



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA LRBA
EN LINFOCITOS Y LAS POSIBLES CONSECUENCIAS
DE SU DEFICIENCIA**

TESIS

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

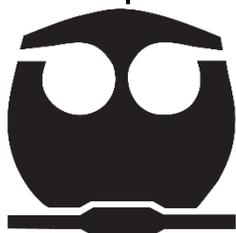
PRESENTA

ESTEFANIA VILLANUEVA ESTRADA

TUTORA

DRA. GABRIELA LÓPEZ HERRERA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: PATRICIA ELVIRA BERRÓN RUIZ
VOCAL: Profesor: MARIO ADAN MORENO EUTIMIO
SECRETARIO: Profesor: GABRIELA LÓPEZ HERRERA
1er. SUPLENTE: Profesor: VERONICA GARROCHO VILLEGAS
2° SUPLENTE: Profesor: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

ASESOR DEL TEMA:

DRA. GABRIELA LÓPEZ HERRERA

SUSTENTANTE:

ESTEFANIA VILLANUEVA ESTRADA



Este proyecto fue realizado en la Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias Primarias (UIID) del Instituto Nacional de Pediatría.

Fue financiado por el CONACYT por el fondo SEP-Ciencia Básica 2012, 154472.



Índice

Abreviaturas	vi
Índice de figuras	ix
Índice de cuadros y tablas	x
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	3
<i>Sistema inmune</i>	3
<i>Inmunidad innata</i>	3
<i>Inmunidad adaptativa</i>	4
<i>Células y tejidos del sistema inmune</i>	4
<i>Médula ósea</i>	9
<i>La diferenciación de los linfocitos B tiene lugar en la médula ósea</i>	10
<i>La diferenciación de las células T se lleva en el Timo</i>	14
<i>Órganos linfoides secundarios</i>	17
<i>Bazo</i>	17
<i>Inmunodeficiencias primarias</i>	20
<i>Inmunodeficiencias primarias de anticuerpos</i>	21
<i>Inmunodeficiencia común variable (IDCV)</i>	21
<i>La IDCV se asocia con mutaciones en LRBA</i>	24
Planteamiento del problema	29
Objetivos	30
Objetivo general	30
Objetivos particulares	30
Hipótesis	31
Metodología	32
<i>Evaluación de la diferenciación linfoide en ratones silvestres, heterocigotos y homocigotos deficientes de LRBA</i>	32
Obtención de las células	32

Evaluación de subpoblaciones celulares de linfocitos T por citometría de flujo.....	32
Evaluación de subpoblaciones celulares de linfocitos B por citometría de flujo	32
<i>Evaluación de la expresión de LRBA en muestras de humanos sanos.</i>	34
Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	34
Detección de LRBA por citometría de flujo.....	34
<i>Análisis estadístico</i>	35
Resultados	36
<i>Poblaciones de linfocitos en ratones Lrba-/-</i>	36
Análisis de subpoblaciones de Linfocitos T en Timo de ratones	36
Análisis de subpoblaciones de linfocitos B en Médula ósea de ratones	40
Análisis de subpoblaciones de Linfocitos B en Bazo de ratones.....	46
<i>Análisis de la expresión de LRBA en linfocitos humanos</i>	50
Análisis de la expresión de LRBA en linfocitos T en linfocitos humanos	50
Análisis de la expresión de LRBA en linfocitos B en humanos.....	56
Discusión	63
Conclusiones	68
Referencias	69

Abreviaturas

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico

B220: Marcador de células B

BAFF: Factor activador de linfocitos B

BCR: Receptor de células B

CD: Cluster de diferenciación

Células NK: Natural killer

CPA: Célula presentadora de antígeno

CTLA-4: Antígeno 4 de linfocito T citotóxico

DC: Célula dendrítica

DN: Timocitos Dobles negativos

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Dominio BEACH: Beige y Chediak-Higashi

Dominio ConA-like: Unión a lectina tipo concavalina A

Dominio H: Tipo homología a plekstrina

Dominio VHS: VPS (clasificación de proteína vacuolares)-27, Hrs (sustrato de tirosin cinasa regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos) y STAM (molécula adaptadora de transducción de señales)

