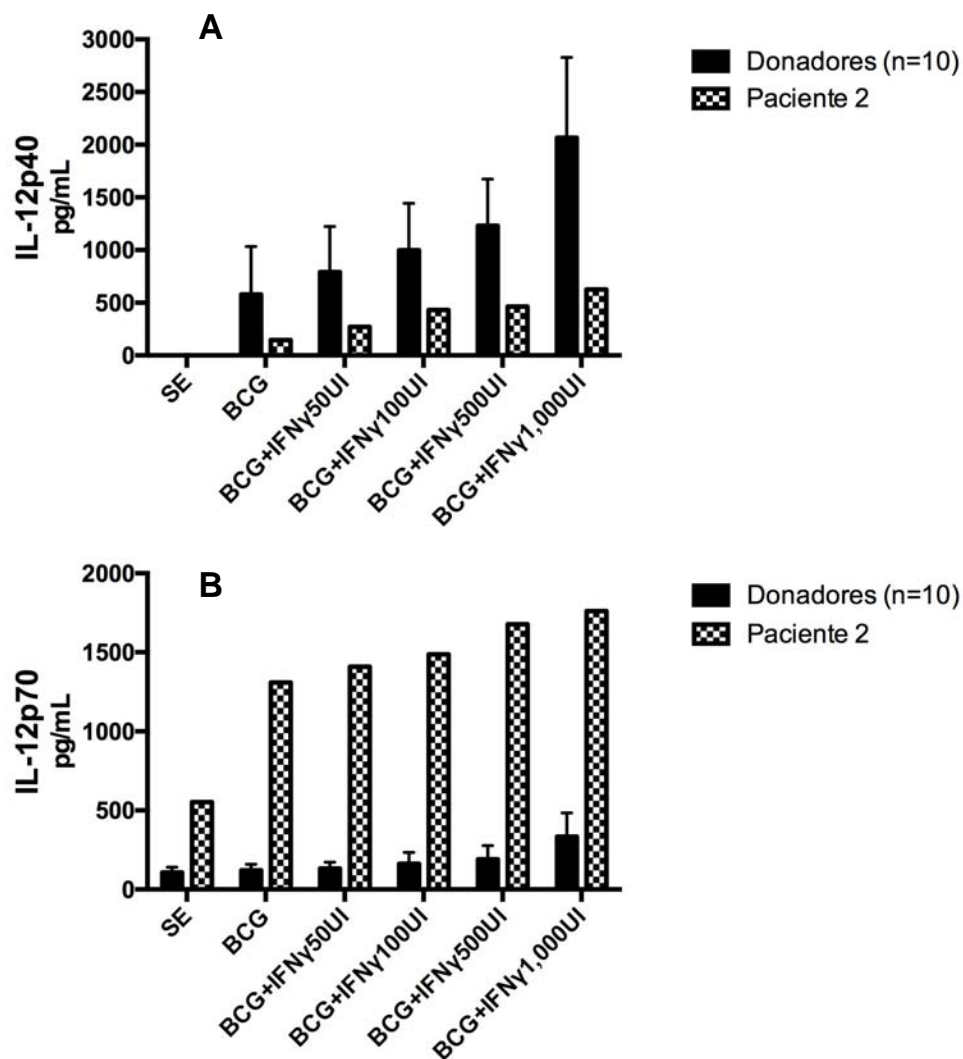


Figura 11. Respuesta a IFN- $\gamma$  evaluada mediante la producción de IL-12p40 (A) e IL-12p70 (B). Sangre total periférica (diluida 1:2 con RPMI simple) de la paciente, la madre y de donadores (media, n=10), se estimularon con: sin estímulo, BCG, BCG + 50UI de IFN- $\gamma$ , BCG + 100UI de IFN- $\gamma$ , BCG + 500UI de IFN- $\gamma$  ó BCG + 1,000UI de IFN- $\gamma$ . La concentración de IL-12p40 e IL-12p70 se determinó por ELISA en sándwich en sobrenadantes de 48 horas de los cultivos. Se muestran las medias con desviación estándar. El gráfico se realizó en el programa GraphPad Prism versión 6.

Al evaluar la respuesta a IFN- $\gamma$  por la producción de IL-12, encontramos que la producción de IL-12p40 es menor, pero al evaluar la producción de IL-12p70 vimos que es mayor la concentración de esta citocina en la sangre de la paciente en comparación con los controles. Esto se puede explicar, debido a que la forma activa, IL-12p70, se compone de las subunidades p40 y p35, y al haber una mayor producción de la subunidad p35 da origen a la forma activa que es IL-12p70, por lo tanto la subunidad p40 libre es menor en la sangre de la paciente que en los donadores.

Por otra parte, también se determinó TNF- $\alpha$  en los mismos sobrenadantes. Se detectó un aumento en la producción de TNF- $\alpha$  en respuesta a IFN- $\gamma$ , (en la coestimulación con BCG+IFN- $\gamma$  respecto a sólo BCG) aunque los niveles de respuesta de la muestra de la paciente, fueron relativamente menores, respecto a los controles (Figura 12).

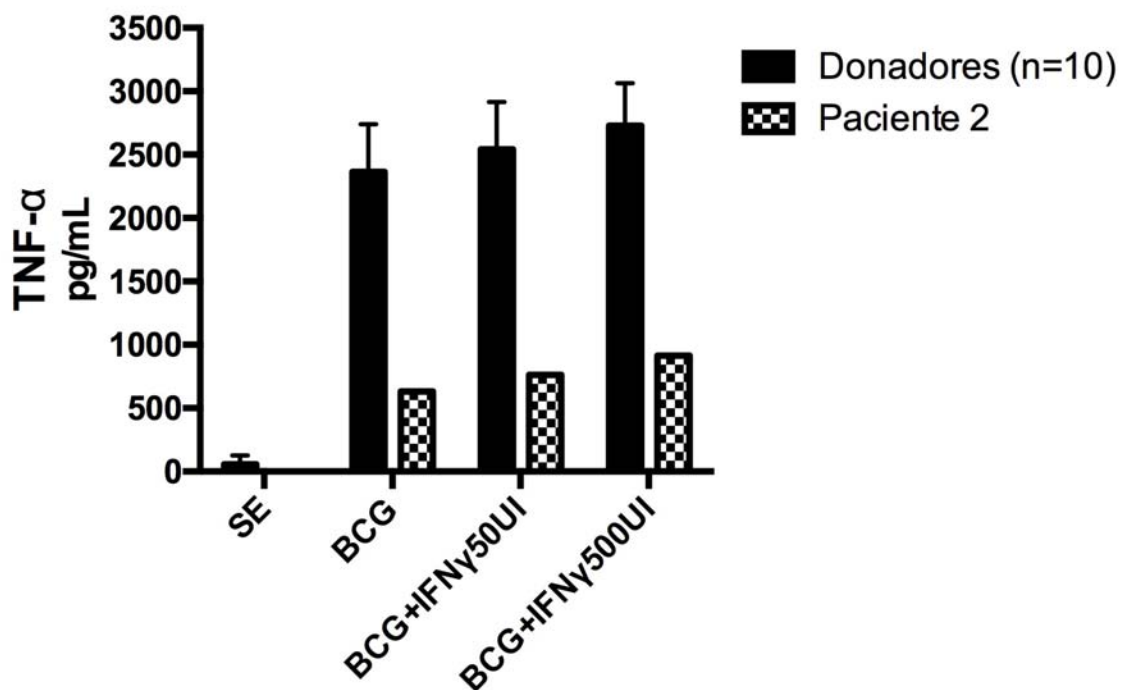


Figura 12. Evaluación de la funcionalidad del IFN-gR mediante la producción de TNF- $\alpha$ . Las muestras de sangre de la paciente, su madre y donadores (media, n=10) se estimularon con BCG, BCG + 50UI de IFN- $\gamma$  y BCG + 500UI de IFN- $\gamma$  por 48 horas y se determinó la producción de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de cultivo. Se muestran las medias con desviación estándar. El gráfico se realizó en el programa GraphPad Prism versión 6.

Para esta paciente, los resultados de la respuesta a IFN- $\gamma$  no fueron claros porque por una parte había una mayor producción de IL-12p70 en comparación con los sujetos sanos (Figura 11B), mientras que las concentraciones de IL-12p40 y TNF- $\alpha$  fueron más bajas en las células de la paciente en comparación con las células de los sujetos sanos (Figura 11A y Figura 12). Se han reportado casos de pacientes con mutaciones de ganancia de función en Stat-1 que ocasionan una mayor producción de IL-12p70<sup>72,82,83</sup>; con el hallazgo de una producción elevada de IL-12p70 (Figura 11A), decidimos realizar una tinción de CF para detectar la fosforilación de Stat-1 en CMN de la paciente 2, su familia y un control sano (Figura 13). Para la estrategia de análisis, se adquirieron las células con un gráfico de tipo *dot plot* de granularidad contra CD14FITC, se seleccionaron las células CD14+, para luego evaluar la fluorescencia correspondiente de pStat-1 en esas células CD14+ mediante un histograma y finalmente con un histograma de tipo *Overlay* se graficaron las diferentes condiciones para cada sujeto (Figura 13).