DP: Timocitos Dobles positivos

E2F1: Factor de transcripción ESF1

EGFR: Factor de crecimiento epidérmico

FDC: Célula dendrítica folicular

FO: Foliculares

FOXP3: Forkhead box P3

Helios: Factor de transcripción Helios

IDCV: Inmunodeficiencia común variable

IDP: Inmunodeficiencia primaria

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

IMF: Intensidad media de fluorescencia
LCR: Cadena ligera 3
Linfocitos Tc: Linfocitos T citotóxicos
Linfocitos Th: Linfocitos T cooperadores
LIR: Región de interacción con LCR
Lrba: Lypopolisacharide (LPS) responsive beige-like (gen murino)
Lrba: Lypopolisacharide (LPS) responsive beige-like (proteína murina)
LRBA: Lypopolisacharide (LPS) responsive beige-like anchor (gen humano)
LRBA: Lypopolisacharide (LPS) responsive beige-like anchor (proteína humana)
MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas
MAPKs: Proteínas activadas por mitógenos
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad
µg: Microgramo
µL: Microlitro
mL: Mililitro
MZ: Zona marginal
Notch: Proteína transmembranal que sirve como receptor de señales extracelulares
p53: Proteína supresora de tumores
PALS: Vaina linfática periarterial
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica
PHA: Fitohemaglutinina
PKA: Proteína cinasa dependiente de AMPc
PKW: mitógeno de Pokeweed
PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones
RNA: Ácido ribonucleico
SALT: Tejido linfoide asociado a piel
TCR: Receptor de células T

Tregs: Linfocito T regulador

WBW: Familia de genes WLD-BEACH-W40

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de las células del sistema inmune en el organismo.....	6
Figura 2. Principales órganos y tejidos del sistema inmune.....	8
Figura 3. Desarrollo y subpoblaciones de Linfocitos B.....	13
Figura 4. Diferenciación de Linfocitos T en timo.....	16
Figura 5. El bazo.....	19
Figura 6. Estructura proteica de LRBA.....	26
Figura 7. Análisis de subpoblaciones de Linfocitos T obtenidos de timo en ratones.....	37
Figura 8. Subpoblaciones de Linfocitos T en timo de ratones.....	39
Figura 9. Análisis de subpoblaciones de Linfocitos B en médula ósea de ratones.....	41
Figura 10. Comparación de las subpoblaciones de Linfocitos B analizadas en médula ósea de ratones	43
Figura 11. Subpoblaciones de linfocitos B en médula ósea de ratones.....	45
Figura 12. Análisis de Linfocitos B y algunas de sus subpoblaciones en células obtenidas de bazo de ratones.....	47
Figura 13. Subpoblaciones de linfocitos B identificadas en bazo de ratones.....	49
Figura 14. Análisis de Linfocitos T (CD3+) humanos estimulados con PHA	52
Figura 15. Gráfico de las medias de los factores LRBA/Isotipo obtenidos tras el estímulo de linfocitos T humanos con PHA [10µg/mL] durante 48 horas.....	54
Figura 16. Gráfico de las medias de los factores LRBA/Isotipo obtenidos tras el estímulo linfocitos T humanos con PHA [10µg/mL] durante 48 hora.....	55
Figura 17. Análisis de subpoblaciones de Linfocitos B CD27+ y CD27- humanos estimulados con PKW.....	57
Figura 18. Gráfico de las medias de los factores LRBA/Isotipo obtenidos tras el estímulo con PKW [10µg/mL] durante 48 horas, en linfocitos B humanos	59
Figura 19. Gráfico de las medias de los factores LRBA/Isotipo obtenidos tras el estímulo con PKW [10µg/mL] durante 72 horas, en linfocitos B humanos.....	61
Figura 20. Superposición de gráficos de IMF entre el control de isotipo y LRBA en linfocitos T (CD3+) y linfocitos B (CD19+) humanos.....	62

Índice de cuadros y tablas

Cuadro 1. Modelo de la hematopoyesis.....	10
Tabla 1. Clasificación de las IDPs según la (IUIS) en 2014.....	21
Tabla 2. Manifestaciones autoinmunes en la IDCv.....	23
Tabla 3. Subpoblaciones de Linfocitos T identificadas en timo.....	38
Tabla 4. Subpoblaciones de Linfocitos B identificadas en médula ósea.....	44
Tabla 5. Subpoblaciones de Linfocitos B identificadas en bazo.....	48
Tabla 6. Medias de los factores calculados utilizando PHA como estímulo.....	53
Tabla 7. Medias de los factores calculados tras la estimulación con PKW en linfocitos B humanos, durante 48 horas.....	58
Tabla 8. Medias de los factores calculados tras la estimulación con PKW en linfocitos B humanos, durante 72 horas.....	60

Resumen

La proteína LRBA, (por sus siglas en inglés de *Lypopolisaccharide (LPS)-responsive beige-like anchor*), es una proteína localizada en la mayoría de los órganos del organismo, aunque en mayor cantidad en los órganos del sistema inmune. Su expresión es inducida en linfocitos B y macrófagos por lipopolisacáridos bacterianos (LPS).

En el presente trabajo de investigación, se pretende acercarse al entendimiento del funcionamiento de esta proteína en las células del sistema inmune. Se realizó el análisis de subpoblaciones de células B en médula ósea y bazo, y de células T en timo de ratones *Lrba+/+*, *Lrba+/-* y *Lrba-/-*, con la finalidad de realizar una comparación y determinar las diferencias encontradas en el ratón deficiente de la expresión de *Lrba*. Se lograron observar ciertas anomalías en células importantes como lo son los linfocitos B transicionales, durante esta etapa en la diferenciación de los linfocitos B se lleva a cabo la eliminación de células reactivas, por lo que esta alteración podría estar relacionada con el desarrollo de autoinmunidad; así como también se encontraron diferencias en los linfocitos B maduros, que posteriormente darán lugar a la formación de células de memoria. Por otro lado, se analizó su expresión en linfocitos T y B humanos la cual se determinó que es inducible al realizar la activación de estas células con ciertos estímulos policlonales, así como se logró observar una mayor respuesta por parte de los linfocitos B de memoria, células que se reportan alteradas en las personas deficientes de la expresión de la proteína LRBA.

Introducción

La inmunología es el estudio del **sistema inmune**. El sistema inmune es el sistema de defensa del organismo en contra de la invasión por entidades externas, incluyendo infecciones, agentes inertes y células tumorales. El funcionamiento normal del sistema inmune da lugar a la **inmunidad**, palabra derivada de la palabra latina *inmunitas*, que significa “estar exento”. (Tal & Mary, 2006)

El funcionamiento normal del sistema inmune involucra la participación coordinada de todos y cada uno de sus componentes, de lo contrario, la respuesta inmune se verá afectada, y podrán ocurrir enfermedades tales como inmunodeficiencia, autoinmunidad o alergia. (Sanz M., 2017)

Recientemente se ha demostrado que la proteína LRBA juega un papel importante para el funcionamiento correcto del sistema inmunológico, ya que su ausencia resulta en un fenotipo clínico de inmunodeficiencia y autoinmunidad; sin embargo, su función biológica aún se mantiene desconocida. (Wang, 2014)

Antecedentes

Sistema inmune

Hoy en día, la inmunología moderna puede ser definida como: “*el estudio del reconocimiento de entidades no propias; de la activación, desarrollo y funciones específicas de defensa de los linfocitos; de las interacciones de los linfocitos con otras células; y de la investigación de los genes y proteínas que participan en esas interacciones*”.(Tak & Mary, 2006).

El sistema inmune ha evolucionado para proteger al organismo y mantener la integridad de este; lo protege de entidades no propias, como virus, bacterias y parásitos, pero también materiales inertes y en algunas ocasiones, se desarrollan amenazas generadas por el mismo huésped, como el cáncer. El sistema inmune es un sistema de células, tejidos, y sus productos solubles que reconocen, atacan y destruyen a lo que es “extraño” al cuerpo o identificado como “no propio”. (Sánchez Ramón, 2013).