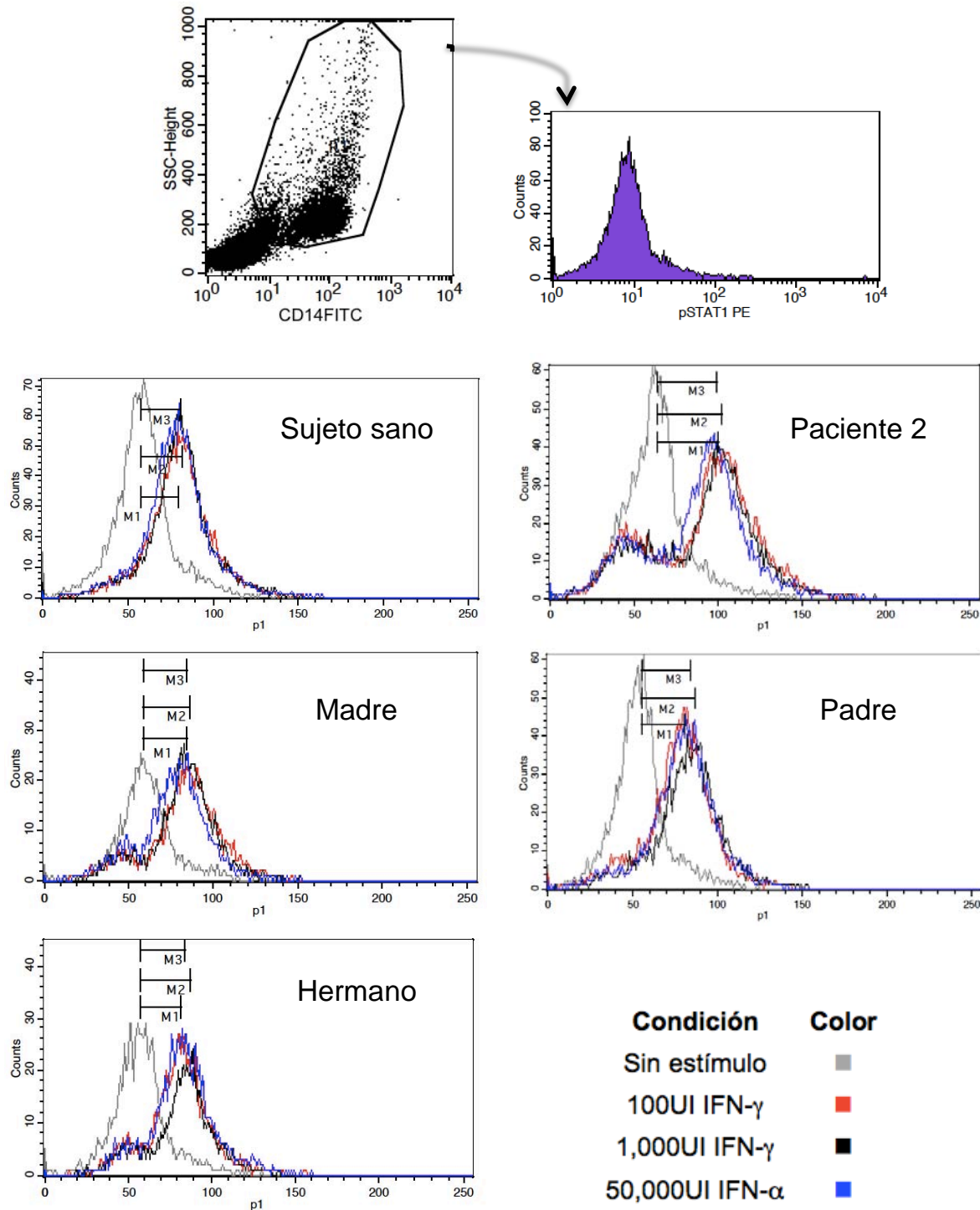


Figura 13. Fosforilación de Stat-1 en CMN estimuladas con 100UI IFN- $\gamma$ , 1,000UI de IFN- $\gamma$  o 50,000UI de IFN- $\alpha$ . Las CMN de un control sano, de la paciente y su familia, se estimularon por 30 minutos con con IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ , se fijaron, se tiñeron con un anticuerpo anti-CD14 y se procesaron para detectar pStat-1 intracelularmente por citometría de flujo. M1 = rango de sín estímulo a 100UI de IFN- $\gamma$ , M2 = rango de sin estímulo a 1,000UI de IFN- $\gamma$ , M3 = rango de sin estímulo a 50,000 UI de IFN- $\alpha$ .

Con base en la intensidad media de fluorescencia de los histogramas obtuvimos los índices de estimulación (Tabla 2) en donde observamos que las células de la paciente tienen un índice de estimulación mayor debido a que sus células presentan una mayor cantidad de pStat-1.

	Control	Madre	Padre	Hermano	Paciente 2
IFN- $\gamma$ 100UI	2.01	1.71	2.4	2.32	3.63
IFN- $\gamma$ 1,000UI	1.98	1.57	2.94	2.44	3.64
IFN- $\alpha$ 50,000UI	2.01	1.33	2.6	2.6	3.02

Tabla 2. Índices de estimulación para la fosforilación de Stat-1 en CMN de la Paciente 2, su madre, su padre, hermano y un control sano, en respuesta a IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ . Los índices se calcularon a partir de histogramas de citometría de flujo (Figura 12) dividiendo la intensidad media de fluorescencia para Stat-1PE de células estimuladas con IFN- $\gamma$  o IFN- $\alpha$  entre la intensidad media de fluorescencia para Stat-1PE de células sin estimular.

Para corroborar lo que encontramos mediante CF, decidimos probar por *Western blot* la fosforilación de Stat-1, en extractos nucleares de LCL-VEB (Figura 14).

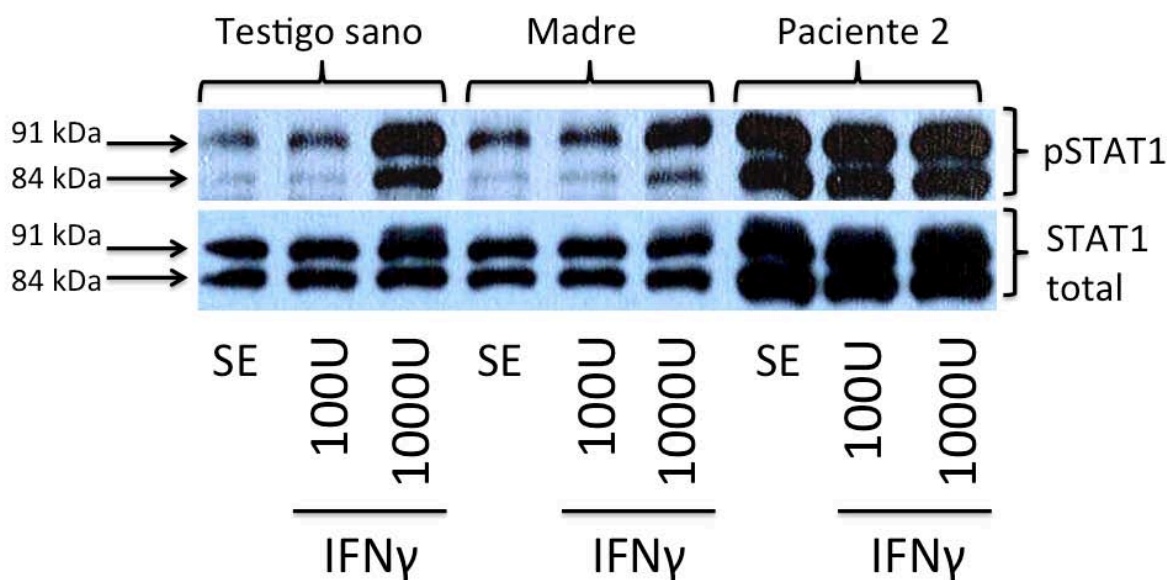
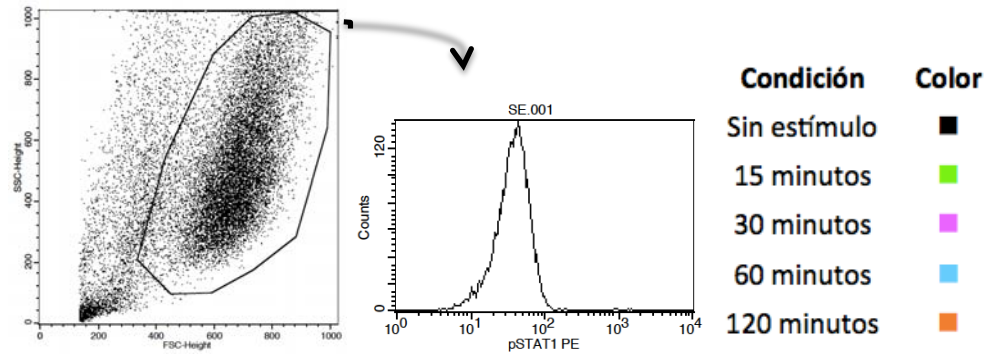


Figura 14. Fosforilación de Stat-1 en extractos nucleares obtenidos a partir de LCL-VEB de la paciente, su mamá y un control sano. Las células se estimularon por 15 minutos con dos cantidades distintas de IFN- $\gamma$  y se determinó la fosforilación de Stat-1 por *Western blot*. SE = sin estímulo. Se utilizó el programa ImageJ64 para la edición de las películas de *Western blot*.

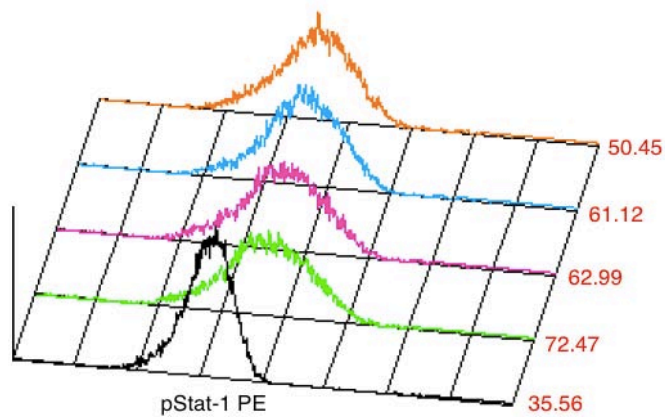
En estos experimentos encontramos que las LCL-VEB del papá de la paciente y las del testigo sano responden adecuadamente al estímulo con IFN- $\gamma$  (100 y 1,000UI), aumentando la fosforilación de Stat-1. En contraste, la LCL-VEB de la paciente presentó mayor fosforilación en Stat-1, tanto en las células sin estimular, como en las estimuladas con 100 y 1,000UI de IFN- $\gamma$ . Estos resultados indicaron que existe una hiperfosforilación en Stat-1 en las células de la paciente que se puede deber a alguna alteración en IFN- $\gamma$ R o en el propio Stat-1.

Se sabe que Stat-1 tiene una cinética de fosforilación y desfosforilación durante la activación celular y que existen las formas de Stat-1 y pStat-1 tanto en citoplasma como en el núcleo. Para probar la cinética de la fosforilación de Stat-1 en las células de la paciente, las LCL-VEB de la paciente y de líneas celulares del control se estimularon con 1,000UI de IFN- $\gamma$  y se cosecharon a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos para determinar a pStat-1 intracelular por CF (Figura 15). Para el análisis de las células LCL-VEB se realizó un gráfico de tipo *dot plot* de tamaño contra granularidad, en donde se seleccionó a la población de interés con una ventana. A partir de esa ventana, se graficó un histograma y se analizó la fluorescencia de interés (pStat-1 PE). Esto se realizó para todos los tubos y finalmente se graficaron los histogramas sobrelapados para su análisis. En la figura 15 se observa que las células LCL-VEB del testigo sano aumentaron la fosforilación de Stat-1 (aumento de la fluorescencia) a los 15 minutos de estimulación con IFN- $\gamma$  y después la fosforilación de Stat-1 disminuyó paulatinamente hasta los niveles iniciales a los 120 minutos de incubación, esto ocurre por la acción de las fosfatasas en el núcleo que desfosforilan a Stat-1. En contraste las células de la paciente se fosforilaron a los 15 minutos y esa fosforilación (medida por la media geométrica de la intensidad de fluorescencia para Stat-1PE) se mantuvo hasta los 120 minutos, lo que indica que Stat-1 no se desfosforila como ocurre normalmente en el testigo sano que se mostró aquí. Estos resultados indicaron que en la paciente muy probablemente había un defecto (mutación) en Stat-1 que se hiperfosforila en respuesta a IFN- $\gamma$  y que ese estado de hiperfosforilación se conserva en las células de la paciente.





Sujeto sano



Paciente 2

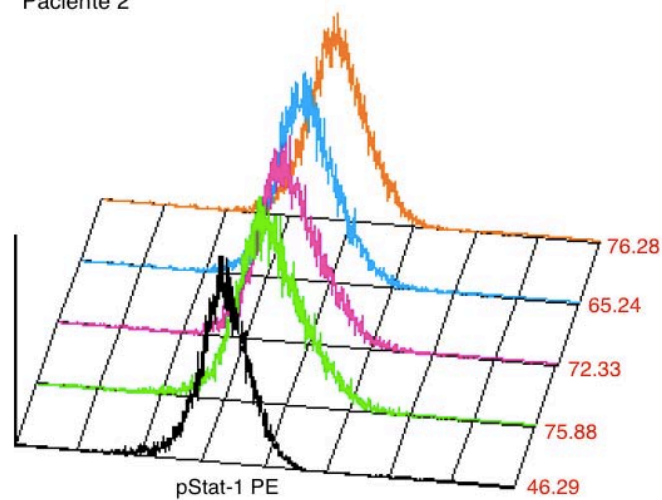


Figura 15. Cinética de fosforilación de Stat-1 en células LCL-VEB de un control sano y de la paciente en estudio. Las células LCL-VEB de un control y de la paciente se estimularon en cultivo con 1,000UI de IFN- $\gamma$  por los tiempos señalados y se detectó pStat-1 intracelularmente mediante citometría de flujo. Los números rojos de los histogramas corresponden a los valores de la Media Geométrica de Fluorescencia para pStat-1 en los tiempos correspondientes.