Los vertebrados son capaces de realizar dos tipos de respuestas inmunes: innata y adaptativa. La respuesta adaptativa es capaz de distinguir antígenos propios de los extraños, mientras que la innata reconoce patrones moleculares (PAMPs, MAMPs, DAMPs), por lo que difieren en el grado de especificidad, el tiempo de respuesta, la presencia de recombinación genética, los tipos de receptores que expresan y la presencia o no de memoria; sin embargo, se encuentran estrechamente relacionadas. (Sanz M., 2017).

Inmunidad innata

La inmunidad innata abarca barreras anatómicas y fisiológicas (piel, saliva, jugos gástricos, el sistema del complemento, etc.), internalización celular (fagocitosis) y respuestas inflamatorias que son rápidamente inducidas por la presencia de antígenos. Los mecanismos de la inmunidad innata inhiben la entrada de patógenos a través de sus barreras físicas, previenen el establecimiento de infecciones y limpian los restos celulares del huésped y de los microorganismos. Algunos mecanismos de la inmunidad innata son completamente inespecíficos,

mientras otros envuelven reconocimiento de patrones de estructuras conservadas conocidos como PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos), los cuáles son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que son expresados en células NK, macrófagos y neutrófilos. Los PRRs reconocen patrones de estructuras derivadas de componentes o productos de que son comunes a una gran variedad de microorganismos como, por ejemplo, la flagelina, el ADN bacteriano, ARN viral, entre otros. Las células de la respuesta inmune innata, además, liberan citocinas que son críticas para la activación y diferenciación de los linfocitos, lo cual inicia la actividad de la inmunidad adaptativa. Las citocinas son fundamentales para el funcionamiento del sistema inmune, ya que son las encargadas de activar o inhibir el funcionamiento de las células efectoras del sistema inmunológico. (Martín E. Reyes, 2013).

Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa difiere de la inmunidad innata en: especificidad, memoria, diversidad y tolerancia. La especificidad en el contexto de la inmunidad adaptativa significa que todas las fases de la respuesta son específicas para un único antígeno; esta respuesta se encuentra regulada por los linfocitos B y T. Estas células serán activadas específicamente por los antígenos que reconozcan sus receptores, realizarán su expansión clonal seguida de su diferenciación, para finalmente producir células de memoria, lo cual asegurara una respuesta rápida y eficiente en un segundo encuentro con el mismo antígeno. (Yatim & Lakkis, 2015)

Células y tejidos del sistema inmune

Las células que llevan a cabo la respuesta innata y adaptativa son colectivamente llamadas leucocitos, por lo que son las células efectoras del sistema inmune. Los leucocitos residen en tejidos y órganos especializados, y llegan a diferentes tejidos del organismo a través de la sangre y de un sistema de vasos, el sistema linfático.(Eva Lévy, 2016).

Los neutrófilos desempeñan un papel clave en el sistema inmune innato, ya que representan la primera línea de defensa del organismo y son las células del

sistema inmune que se encuentran en mayor abundancia en la sangre periférica (70% aproximadamente). Los neutrófilos usan la fagocitosis para destruir no-específicamente bacterias y otros patógenos, además de que secretan sustancias antimicrobianas en los sitios de infección. (G. Camicia, 2013).

Los monocitos son los precursores de muchas células del sistema inmune como los macrófagos. Los monocitos, células dendríticas y macrófagos, también conocidos como fagocitos mononucleares, se encargan de la presentación de antígeno a otras células del sistema inmune como los linfocitos T, por lo que se denominan células presentadoras de antígeno (CPA), también realizan fagocitosis e inmunomodulación mediante la activación de la respuesta inmune. (Godini R, 2018).

Los linfocitos B y T, son los responsables de la respuesta inmune adaptativa con la colaboración e inicio por parte de la respuesta inmune innata. En la *figura 1* se muestra la ubicación de las células del sistema inmune en el organismo.

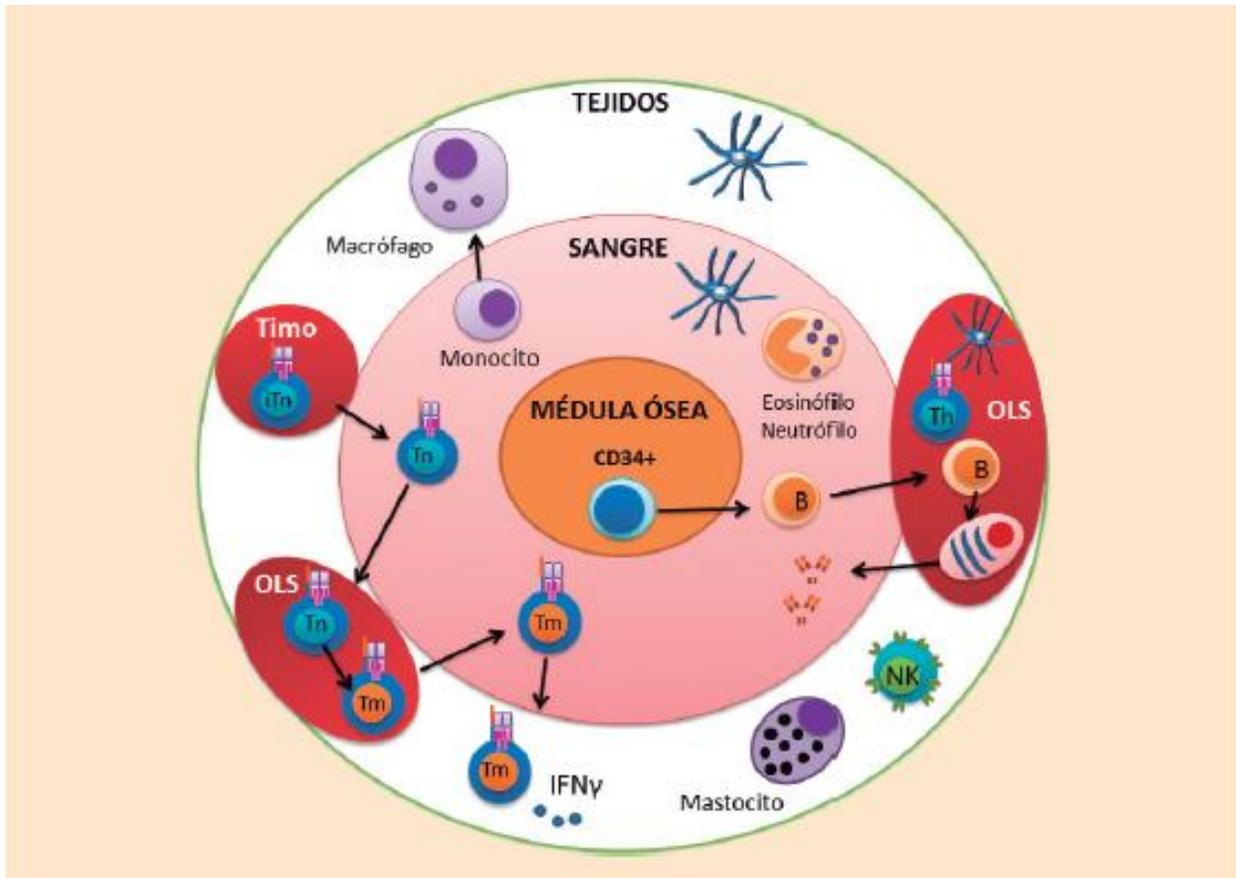


Figura 1. Distribución de las células del sistema inmune en el organismo. IFN: Interferon, NK: Naturalkiller, Th: Linfocito T cooperador, Tm: linfocito T de memoria, iTn: linfocito T virgen inmaduro, Tn: linfocito T virgen, B: linfocito B, OLS: órganos linfoides secundarios. (Tomado de Sanz M., 2017).