Para probar si Stat-1 era resistente a la desfosforilación utilizando un inhibidor de cinasas, se utilizó el inhibidor competitivo estaurosporina (Sta). En estos experimentos se estimularon las células LCL-VEB con 1,000UI de IFN- $\gamma$  por 30 minutos y enseguida se incubaron con Sta por diferentes tiempos para inhibir la fosforilación de Stat-1 por la unión al sitio de anclaje del ATP a las cinasas que fosforilan a Stat-1 (Jak1 y Jak2). La fosforilación de Stat-1 se probó por WB. Se observó que en los extractos nucleares de células LCL-VEB de la paciente existe una hiperfosforilación de Stat-1, que permanece a pesar del tratamiento con Sta, a diferencia de las células del control sano, en donde Stat-1 se desfosforila (Figura 16). Esto nos sugiere que pStat-1 permanece en el núcleo porque la fosfatasa no puede actuar, debido a la mutación en Stat-1, por lo tanto, se impide la desfosforilación y la capacidad de Stat-1 para reciclarse hacia el citoplasma, en estado desfosforilado. De tal manera que existe una constante transcripción de los genes inducidos por pStat-1. La resistencia a la inhibición de la fosforilación de Stat-1 en las células de la paciente ocurrió tanto para el citoplasma como para los extractos nucleares de las células, como se puede ver en la misma figura 15.

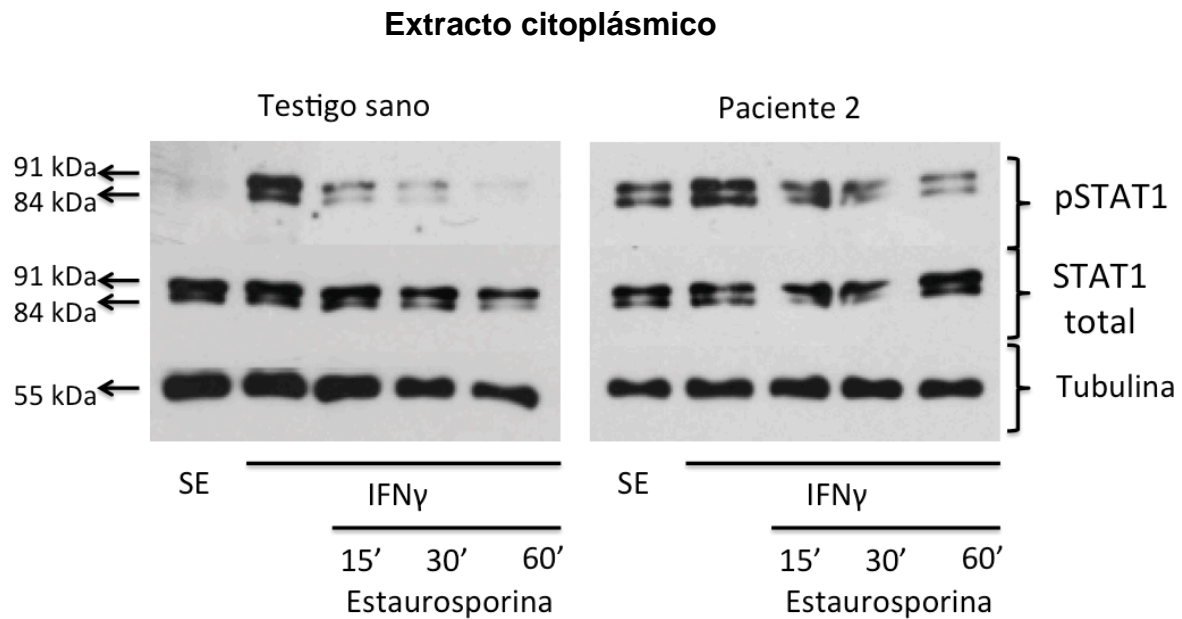
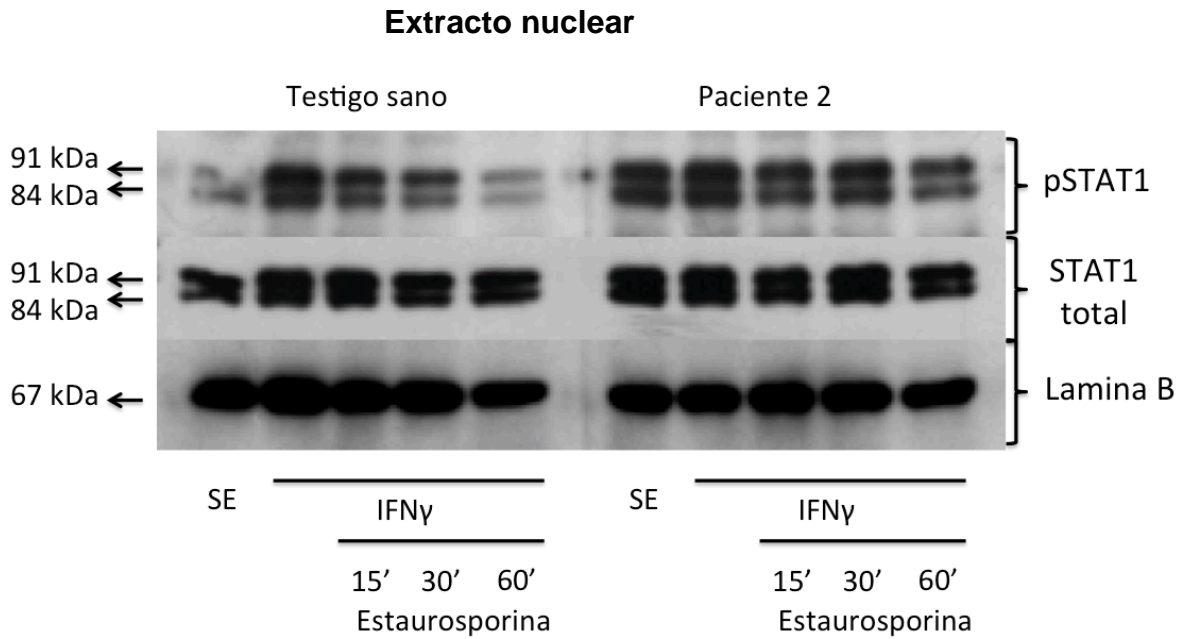


Figura 16. Ensayo de inhibición de la fosforilación de Stat-1, con estaurosporina. Las células LCL-VEB de la paciente 2 y de un testigo sano se estimularon por 30 minutos con 1,000UI de IFN- $\gamma$ , después se incubaron con 1 $\mu$ M de estaurosporina por 15, 30 ó 60 minutos, y se analizó la presencia de pStat-1 en extractos nucleares o citoplásmicos, por *Western blot*. SE = sin estímulo. Se utilizó el programa ImageJ64 para la edición de las películas de *Western blot*.

Para cuantificar la desfosforilación de Stat-1, las películas de WB de los extractos nucleares de la figura 16, se analizaron por densitometría en un equipo

fotodocumentador Kodak A-38, con el que se midió la intensidad relativa de las bandas que se graficaron como se muestra en la figura 17.

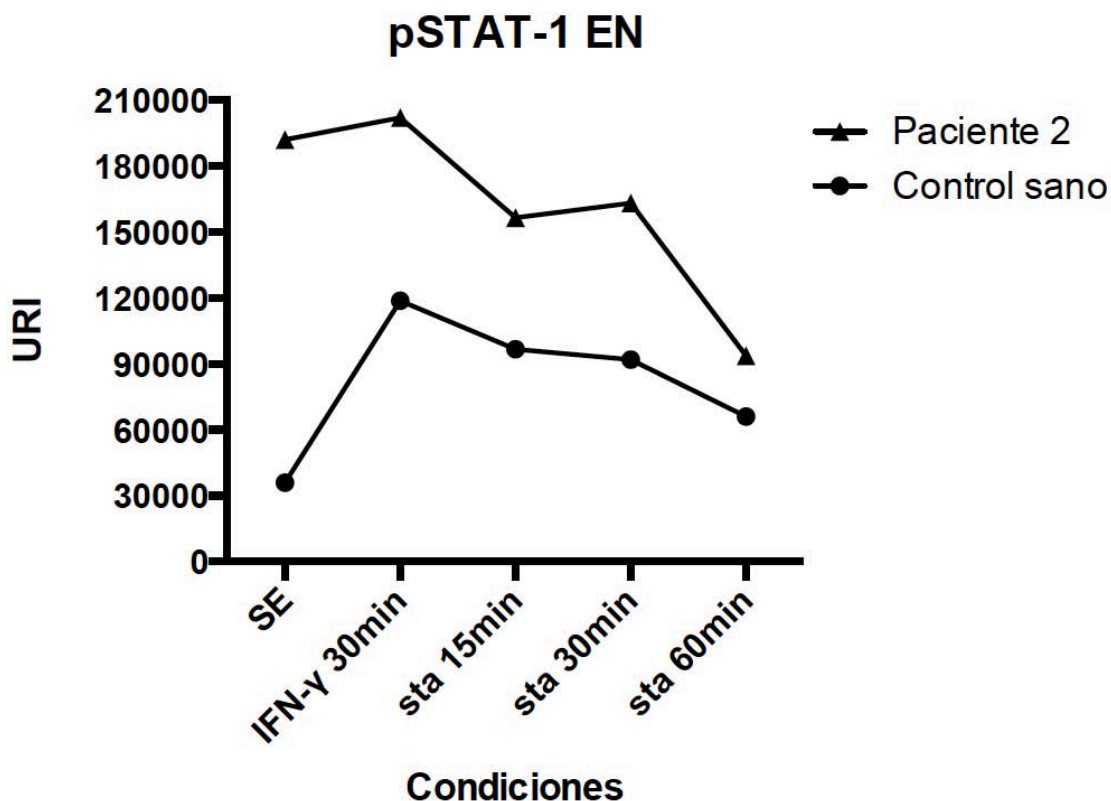
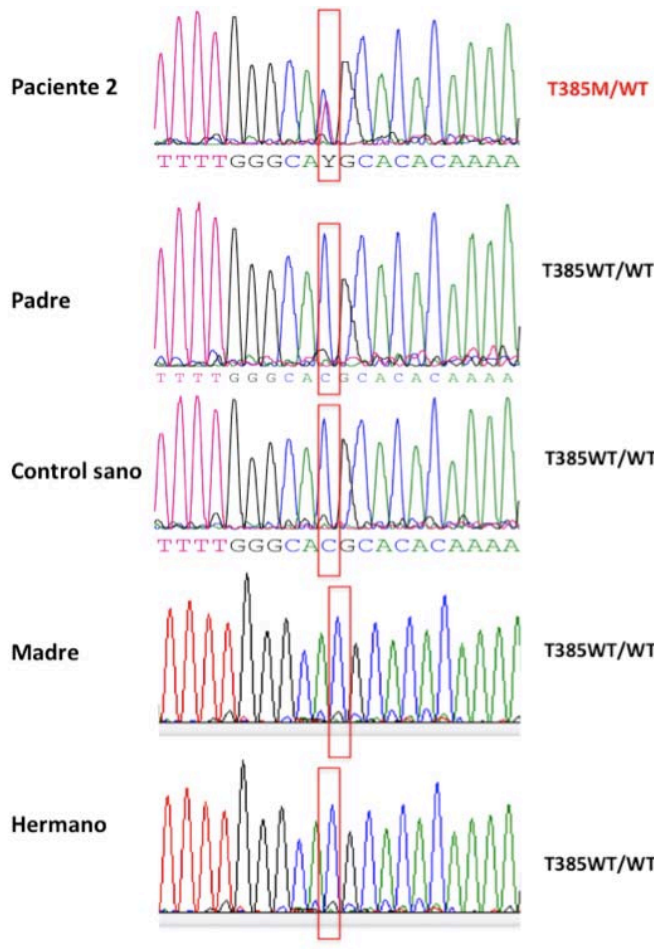


Figura 17. Densitometría de las bandas de pStat-1 en extractos nucleares detectadas por *Western blot* de la figura 16. pStat-1 = Stat-1 fosforilado, EN = extracto nuclear, SE = sin estímulo, sta = estaurosporina, URI = unidad relativa de intensidad. Las intensidades relativas se obtuvieron en un fotodocumentador Kodak A-38. El gráfico se realizó en el programa GraphPad Prism versión 6.