El sistema inmune de los vertebrados incluye tejidos y órganos especializados, llamados tejidos linfoides. Los órganos linfoides primarios son los sitios de desarrollo y maduración de las células encargadas de desarrollar la respuesta inmune. En los mamíferos, los órganos linfoides primarios son la médula ósea y el timo. La medula ósea es donde surgen todos los linfocitos y donde maduran los linfocitos B. Durante la diferenciación de linfocitos B y T, se eliminarán a las células que reconozcan antígenos propios, y las demás continuarán con su maduración. Los linfocitos T recién formados maduran en el timo. Los linfocitos recién producidos, abandonan los órganos primarios y migran a través de la sangre y la linfa a los tejidos linfoides secundarios. (Yatim and Lakkis, 2015)

Los tejidos linfoides secundarios incluyen el bazo, los nódulos linfoides, el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, *por sus siglas en inglés*) y el tejido linfoide asociado a piel (SALT, *por sus siglas en inglés*); su función es atrapar antígenos a través de la circulación (bazo), del sistema linfático (nódulos linfoides), de las mucosas (MALT) y de la piel (SALT). Los tejidos linfoides secundarios son estructuras celulares organizadas en zonas de linfocitos T y B y son los sitios más importantes de acción de la respuesta inmune adaptativa ya que en ellos se lleva a cabo el reconocimiento de antígenos, así como la activación de células del sistema inmune por medio de citocinas y moléculas de adhesión, las acciones efectoras por parte de estas y finalmente, se genera la memoria inmunológica. (Yatim & Lakkis, 2015). En la *figura 2* se presenta un esquema del cuerpo humano y la ubicación de los órganos y tejidos del sistema inmune.

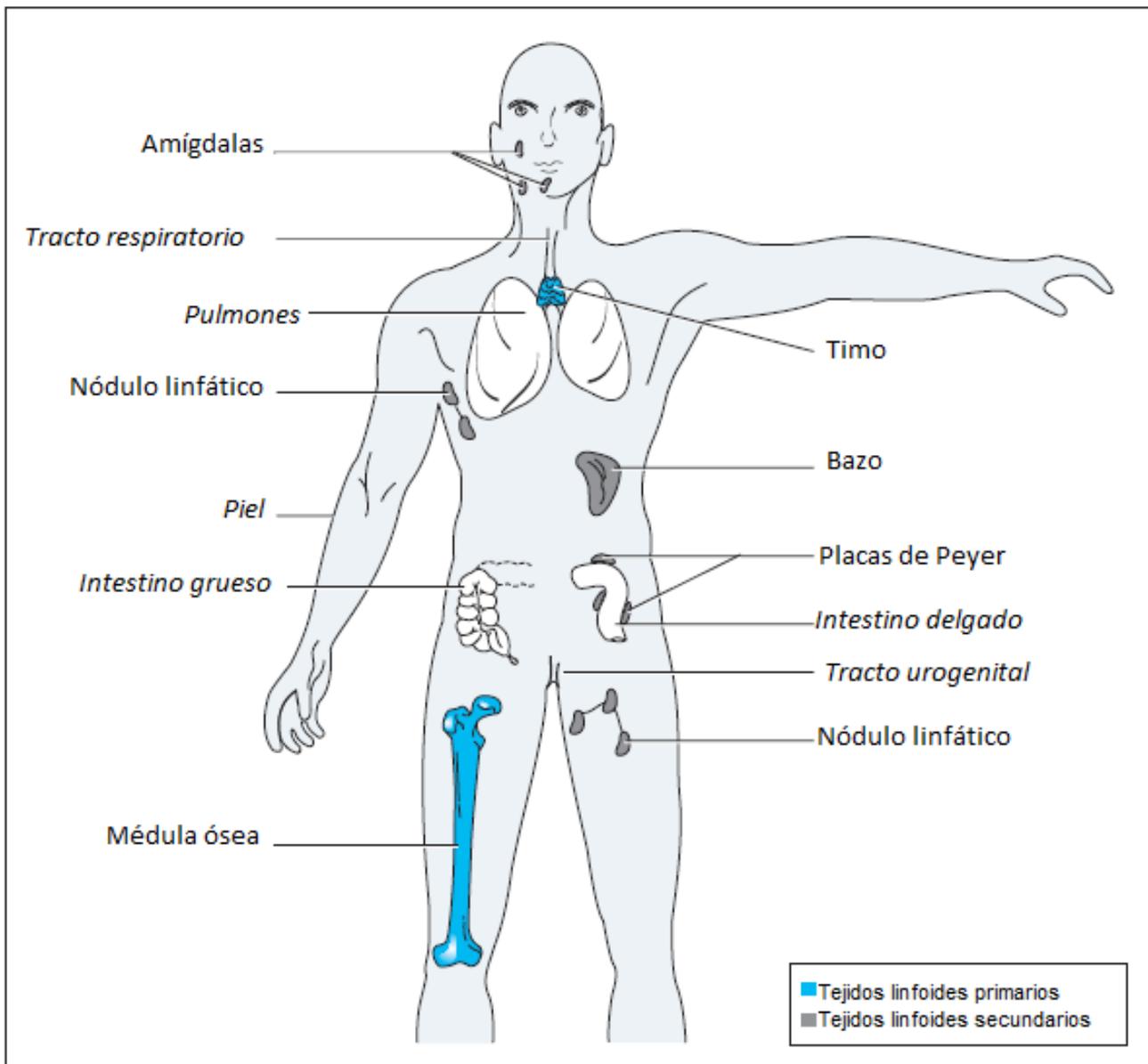
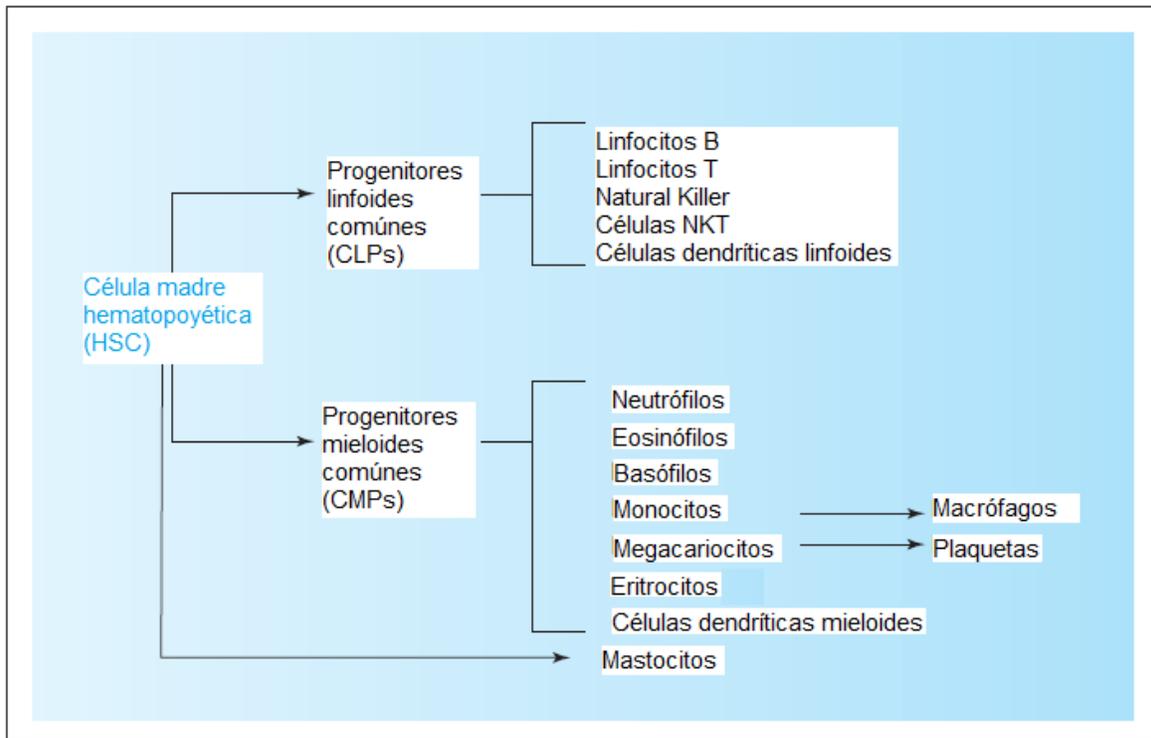