Los resultados anteriores muestran que en la paciente el sistema del receptor para IFN- $\gamma$  y el factor de transcripción, Stat-1, funcionan de manera distinta que en el control sano, además de que Stat-1 se encuentra en un estado hiperfosforilado y es resistente a la defosforilación. Para encontrar la causa de este comportamiento anómalo, se secuenciaron los genes *IFNGR1*, *IFNGR2* y *STAT1*. Los genes para el IFN- $\gamma$ R de la paciente resultaron normales. En la secuenciación del DNA de la paciente se encontró una mutación heterocigota en el exón 14 de *STAT1*, solamente en la paciente, pero no en la madre, en el padre, el hermano ni en el testigo sano; la mutación encontrada produce una sustitución de una treonina por una metionina en la posición 385 (T385M), del dominio de unión al DNA en Stat-1 (Figura 18) y se trata de una mutación *de novo*.

**A**



**B**

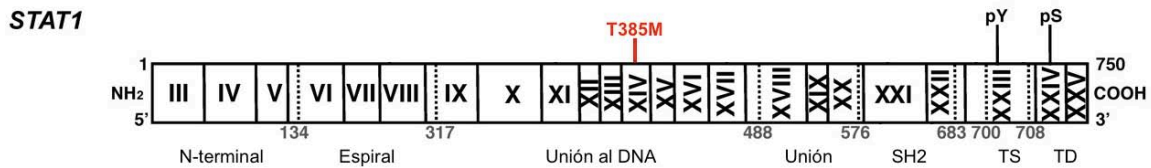


Figura 18. La secuenciación del *STAT-1* mostró una mutación en el exón 14 en la paciente 2. **A**, Electroferograma de la secuenciación del gen de *STAT1* de la paciente, su familia y un control sano; en los rectángulos rojos se indica el sitio de la mutación encontrada y a la derecha se indica el fenotipo de la proteína Stat-1 para cada individuo. **B**, Esquema del gen *STAT1*; la mutación que se encontró en la paciente se localiza en el exón 14, dentro del dominio de unión al DNA de la proteína, es una sustitución de una treonina por una metionina en la posición 385. WT = genotipo silvestre. A=adenina, C=citosina, G=guanina, T=timina, Y=citosina o timina.

## 7. DISCUSIÓN.

En este trabajo se estudiaron a dos pacientes con infecciones persistentes y recurrentes por *Mycobacterium spp* y por *Candida albicans*, con el fin de determinar la etiología que explique su condición de inmunodeficiencia, así como apoyar el diagnóstico. Estos dos pacientes presentaban una respuesta diferente *in vitro* ante la estimulación con IFN- $\gamma$  y se encontraron diferentes mutaciones, en un paciente en *IFNGR1* y en la otra paciente en *STAT1*.

Las mutaciones en *IFNGR1* producen inmunodeficiencia y se pueden heredar con formas dominantes o recesivas. Las formas recesivas en *IFNGR1* producen la pérdida en la respuesta celular a IFN- $\gamma$ , debido a las mutaciones que evitan la expresión del IFN- $\gamma$ R1 en la membrana celular y/o el reconocimiento con su ligando (IFN- $\gamma$ ). Las formas dominantes de las mutaciones en el *IFNGR1*, se deben a truncamientos en el dominio citoplásmico de la proteína que da como resultado la acumulación de proteínas IFN- $\gamma$ R1 no funcionales que impiden el funcionamiento de moléculas IFN- $\gamma$ R1 normales, codificadas por alelos silvestres, lo que lleva a una respuesta celular disminuida a IFN- $\gamma$ , a pesar de tener una mayor expresión en la membrana celular de IFN- $\gamma$ R1<sup>152</sup>.

Por otra parte, se ha detectado mediante ensayos de retardo en la movilidad electroforética (*EMSA*, por sus siglas en Inglés) que las células de los pacientes con mutaciones dominantes en IFN- $\gamma$ R1 pueden formar el complejo Stat-1 + Secuencia activada por Gamma, aunque la expresión del complejo no es de la misma magnitud que en controles sanos, sin embargo, los pacientes con mutaciones recesivas en IFN- $\gamma$ R1 no pueden formar este complejo<sup>88</sup>.

Ambas formas autosómicas de las mutaciones en *IFNGR1* (las recesivas y las dominantes), se caracterizan porque los pacientes presentan infecciones por micobacterias ambientales e infección por BCG cuando son vacunados. Sin embargo, los pacientes que tienen mutaciones recesivas en *IFNGR1* presentan infecciones por micobacterias ambientales como: *M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. kansasii* y *M. avium*, mientras que los pacientes con mutaciones dominantes en IFN- $\gamma$ R1 presentan infecciones principalmente por *M. avium*. En el caso de los pacientes con mutaciones recesivas en IFN- $\gamma$ R1 (con respuesta nula a IFN- $\gamma$ ), las infecciones por micobacterias suelen presentarse a temprana edad y de forma muy agresiva, lo que hace que tengan una sobrevivencia baja en comparación a los paciente con mutaciones dominantes en IFN- $\gamma$ R1. Los pacientes con mutaciones dominantes en IFN- $\gamma$ R1 tienen una función parcial o residual del receptor para IFN- $\gamma$ , probablemente esto puede ayudar a los pacientes a que tengan una mayor

sobrevivencia que los pacientes con mutaciones recesivas<sup>57,70,88,95,152</sup>.

En el paciente 1, encontramos una mutación en el exón 6 del *IFNGR1*, (805delT) que probablemente es responsable de la susceptibilidad a las infecciones que ha presentado por BCG y *M. bovis* (no BCG); dicha mutación causa un cambio en el marco de lectura, lo cual produce un codón de paro prematuro<sup>153</sup>. La mutación sólo se presentó en el paciente y estuvo ausente en el padre, la madre y la hermana, por lo que se trata de una mutación en *IFNGR1* *de novo*, cuya condición heterocigota y la presentación clínica, son consistentes con otros casos similares de mutaciones autosómicas dominantes reportadas en la literatura<sup>88,152,153</sup>. Las características clínicas del paciente estudiado aquí en relación a la mutación que presenta, coinciden con lo reportado en la literatura en que los pacientes con mutaciones autosómicas recesivas en el gen *IFNGR1* padecen de infecciones por BCG y por micobacterias ambientales de baja virulencia<sup>86</sup>; el paciente tuvo infección recurrente por BCG, y en otro momento de su historia clínica tuvo infección por *M. bovis* (no BCG) que le causó una fuerte infección diseminada en pulmones y en huesos. La infección que el paciente tuvo por *Candida parapsilosis*, probablemente fue adquirida intrahospitalariamente y en relación a infecciones por hongos en estos pacientes solamente se ha encontrado infección por *H. capsulatum* en pacientes con mutación en *IFNGR1*<sup>105</sup>. Recientemente, se publicó el caso clínico de un paciente con la mutación 805delT en *IFNGR1* con infección pulmonar y osteomielitis por *M. intracellulare* (micobacteria ambiental de baja virulencia), con buena respuesta a los antimicrobianos; en ese paciente la expresión del receptor para IFN- $\gamma$  se encontró aumentada en monocitos<sup>153</sup>. En el paciente estudiado aquí con esa misma mutación también observamos una expresión aumentada del receptor IFN- $\gamma$ R1 (CD119, figura 7); como ya se mencionó, la mutación 805delT produce un codón de paro prematuro cercano al dominio intracelular y se expresa un receptor truncado que carece de los dominios intracelulares y como parte de un posible mecanismo de compensación de la respuesta inducida por IFN- $\gamma$ , el receptor se expresa en mayor cantidad en las células del paciente que en las células de los sujetos sanos, por lo tanto, las células del paciente no tendrán una exitosa señalización en la vía Jak-Stat. Por otra parte no sabemos si la infección por VPH en los brazos y tórax del paciente se deban a una susceptibilidad a la infección viral por la mutación encontrada en *IFNGR1*. En el paciente estudiado en este trabajo, la mutación en *IFNGR1*, impide la respuesta a IFN- $\gamma$ , que conduce a una señalización sin éxito para la activación de Stat-1 (Figura 6) y por lo tanto, una deficiente producción de IL-12p40 (Figura 3).

En el caso de la paciente 2, la mutación que encontramos fue en Stat-1 (T385M, sólo en un alelo, es decir, heterocigota), una mutación de ganancia de

función; esta mutación se ha descrito en dos trabajos, uno publicado en el año 2012<sup>150</sup> y el segundo en el 2014<sup>143</sup>, el mismo año en el que se determinó la mutación en la paciente. Ésta mutación que se detectó en el dominio de unión al DNA en Stat-1, se ha relacionado con infecciones persistentes por *C. albicans*, principalmente en mucosa oral. Otras características clínicas observadas en pacientes con esa mutación son retraso en el crecimiento durante la niñez y la pubertad, y anomalías en desarrollo dental por falta de esmalte<sup>143</sup>. Takezaki, *et al*, describieron que la treonina 385 de Stat-1 es un sitio evolutivamente conservado entre diferentes especies<sup>150</sup>. Se ha sugerido que la mutación confiere incapacidad a Stat-1 para desfosforilarse<sup>150</sup>, pero también se piensa que la mutación anula la disociación con el DNA<sup>143</sup>, en ambos casos se dificulta la exportación de Stat-1 desde el núcleo hacia el citoplasma. Nuestros resultados en los experimentos con las células de la paciente mostraron la fosforilación persistente de Stat-1 (Figura 13) y su acumulación en el núcleo (Figura 14). Además, que la mutación T385M se ha presentado *de novo*, ya que su familia de primera línea no la presenta (madre, padre y hermano); similarmente a la paciente estudiada en esta tesis, en otro trabajo se encontraron dos casos con la misma mutación *de novo* con diagnóstico de CMC<sup>150</sup>.

Como se mencionó anteriormente, la mutación T385M en Stat-1 se considera una mutación de GF por la fosforilación persistente en Stat-1 que induce una mayor producción de IL-12p70, como lo detectamos en nuestros experimentos (Figura 11B); otros grupos de investigadores también han reportado que este tipo de mutaciones provocan un aumento en la transcripción de los genes de CXCL9 y CXCL10, lo cual también se ha descrito para otras mutaciones de ganancia de función en Stat-1<sup>141,146,150,151</sup>. Por otro lado, se han realizado experimentos para estudiar la producción de IL-17 e IL-22, -estas citocinas participan en la inmunidad contra hongos- en pacientes con mutaciones de ganancia de función en Stat-1. Los experimentos han demostrado que existe una baja producción de IL-17 e IL-22 en los pacientes con esas mutaciones, además las células productoras de IL-17 e IL-22 se encuentran en menor proporción que en individuos sanos<sup>1,141,144</sup>. En el caso de la paciente estudiada aquí, no medimos la producción de IL-17 e IL-22, ni las células productoras de IL-17, pero si se considera que el mecanismo de la mutación es similar al de otras mutaciones en Stat-1 de ganancia de función estudiadas y reportadas en la literatura científica, es muy probable que la paciente estudiada en este trabajo tenga una deficiente producción de IL-17, esto explicaría la susceptibilidad a las infecciones persistentes por *C. albicans* observadas en la paciente.

Un punto importante de resaltar en el caso de la paciente estudiada a nivel molecular en este trabajo es que presentó una infección por *M. tuberculosis*, que

le ocasionó un absceso supraclavicular y una osteomielitis. La información de esta infección es importante y particular, ya que hasta la fecha no se han reportado infecciones por micobacterias en pacientes con mutaciones de ganancia de función en Stat-1. Finalmente, en distintos pacientes con mutaciones de ganancia de función en Stat-1 se han observado deficiencias en el desarrollo y crecimiento por hipotiroidismo o fallas en la función hepática, o desarrollo del esmalte de los dientes<sup>143,150</sup>. No se sabe de qué forma Stat-1 está involucrado en esas funciones, pero se trata de un factor de transcripción que participa, además de la respuesta inmune, en mecanismos de proliferación, diferenciación y apoptosis<sup>154</sup>.

La paciente estudiada aquí tiene 7 años de edad y es de talla pequeña, aunque los médicos que han seguido su desarrollo no consideran que tiene problemas o retraso en su crecimiento ni tiene hasta el momento, diagnóstico de hipotiroidismo; la otra característica clínica en esta paciente es la hepatitis crónica con altos niveles de alanino-aminotransferasa y aspartato.aminotransferasa, pero con pruebas serológicas negativas para distintas infecciones virales. No sabemos si estas anomalías hepáticas puedan estar relacionadas con la mutación encontrada en Stat-1.

La otra incógnita es si esta mutación se presenta en otros pacientes de la comunidad Oaxaqueña de la que es originaria la paciente, si fuera el caso, se deben estudiar las características clínicas y fenotípicas que presentan esos pacientes.

En conclusión, hemos identificado la falla genética que causa la inmunodeficiencia en dos pacientes; uno de ellos con mutación en *IFNGR1* y la otra paciente en *STAT1*. Estas mutaciones hacen a los pacientes susceptibles a infecciones persistentes y recurrentes de micobacterias y candidiasis.



## 8. CONCLUSIONES.

1. Se han identificado las causas genéticas que alteran la respuesta inmune en dos pacientes con infecciones recurrentes por *Mycobacterium spp* y por *C. albicans*.
2. La mutación heterocigota 805delT en *IFNGR1* encontrada en el paciente 1 produce un daño en la señalización (con deficiente fosforilación de Stat-1) a pesar de tener una alta expresión del IFN- $\gamma$ R1 en la superficie de las células. Este paciente con mutación tiene buen pronóstico de vida, a pesar de las infecciones por *M. bovis* o *M. tuberculosis*, siempre y cuando reciba la atención médica oportuna.
3. Se encontró una mutación heterocigota de ganancia de función en el dominio de unión al DNA en Stat-1 en una paciente con infección diseminada por micobacteria y CMC persistente. La mutación T385M en Stat-1 es de ganancia de función, la cual causa una fosforilación sostenida de Stat-1 y una mayor producción de IL-12p70 en respuesta a IFN- $\gamma$  en sangre periférica. La mutación presentada en la paciente es *de novo*. La mutación T385M en Stat-1 ocasiona que no se pierda la fosforilación en Y701 y altera la respuesta de IFN- $\gamma$  dando susceptibilidad a infecciones ocasionadas por *C. albicans* y micobacterias.
4. Los pacientes con infecciones recurrentes o persistentes por *Mycobacterium spp* o por hongos, con respuesta *in vitro* anómala al IFN- $\gamma$  pueden tener mutaciones en el propio receptor para IFN- $\gamma$  o en su señalización (Stat-1), como quedó demostrado con el estudio de estos pacientes.

## 9. PERSPECTIVAS.

1. Hacer el seguimiento clínico de los dos pacientes para observar si se presentan otro tipo de infecciones a las observadas hasta hoy.
2. Probar en la paciente con mutación en Stat-1 el inhibidor de Jak, Ruxolitinib, que inhibe la fosforilación de Stat-1 y evaluar si cambia la producción de IL-12p70 o de IL-17 en células de la paciente, con la visión del posible uso terapéutico de ese inhibidor que se usa en pacientes con alopecia areata<sup>155</sup>.

## 10. LITERATURA CITADA.

1. Yamazaki, Y. *et al.* Two novel gain-of-function mutations of STAT1 responsible for chronic mucocutaneous candidiasis disease: impaired production of IL-17A and IL-22, and the presence of anti-IL-17F autoantibody. *J. Immunol.* **193**, 4880–7 (2014).
2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Inmunología celular y molecular.* (Elsevier Saunders, 2015).
3. Rojas M., W. *et al.* *Inmunología de Rojas.* (CIB, 2015).
4. Picard, C. *et al.* Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J. Clin. Immunol.* **35**, 696–726 (2015).
5. Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Abel, L. & Casanova, J. L. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- $\gamma$  immunity. *Semin. Immunol.* **26**, 454–470 (2014).
6. Casanova, J.-L. & Abel, L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 55–66 (2004).
7. Filipe-Santos, O. *et al.* Inborn errors of IL-12/23- and IFN- $\gamma$ -mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin. Immunol.* **18**, 347–361 (2006).
8. Castigli, E. & Geha, R. S. Molecular basis of common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 740–6; quiz 747 (2006).
9. Bustamante, J. *et al.* Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 39–48 (2008).
10. Katona, P. & Katona-Apte, J. The interaction between nutrition and infection. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 1582–8 (2008).
11. Notarangelo, L. D. Primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S182–94 (2010).
12. Derdeyn, C. A. & Silvestri, G. Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 366–73 (2005).
13. Fischer, A. Human primary immunodeficiency diseases. *Immunity* **27**, 835–45 (2007).
14. Chinen, J., Notarangelo, L. D. & Shearer, W. T. Advances in basic and clinical immunology in 2014. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 1132–1141 (2015).
15. Conley, M. E. & Casanova, J. L. Discovery of single-gene inborn errors of immunity by next generation sequencing. *Curr. Opin. Immunol.* **30**, 17–23 (2014).
16. Casanova, J.-L. & Abel, L. The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **14**, 215–43 (2013).
17. Fischer, A. Human primary immunodeficiency diseases: a perspective. *Nat. Immunol.* **5**, 23–30 (2004).
18. Griffith, L. M. *et al.* Primary Immune Deficiency Treatment Consortium (PIDTC)

- report. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 335–347.e11 (2014).
19. Chinen, J. & Shearer, W. T. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S195–S203 (2010).
  20. Kusters, M. A. A., Verstegen, R. H. J., Gemen, E. F. A. & de Vries, E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin. Exp. Immunol.* **156**, 189–93 (2009).
  21. Chandra, R. K. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14304–7 (1996).
  22. Cunningham-Rundles, S., McNeeley, D. F. & Moon, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**, 1119–1129 (2005).
  23. OMS. Tuberculosis. *Nota descriptiva No. 104* (2016). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>. (Accessed: 3rd March 2015)
  24. Zumla, A., Raviglione, M., Hafner, R. & von Reyn, C. F. Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **368**, 745–55 (2013).
  25. Jönsson, B., Ridell, M. & Wold, A. E. The surface lipids of non-tuberculous mycobacteria suppress production of phagocyte activating cytokines in human peripheral blood mononuclear cells. *Microbes Infect.* **14**, 768–77 (2012).
  26. Russell, D. G. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 569–577. (2001).
  27. Fogel, N. Tuberculosis: a disease without boundaries. *Tuberculosis (Edinb).* **95**, 527–31 (2015).
  28. Hingley-Wilson, S. M., Sambandamurthy, V. K. & Jacobs, W. R. Survival perspectives from the world's most successful pathogen, Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Immunol.* **4**, 949–955 (2003).
  29. Alcaïs, A., Fieschi, C., Abel, L. & Casanova, J.-L. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J. Exp. Med.* **202**, 1617–21 (2005).
  30. Fogel, N. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis* **95**, 527–531 (2015).
  31. Cooper, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 393–422 (2009).
  32. Cooper, A. M., Mayer-Barber, K. D. & Sher, A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunol.* **4**, 252–260 (2011).
  33. Xu, S. *et al.* Intracellular trafficking in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-infected macrophages. *J. Immunol.* **153**, 2568–78 (1994).
  34. Armstrong, J. A. & Hart, P. D. Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* **134**, 713–40 (1971).
  35. Schlesinger, L. S., Bellinger-Kawahara, C. G., Payne, N. R. & Horwitz, M. A. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J. Immunol.* **144**, 2771–80 (1990).
  36. Wright, S. D. & Silverstein, S. C. Receptors for C3b and C3bi promote

- phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp. Med.* **158**, 2016–23 (1983).
37. Shaler, C. R., Horvath, C. N., Jeyanathan, M. & Xing, Z. Within the Enemy's Camp: contribution of the granuloma to the dissemination, persistence and transmission of Mycobacterium tuberculosis. *Front. Immunol.* **4**, 30 (2013).
  38. Döffinger, R. *et al.* Inherited disorders of IL-12- and IFN $\gamma$ -mediated immunity: A molecular genetics update. *Mol. Immunol.* **38**, 903–909 (2002).
  39. Stewart, G. R., Robertson, B. D. & Young, D. B. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat.Rev.Microbiol.* **1**, 97–105 (2003).
  40. Agarwal, N. & Bishai, W. R. Microbiology. Subversion from the sidelines. *Science* **327**, 417–8 (2010).
  41. Fieschi, C. *et al.* Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications. *J. Exp. Med.* **197**, 527–35 (2003).
  42. Verrall, A. J., Netea, M. G., Alisjahbana, B., Hill, P. C. & van Crevel, R. Early clearance of Mycobacterium tuberculosis: a new frontier in prevention. *Immunology* **141**, 506–13 (2014).
  43. Ahmad, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, 814943 (2011).
  44. Comas, I. & Gagneux, S. The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathog.* **5**, 1–7 (2009).
  45. Reichenbach, J. *et al.* Mycobacterial diseases in primary immunodeficiencies. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **1**, 503–11 (2001).
  46. Abel, L. & Casanova, J. L. Genetic predisposition to clinical tuberculosis: bridging the gap between simple and complex inheritance. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 274–7 (2000).
  47. Casanova, J.-L. *et al.* Immunological conditions of children with BCG disseminated infection. *Lancet* **44**, 581 (1995).
  48. Cruz-Knight, W. & Blake-Gumbs, L. Tuberculosis: an overview. *Prim. Care* **40**, 743–56 (2013).
  49. Holland, S. M. Treatment of infections in the patient with Mendelian susceptibility to mycobacterial infection. *Microbes Infect.* **2**, 1579–90 (2000).
  50. Luca, S. & Mihaescu, T. History of BCG Vaccine. *Mædica* **8**, 53–8 (2013).
  51. Calmette, A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc. R. Soc. Med.* **24**, 1481–1490 (1931).
  52. Palmer, C. E. & Long, M. W. Effects of infection with atypical mycobacteria on BCG vaccination and tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **94**, 553–68 (1966).
  53. Zaiem, A. *et al.* Probable disseminated BCG infection in a 10-month-old child after BCG vaccination. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 2081–2 (2014).
  54. Roy, A. *et al.* Effect of BCG vaccination against Mycobacterium tuberculosis infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **349**, g4643 (2014).
  55. OMS. La vacuna antituberculosa. *World Heal. Organ. Geneva* **4**, 25 – 40 (2004).
  56. Tabarsi, P. *et al.* Lethal tuberculosis in a previously healthy adult with IL-12 receptor deficiency. *J. Clin. Immunol.* **31**, 537–539 (2011).
  57. Jouanguy, E. *et al.* Partial interferon- $\gamma$  receptor 1 deficiency in a child with

- tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J. Clin. Invest.* **100**, 2658–2664 (1997).
58. Al-Muhsen, S. & Casanova, J. L. The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 1043–1051 (2008).
  59. Döffinger, R., Altare, F. & Casanova, J.-L. Genetic heterogeneity of Mendelian susceptibility to mycobacterial infection. *Microbes Infect.* **2**, 1553–1557 (2000).
  60. Cottle, L. E. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Clin. Genet.* **79**, 17–22 (2011).
  61. Pedraza, S. *et al.* Clinical disease caused by Klebsiella in 2 unrelated patients with interleukin 12 receptor beta1 deficiency. *Pediatrics* **126**, e971–e976 (2010).
  62. Ramirez-Alejo, N. & Santos-Argumedo, L. Innate defects of the IL-12/IFN- $\gamma$  axis in susceptibility to infections by mycobacteria and salmonella. *J. Interferon Cytokine Res.* **34**, 307–17 (2014).
  63. Ringkowski, S., Thomas, P. S. & Herbert, C. Interleukin-12 family cytokines and sarcoidosis. *Front. Pharmacol.* **5**, 233 (2014).
  64. Ramirez-Alejo, N. *et al.* Molecular analysis for patients with IL-12 receptor  $\beta$ 1 deficiency. *Clin. Genet.* **86**, 161–166 (2014).
  65. Beaucoudrey, L. De *et al.* Revisiting Human IL-12RA1 Deficiency. **89**, 381–402 (2010).
  66. Prando, C. *et al.* Inherited IL-12p40 deficiency: genetic, immunologic, and clinical features of 49 patients from 30 kindreds. *Medicine (Baltimore).* **92**, 109–22 (2013).
  67. Hambleton, S. *et al.* IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **365**, 127–38 (2011).
  68. Filipe-Santos, O. *et al.* X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. *J. Exp. Med.* **203**, 1745–59 (2006).
  69. Bustamante, J. *et al.* Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. *Nat Immunol* **12**, 213–221 (2011).
  70. Jouanguy, E. *et al.* Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1956–61 (1996).
  71. Newport, M. J. *et al.* A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1941–9 (1996).
  72. Rauch, I., Müller, M. & Decker, T. The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAK-STAT* **2**, e23820 (2013).
  73. McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A. & O’Garra, A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* **15**, 87–103 (2015).
  74. Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* **202**, 8–32 (2004).
  75. Schoenborn, J. R. & Wilson, C. B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.* **96**, 41–101 (2007).
  76. O’Brien, T. R., Prokunina-Olsson, L. & Donnelly, R. P. IFN- $\lambda$ 4: the paradoxical new member of the interferon lambda family. *J. Interferon Cytokine Res.* **34**,

- 829–38 (2014).
77. Prokunina-Olsson, L. *et al.* A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat. Genet.* **45**, 164–71 (2013).
  78. Witte, K., Witte, E., Sabat, R. & Wolk, K. IL-28A, IL-28B, and IL-29: Promising cytokines with type I interferon-like properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 237–251 (2010).
  79. Naylor, S. L. *et al.* Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J. Exp. Med.* **157**, 1020–7 (1983).
  80. Taya, Y. *et al.* Cloning and structure of the human immune interferon-gamma chromosomal gene. *EMBO J.* **1**, 953–8 (1982).
  81. Gray, P. W. & Goeddel, D. V. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* **298**, 859–63 (1982).
  82. Derynck, R., Leung, D. W., Gray, P. W. & Goeddel, D. V. Human interferon gamma is encoded by a single class of mRNA. *Nucleic Acids Res.* **10**, 3605–15 (1982).
  83. Billiau, A. & Matthys, P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 97–113 (2009).
  84. Aguet, M., Dembić, Z. & Merlin, G. Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell* **55**, 273–80 (1988).
  85. Darnell, J. E., Kerr, I. M. & Stark, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415–21 (1994).
  86. Heim, M. H. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **19**, 75–120 (2009).
  87. Roesler, J. *et al.* *Listeria monocytogenes* and recurrent mycobacterial infections in a child with complete interferon-gamma-receptor (IFN $\gamma$ R1) deficiency: mutational analysis and evaluation of therapeutic options. *Exp. Hematol.* **27**, 1368–74 (1999).
  88. Dorman, S. E. *et al.* Clinical features of dominant and recessive interferon?? receptor 1 deficiencies. *Lancet* **364**, 2113–2121 (2004).
  89. Camcioglu, Y. *et al.* HHV-8-associated Kaposi sarcoma in a child with IFN $\gamma$ R1 deficiency. *J. Pediatr.* **144**, 519–23 (2004).
  90. Bax, H. I. *et al.* B-cell lymphoma in a patient with complete interferon gamma receptor 1 deficiency. *J. Clin. Immunol.* **33**, 1062–6 (2013).
  91. Jouanguy, E. *et al.* In a novel form of IFN-gamma receptor 1 deficiency, cell surface receptors fail to bind IFN-gamma. *J. Clin. Invest.* **105**, 1429–36 (2000).
  92. Lee, W.-I. *et al.* Chinese patients with defective IL-12/23-interferon-gamma circuit in Taiwan: partial dominant interferon-gamma receptor 1 mutation presenting as cutaneous granuloma and IL-12 receptor beta1 mutation as pneumatocele. *J. Clin. Immunol.* **29**, 238–45 (2009).
  93. Feinberg, J. *et al.* *Bacillus Calmette Guerin* triggers the IL-12/IFN-gamma axis by an IRAK-4- and NEMO-dependent, non-cognate interaction between monocytes, NK, and T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **34**, 3276–84 (2004).
  94. Costa-Pereira, A. P. *et al.* Signaling through a mutant IFN-gamma receptor. *J. Immunol.* **175**, 5958–65 (2005).
  95. Marazzi, M. G. *et al.* Disseminated *Mycobacterium scrofulaceum* infection in a

- child with interferon-gamma receptor 1 deficiency. *Int J Infect Dis* **14**, e167–70 (2010).
96. Pierre-Audigier, C. *et al.* Fatal disseminated *Mycobacterium smegmatis* infection in a child with inherited interferon gamma receptor deficiency. *Clin. Infect. Dis.* **24**, 982–4 (1997).
  97. Koscielniak, E. *et al.* Disseminated *Mycobacterium peregrinum* infection in a child with complete interferon-gamma receptor-1 deficiency. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**, 378–80 (2003).
  98. Edeer Karaca, N. *et al.* Granulomatous skin lesions, severe scrotal and lower limb edema due to mycobacterial infections in a child with complete IFN- $\gamma$  receptor-1 deficiency. *Immunotherapy* **4**, 1121–7 (2012).
  99. Dorman, S. E. *et al.* Viral infections in interferon-gamma receptor deficiency. *J. Pediatr.* **135**, 640–3 (1999).
  100. Holland, S. M. *et al.* Abnormal regulation of interferon-gamma, interleukin-12, and tumor necrosis factor-alpha in human interferon-gamma receptor 1 deficiency. *J. Infect. Dis.* **178**, 1095–104 (1998).
  101. Jouanguy, E. *et al.* A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat. Genet.* **21**, 370–8 (1999).
  102. Sasaki, Y. *et al.* Genetic basis of patients with bacille Calmette-Guérin osteomyelitis in Japan: identification of dominant partial interferon-gamma receptor 1 deficiency as a predominant type. *J. Infect. Dis.* **185**, 706–9 (2002).
  103. Hoshina, T. *et al.* Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *J. Clin. Immunol.* **31**, 309–14 (2011).
  104. M., P. *et al.* Disseminated *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in a girl with partial dominant IFN-gamma receptor 1 deficiency. *Cent. J. Immunol.* **37**, 378–381 (2012).
  105. Zerbe, C. S. & Holland, S. M. Disseminated histoplasmosis in persons with interferon-gamma receptor 1 deficiency. *Clin. Infect. Dis.* **41**, e38–41 (2005).
  106. Vinh, D. C., Masannat, F., Dzioba, R. B., Galgiani, J. N. & Holland, S. M. Refractory disseminated coccidioidomycosis and mycobacteriosis in interferon-gamma receptor 1 deficiency. *Clin. Infect. Dis.* **49**, e62–5 (2009).
  107. Roesler, J., Hedrich, C., Laass, M. W., Heyne, K. & Rösen-Wolff, A. Meningoencephalitis caused by varicella-zoster virus reactivation in a child with dominant partial interferon-gamma receptor-1 deficiency. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **30**, 265–6 (2011).
  108. Wang, Q., Xia, W. & Zhao, D. [Interferon-gamma receptor 1 deficiency in a 19-month-old child: case report and literature review]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* **52**, 387–91 (2014).
  109. Okada, S. *et al.* The novel IFNGR1 mutation 774del4 produces a truncated form of interferon-gamma receptor 1 and has a dominant-negative effect on interferon-gamma signal transduction. *J. Med. Genet.* **44**, 485–91 (2007).
  110. Arend, S. M. *et al.* Multifocal osteomyelitis caused by nontuberculous mycobacteria in patients with a genetic defect of the interferon-gamma receptor. *Neth. J. Med.* **59**, 140–51 (2001).



111. Raszka, W. V, Trinh, T. T. & Zawadsky, P. M. Multifocal M. intracellulare osteomyelitis in an immunocompetent child. *Clin. Pediatr. (Phila)*. **33**, 611–6 (1994).
112. Villella, A. *et al.* Recurrent Mycobacterium avium osteomyelitis associated with a novel dominant interferon gamma receptor mutation. *Pediatrics* **107**, E47 (2001).
113. Obinata, K. *et al.* Two cases of partial dominant interferon- $\gamma$  receptor 1 deficiency that presented with different clinical courses of bacille Calmette-Guérin multiple osteomyelitis. *J. Infect. Chemother.* **19**, 757–60 (2013).
114. Takeda, K. *et al.* Augmentation of antitubercular therapy with IFN $\gamma$  in a patient with dominant partial IFN $\gamma$  receptor 1 deficiency. *Clin. Immunol.* **151**, 25–8 (2014).
115. Holland, S. M. Immunotherapy of mycobacterial infections. *Semin. Respir. Infect.* **16**, 47–59 (2001).
116. Vogt, G. *et al.* Complementation of a pathogenic IFNGR2 misfolding mutation with modifiers of N-glycosylation. *J. Exp. Med.* **205**, 1729–37 (2008).
117. Vogt, G. *et al.* Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat. Genet.* **37**, 692–700 (2005).
118. Rosenzweig, S. D. *et al.* A novel mutation in IFN-gamma receptor 2 with dominant negative activity: biological consequences of homozygous and heterozygous states. *J. Immunol.* **173**, 4000–8 (2004).
119. Martínez-Barricarte, R. *et al.* Mycobacterium simiae infection in two unrelated patients with different forms of inherited IFN- $\gamma$ R2 deficiency. *J. Clin. Immunol.* **34**, 904–9 (2014).
120. Rosenzweig, S. D., Schwartz, O. M., Brown, M. R., Leto, T. L. & Holland, S. M. Characterization of a dipeptide motif regulating IFN-gamma receptor 2 plasma membrane accumulation and IFN-gamma responsiveness. *J. Immunol.* **173**, 3991–9 (2004).
121. Toyoda, H. *et al.* Multiple cutaneous squamous cell carcinomas in a patient with interferon gamma receptor 2 (IFN gamma R2) deficiency. *J. Med. Genet.* **47**, 631–4 (2010).
122. Moncada-Vélez, M. *et al.* Partial IFN- $\gamma$ R2 deficiency is due to protein misfolding and can be rescued by inhibitors of glycosylation. *Blood* **122**, 2390–401 (2013).
123. Kilic, S. S. *et al.* Severe disseminated mycobacterial infection in a boy with a novel mutation leading to IFN- $\gamma$ R2 deficiency. *J. Infect.* **65**, 568–572 (2012).
124. Döffinger, R. *et al.* Partial interferon-gamma receptor signaling chain deficiency in a patient with bacille Calmette-Guérin and Mycobacterium abscessus infection. *J. Infect. Dis.* **181**, 379–84 (2000).
125. de Paus, R. A., Kilic, S. S., van Dissel, J. T. & van de Vosse, E. Effect of amino acid substitutions in the human IFN- $\gamma$ R2 on IFN- $\gamma$  responsiveness. *Genes Immun.* **12**, 136–44 (2011).
126. Kong, X.-F. *et al.* Haploinsufficiency at the human IFNGR2 locus contributes to mycobacterial disease. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 769–81 (2013).
127. Rane, S. G. & Reddy, E. P. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* **19**, 5662–79 (2000).
128. Shuai, K. & Liu, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat.*

- Rev. Immunol.* **3**, 900–911 (2003).
129. Mertens, C. *et al.* Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev.* **20**, 3372–3381 (2006).
  130. Boisson-Dupuis, S. *et al.* Inborn errors of human STAT1: Allelic heterogeneity governs the diversity of immunological and infectious phenotypes. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 364–378 (2012).
  131. Gough, D. J., Levy, D. E., Johnstone, R. W. & Clarke, C. J. IFN $\gamma$  signaling—does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 383–94
  132. Dupuis, S. *et al.* Impaired response to interferon- $\alpha$ / $\beta$  and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat. Genet.* **33**, 388–91 (2003).
  133. Chagnier, A. *et al.* Human complete Stat-1 deficiency is associated with defective type I and II IFN responses in vitro but immunity to some low virulence viruses in vivo. *J. Immunol.* **176**, 5078–83 (2006).
  134. Vairo, D. *et al.* Severe impairment of IFN- $\gamma$  and IFN- $\alpha$  responses in cells of a patient with a novel STAT1 splicing mutation. *Blood* **118**, 1806–17 (2011).
  135. Chagnier, A. *et al.* A partial form of recessive STAT1 deficiency in humans. *J. Clin. Invest.* **119**, 1502–1514 (2009).
  136. Kong, X.-F. *et al.* A novel form of human STAT1 deficiency impairing early but not late responses to interferons. *Blood* **116**, 5895–906 (2010).
  137. Kristensen, I. A., Veirum, J. E., Møller, B. K. & Christiansen, M. Novel STAT1 alleles in a patient with impaired resistance to mycobacteria. *J. Clin. Immunol.* **31**, 265–71 (2011).
  138. Casanova, J.-L. & Abel, L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 581–620 (2002).
  139. Dupuis, S. *et al.* Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* **293**, 300–3 (2001).
  140. Chagnier, A. *et al.* Novel STAT1 alleles in otherwise healthy patients with mycobacterial disease. *PLoS Genet.* **2**, 1193–1206 (2006).
  141. Liu, L. *et al.* Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Exp. Med.* **208**, 1635–1648 (2011).
  142. van de Veerdonk, F. L. *et al.* STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 54–61 (2011).
  143. Frans, G. *et al.* Gain-of-function mutations in signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1): Chronic mucocutaneous candidiasis accompanied by enamel defects and delayed dental shedding. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 1209–1213 (2014).
  144. Soltész, B. *et al.* New and recurrent gain-of-function STAT1 mutations in patients with chronic mucocutaneous candidiasis from Eastern and Central Europe. *J. Med. Genet.* **50**, 567–78 (2013).
  145. Kumar, N. *et al.* Gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) mutation-related primary immunodeficiency is associated with disseminated mucormycosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 236–239 (2014).
  146. Sampaio, E. P. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutations and disseminated coccidioidomycosis and

- histoplasmosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 1624–1634.e17 (2013).
147. Kirkpatrick, C. H. Chronic mucocutaneous candidiasis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **20**, 197–206 (2001).
  148. Milner, J. D. & Holland, S. M. The cup runneth over: lessons from the ever-expanding pool of primary immunodeficiency diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 635–48 (2013).
  149. Zhong, M. *et al.* Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3966–71 (2005).
  150. Takezaki, S. *et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain. *J. Immunol.* **189**, 1521–6 (2012).
  151. Mizoguchi, Y. *et al.* Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Leukoc. Biol* **13**, 0–0 (2013).
  152. Remus, N. *et al.* Impaired interferon gamma-mediated immunity and susceptibility to mycobacterial infection in childhood. *Pediatr. Res.* **50**, 8–13 (2001).
  153. Rose, D. M., Atkins, J., Holland, S. M. & Infante, A. J. A novel mutation in IFN- $\gamma$  receptor 1 presenting as multisystem Mycobacterium intracellulare infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 591–592 (2014).
  154. Leitner, N. R. *et al.* Inducible, dose-adjustable and time-restricted reconstitution of STAT1 deficiency in vivo. *PLoS One* **9**, e86608 (2014).
  155. Higgins, E. *et al.* Use of ruxolitinib to successfully treat chronic mucocutaneous candidiasis caused by gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) mutation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 551–553 (2015).

## 11. ANEXOS

### 11. 1. Materiales.

#### MATERIAL BIOLÓGICO.

1. BCG, cepa Danesa.
2. CMN.
3. LCL-VEB.
4. Línea celular productora del Virus de Epstein Barr, B95-8.
5. Sangre periférica de pacientes, familiares y donadores sanos.

#### MATERIAL DE LABORATORIO.

1. Aguja para punción venosa, BD Vacutainer
2. Botellas de cultivo celular de 25cm<sup>2</sup>, True Line
3. Botellas de cultivo celular de 75cm<sup>2</sup>, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
4. Cámara de Neubauer, Marienfeld
5. Cámara de SDS-PAGE, Bio Rad
6. Cámara de transferencia, Bio Rad
7. Filtros de 0.2um, Corning
8. Guantes de nitrilo, Santa Cruz
9. Membrana PVDF, Millipore
10. Micropipeta multicanal 30-200uL, Gilson
11. Micropipeta 0.5-10uL, Rainin
12. Micropipeta 2-20uL, Rainin
13. Micropipeta 20-200uL, Rainin
14. Micropipeta 100-1000uL, Rainin
15. Papel filtro
16. Película radiográfica, Kodak
17. Pipetas Pasteur,
18. Pipeteador, Labnet
19. Pieta serologica 2mL, Costar
20. Pipeta serologica 5mL, Costar
21. Pipeta serologica 10mL, Costar
22. Pipeta serologica 25mL, Costar
23. Placas de cultivo celular de 24 pozos, Costar
24. Placas de cultivo celular de 48 pozos, Costar
25. Placas de 96 pozos para ELISA MaxiSorp Nunc, Thermo
26. Puntas para micropipeta de 10µL, Axygen
27. Puntas para micropipeta de 200µL, Axygen
28. Puntas para micropipeta de 1000µL, Axygen

29. Tapones para tubos de citometría, Falcon
30. Tubos con heparina de sodio, BD Vacutainer
31. Tubos conicos estériles de 50mL, Axygen
32. Tubos conicos estériles de 15mL, Axygen
33. Tubos de citometría, Falcon
34. Tubos cónico de 600uL , Axygen
35. Tubos cónico de 1.5mL, Axygen
36. Tubos de fondo redondo de 2mL, Axygen

## 11. 2. Reactivos.

1. HCl, Merk
2. Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Millipore
3. Ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), Sigma
4. Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico (HEPES), J. T. Baker
5. Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ADLER
6. Acrilamida 40%, Bio Rad
7. Agua inyectable, PISA
8. Agua ultrapura, Gibco
9. Albúmina, MP
10. Antibióticos (penicilina y estreptomicina)
11. Anticuerpo anti-cadena β1 del receptor de IL-12 PE, BD Pharmigen
12. Anticuerpo anti-cadena β2 del receptor de IL-12 PE, BD Pharmigen
13. Anticuerpo anti-CD14, BD Biosciences.
14. Anticuerpo anti-CD119, BD Biosciences.
15. Anticuerpo anti-tubulina, Santa Cruz
16. Anticuerpo anti-lamina B, Santa Cruz
17. Anticuerpo anti-STAT1 para Western blot, Santa Cruz
18. Anticuerpo anti-pSTAT1 PE (Y701) para Citometría de flujo, BD Biosciences
19. Anticuerpo anti-pSTAT1 (Y701) para Western blot, Cell Signaling
20. Anticuerpo anti-IgG de cabra, Thermo Scientific
21. Anticuerpo anti-IgG de ratón
22. Anticuerpo anti-IgG de conejo, Thermo Scientific
23. Anticuerpo anti-TNF alfa humano, BD Pharmigen
24. Anticuerpo anti-TNF alfa humano con biotina, BD Pharmigen
25. Azida de sodio (NaN<sub>3</sub>)
26. Azul de bromofenol, Sigma
27. Azul de tripano, Sigma
28. BD Phosflow Perm Buffer III 558050, BD Biosciences.
29. β-mercaptoetanol, Sigma
30. Ciclosporina A, GELPHARMA
31. Cloruro de potasio (KCl), J. T. Baker
32. Cloruro de sodio (NaCl), J. T. Baker
33. Dietanolamina, Sigma
34. Dodecilsulfato sódico (SDS), Sigma
35. Estaurosporina, Merck calmiochem
36. FACS lysing solution 10X, BD Biosciences
37. Fitohemaglutinina, Sigma
38. Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Sigma
39. Fluoruro de sodio (NaF), Sigma

40. Fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina, Millipore
41. Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), J. T. Baker
42. Fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), J. T. Baker
43. Glicerol, Amresco
44. Glicina, Amresco
45. Glutamina, J. T. Baker
46. Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), J. T. Baker
47. IFN- $\gamma$ , Thermo
48. IFN- $\alpha$ , R&D
49. IL-12 recombinante humana, Sigma
50. Kit de ELISA en sandwich para IL-12p40, R&D.
51. Kit de ELISA en sandwich para IL-12p70, R&D.
52. Kit de ELISA en sandwich para IFN- $\gamma$ , R&D.
53. Lymphoprep, Lonza
54. Marcador de peso molecular, NIPPON Genetics
55. Metanol, J. T. Baker
56. N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED), Sigma
57. Nonidet P-40 (NP-40), Sigma
58. Ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), Sigma
59. Paraformaldehído, Sigma
60. Para-nitrofenil fosfato, Sigma
61. Persulfato de amonio, Sigma
62. Protein assay (Reactivo de Bradford), Bio Rad. cat# 500-0006
63. RPMI 1640, Caisson
64. Solución fijadora, Kodak GBX
65. Solución reveladora, Kodak GBX
66. Solución salina fisiológica
67. Suero Fetal Bovino, Gibco
68. SuperBlock, Thermo Scientific
69. Super Signal luminol, Thermo Scientific
70. TNF-alfa, Thermo
71. Tris, Amresco
72. Tween 20, Sigma

### 11. 3. Preparación de soluciones.

Soluciones para citometría de flujo.

- PBA
  - Suero fetal bovino 10mL
  - NaN<sub>3</sub> 1g
  - PBS cbp 1000mL

Filtrar con poro de 0.2µm.
- Paraformaldehído 4X
  - Paraformaldehído 4g
  - PBS cbp 100mL

Filtrar con poro de 0.2µm.
- Solución de lisis de eritrocitos
  - FACS Lysing solution 10X 10mL
  - H<sub>2</sub>O milliQ cbp 100mL

Diluir el FACS Lysing solution 1:10.

Soluciones para ELISA.

- PBS 1X, pH 7.2 – 7.4
  - NaCl 0.136M 8g
  - KCl 0.002M 0.2g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.015M 2.15g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.0015M 0.2g
  - H<sub>2</sub>O milliQ cbp 1000mL

Ajustar el pH con HCl antes de aforar.
- PBS con Tween 20 al 0.05%
  - Tween 20 0.05mL
  - PBS 100mL

Mezclar con inversión.
- PBS con albúmina al 1%
  - Albúmina 1g
  - PBS 100mL
- PBS con albúmina al 1% y Tween 20 al 0.05%
  - Albúmina 1g



- PBS con Tween al 0.05% 100mL
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N
  - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 28.19mL
  - H<sub>2</sub>O bidestilada cbp 500mL

Adicionar el H<sub>2</sub>O bidestilada, luego el ácido con precaución en las paredes del vaso.

- NaOH 5M
  - NaOH 10g
  - H<sub>2</sub>O bidestilada 50mL

Soluciones para la extracción de proteínas.

- Amortiguador de lisis de membrana
 

	Conc. de stock	Conc. trabajo	
○ HEPES	1M, pH 7.9	10mM	0.5mL
○ KCl	1M	10mM	0.5mL
○ EDTA	100mM	0.1mM	0.05mL
○ EGTA	100mM	0.1mM	0.05mL
○ NP-40		0.05%	0.025mL
○ H <sub>2</sub> O milliQ		cbp	50mL

- Amortiguador de lisis nuclear
 

	Conc. de stock	Conc. trabajo	
○ HEPES	1M, pH 7.9	20mM	0.2mL
○ NaCl	1M	0.4M	4mL
○ EDTA	100mM	1mM	0.1mL
○ EGTA	100mM	1mM	0.1mL
○ Glicerol		25%	2.5mL
○ H <sub>2</sub> O milliQ		cbp	10mL

- Inhibidores
 

	Conc. de stock	Conc. trabajo
○ NaF	746mM	25mM
○ PMSF	100mM	1mM
○ Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	100mM	5mM
○ Complete	25X	1X

El volumen depende del amortiguador en el que se usarán los inhibidores. El complete únicamente se usa para el amortiguador de lisis nuclear.

## Soluciones para *Western blot*.

- Amortiguador de carga 5X (Laemmli)
  - Tris-Hcl 1M, pH 6.8 3.12mL
  - SDS 1.0g
  - Glicerol 5.0mL
  - $\beta$ -mercaptoetanol 0.5mL
  - Azul de bromofenol 0.005g
  - H<sub>2</sub>O milliQ cbp 10mL

Disolver el SDS en H<sub>2</sub>O y posteriormente adicionar los reactivos restantes.

- Amortiguador de corrimiento 10X, pH 8.3
  - Glicina 144g
  - Tris 30.55g
  - SDS 10g
  - H<sub>2</sub>O bidestilada cbp 1000mL

Ajustar el pH con HCl antes de aforar. Para obtener una solución de trabajo 1X, diluir 1:10.

- Amortiguador de transferencia
  - Tris 25mM 3.03g
  - Glicina 190mM 14.5g
  - SDS 0.05% 0.5g
  - Metanol 10% 100mL
  - H<sub>2</sub>O milliQ cbp 1000mL
- Gel concentrador 10%
  - Tris, pH 6.8, 0.5M 3.75mL
  - H<sub>2</sub>O milliQ 9.5mL
  - Acrilamida 40% 1.5mL
  - SDS 10% 150 $\mu$ L
  - PSA 60 $\mu$ L
  - TEMED 15 $\mu$ L

Adicionar el TEMED al final.

- Gel separador 7%
  - Tris, pH 8.8, 1.5M 5mL
  - H<sub>2</sub>O milliQ 11.2mL
  - Acrilamida 40% 3.5mL
  - SDS 10% 200 $\mu$ L

- PSA 75 $\mu$ L
- TEMED 20 $\mu$ L

Adicionar el TEMED al final.

- SDS al 10%
  - SDS 10g
  - H<sub>2</sub>O milliQ cbp 1000mL
- Amortiguador Tris-salino, pH 7.5 (TBS)
  - NaCl 150mM 8.76g
  - Tris 20mM 2.42g
  - H<sub>2</sub>O bidestilada cbp 1000mL

Ajustar el pH con HCl antes de aforar

- TBS-Tween 20 al 0.1%
  - Tween 20 0.5mL
  - TBS 500mL

Preparar en el momento.

- Tris 0.5M, pH 6.8
  - Tris 60.57g
  - H<sub>2</sub>O milliQ cbp 1000mL

Ajustar el pH con HCl

- Tris 1.5M, pH 8.8
  - Tris 181.71g
  - H<sub>2</sub>O milliQ cbp 1000mL

Ajustar el pH con HCl.

**11. 4. Oligonucleótidos para la secuenciación de *IFNGR1*, *IFNGR2* Y *STAT1*.**

<b>Gen</b>	<b>Exón</b>	<b>Secuencia</b>
<i>IFNGR1</i>	Exon1F	GGTGACGGAAGTGACGTAAGG
	Exon1R	GACGAGTTCAAACCACGGAG
	Exon2F	TATCTGGGCAATGTGGCA
	Exon2R	AGGCTGATGAAAGAACAC
	Exon3F	CTACCGCTTTGTGCTGTG
	Exon3R	TGGGATGCTCAACCTGTA
	Exon4F	GAACAACCAGAACAAAAAC
	Exon4R	CACTACAGAAAGGAACAAC
	Exon5F	GCATTTTCACTGTTTTCTTTT
	Exon5R	TTTTAGTTACTGCTCCCTC
	Exon6F	TCAAGAATGGCACTAAGAC
	Exon6R	TAGACTGACTGATTGATGG
	Exon7F	CCATTACTTCAGACCTTTG
	Exon7R	CACTAAGTCACTCCATTTG
<i>IFNGR2</i>	Exon1F	GGCGGTTTGGGCGGCGAC
	Exon1R	CCCAGCTCCTGTCTGGAA
	Exon2F	ATTTCCCTCTCTCTCCTC
	Exon2R	GCACAGAGGCAGGGACTA
	Exon3F	CTGGGGAAACTATTACACAT
	Exon3R	CAAGTGAAGAAAACCTGGAA
	Exon4F	GTGTATGTGTGTGGTTTTTC
	Exon4R	GCAAAGAAAAGAAAATCCAAA
	Exon5F	CTTGTTCTTCTTTGGTTGTC
	Exon5R	GATTTCACTATTGGAGGAG
	Exon6F	AGGACAGGAATGCTCTTTA
	Exon6R	GCAACAGAGCAAGACCCT
	Exon7F	ATACTGAACTGGTAACTAAT
	Exon7R	GCAGAAAATAGGCTACAATAA
<i>STAT1</i>	Exon3F	TTAAGAGTACAACCTGATGC
	Exon3R	ATTCCAGTGGCCATTGATGG
	Exon4F	GTTTTACATAGACATTTAGTTC
	Exon4R	GCTGAATGAAGAAAACCTGCC
	Exon5F	AATAGATGAGAGATGAGGTTT
	Exon5R	TCTGATTCTCCCACTTCTTG

Exon6F	GTGGGGACTTGACTTTGG
Exon6R	AACCTTTTTTCCCCTACAGA
Exon7F	TTGTTTTCGTGTTTCTCTGG
Exon7R	CGGCAAATAGAAAGGAGTAA
Exon8F	CTTGGCTTTTGTTGGTTTTG
Exon9R	CATTCTCAACTGGGGCTCTA
Exon10F	GGCTGCTTCTGGACTGTT
Exon10R	ACGGTAAAATGTTCCCTCTGT
Exon11F	GGTTTTGGGATTTCTTTACT
Exon11R	TTCCTCAAAGCACCCCTA
Exon12F	CTGGAGGGGGAGTAGTTT
Exon12R	GGAATCTGTGCTTGAGTAAC
Exon13F	CACTTACACTCTTATGCTCT
Exon14R	CTAAGAAACCAGAGACAACA
Exon15F	AGCAACTTTGACCATTACC
Exon15R	AACTGACCTGTCCTTGCTA
Exon16F	GCACACTGAGATACTAAGAA
Exon16R	AACACTGAGAAATAAAAATACAT
Exon17F	AGTTATCTGAAGGTGACATTT
Exon17R	CAGTGAGAGCGTGGGGT
Exon18F	GTGTCTCTGTAGTAACCCT
Exon18R	GCAGAGGGGAAAAGAGCA
Exon19F	AGCCATCCGTCCAACCAA
Exon19R	CAACCAAGAGCAAAAAGGA
Exon20F	GGGACAGTTCCATCCTTGGC
Exon20R	CGCACTCCTGTGAGATTCAC
Exon21F	TCTCACATTCCAGCCATTTT
Exon21R	GCAATTTTCATGTCCCAAACG
Exon22F	ATTTTGGGATGTTCTATGGG
Exon22R	AGACTGTGCCACGCTGTT
Exon23F	TTGATGTTGTATTCTGATGGA
Exon23R	GGCTGGCTTGAGGTTTGT
Exon24F	CAAAAGATAAAGTGTGTAAGTA
Exon24R	AGCACACACACTTATTGAGA