Figura 2. Principales órganos y tejidos del sistema inmune. Los órganos linfoides primarios se muestran en azul (médula ósea y timo). Aunque únicamente se muestra el fémur, otros huesos en el cuerpo también contienen médula ósea. Los tejidos linfoides secundarios se muestran en gris (bazo, nódulos linfoides y amígdalas). No se muestran todos los nódulos linfoides. Los sitios donde los patógenos comúnmente ingresan al cuerpo y donde se encuentran colecciones difusas de células linfáticas se muestran en *cursivas*. (Tomado y traducido al español de Tak & Mary, 2006)

Médula ósea

Todas las células hematopoyéticas son derivadas en la médula ósea a partir de un precursor común llamado célula madre hematopoyética, en un proceso llamado hematopoyesis. Las células hematopoyéticas se clasifican siendo del linaje mieloide o del linaje linfoide, en el *cuadro 1* se presentan los linajes y las líneas celulares que corresponden a cada uno, como puede observarse los linfocitos B, T, NK y las células dendríticas se desarrollan a partir de progenitores linfoides, mientras que los neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y las células dendríticas se desarrollan a partir de un progenitor mieloide. En el momento en que las células hematopoyéticas van ganando madurez, abandonan la médula ósea y entran a la circulación. Los eritrocitos permanecen en la circulación, mientras que los leucocitos se distribuyen entre la sangre y los tejidos. (Zhao E, 2012).



Cuadro 1. Modelo de la hematopoyesis. Una célula madre hematopoyética es influenciada por su microambiente y la actividad de varios factores de transcripción y citocinas para producir células madres comprometidas al linaje linfocítico o al linaje mielocítico. Todas las células rojas (eritrocitos) y las células blancas (leucocitos) en el cuerpo surgen de estos dos linajes. Conforme avanza la diferenciación, la capacidad de las células para auto-renovarse disminuye, pero el número absoluto de células aumenta debido a la división celular. *Tomado y traducido al español de (Tak & Mary, 2006).*

La diferenciación de los linfocitos B tiene lugar en la médula ósea

Desde un punto de vista molecular, los linfocitos B maduran tras realizar la recombinación de las regiones V, D, J que conforman al gen que codifica para el receptor de linfocitos B (B-cell receptor [BCR]). (A. Prieto Martín, 2013). Los linfocitos B y sus anticuerpos son los elementos centrales de la inmunidad humoral, son parte de la inmunidad adaptativa y protegen en contra de una variedad casi ilimitada de patógenos. (Kathrin Pieper, 2013).

Durante el proceso de diferenciación, las células que producen receptores funcionales y no autorreactivos son seleccionados, de lo contrario, son eliminadas o reprogramadas; a este proceso se le conoce como selección positiva y selección negativa. (A. Prieto Martín, 2013).

Las fases de diferenciación de los linfocitos B comienzan en el estadio de linfocitos pro-B (progenitoras B), seguido de un linfocito pre-B hasta llegar a la expresión de IgM de membrana y convertirse en linfocito B inmaduro. (A. Prieto Martín, 2013).

Los linfocitos B inmaduros abandonan la médula ósea y migran al bazo, donde finalizan su maduración y se diferencian en células vírgenes, foliculares o de zona marginal. (Kathrin Pieper, 2013).

Los linfocitos B inmaduros se distinguen de los maduros por su incapacidad para proliferar en respuesta al entrecruzamiento de su BCR. Estos linfocitos en proceso de maduración se denominan **linfocitos B transicionales**. Los linfocitos B transicionales comienzan su diferenciación en el estadio 1 (T1) donde se eliminarán las células autorreactivas, esta población expresa la molécula CD24 en su superficie, y expresa con baja intensidad la molécula CD21 (CD24⁺ CD21^{low}). Las células T1 que superan la selección negativa continúan al estadio 2 (T2), donde la expresión de CD21 incrementa notablemente al ganar madurez (CD24⁺ CD21⁺), a las células que expresan CD21 y CD24 con baja intensidad se consideran linfocitos B maduros. (Hamilton JA, 2017).

Los linfocitos B maduros se pueden diferenciar en dos subtipos según su expresión de antígenos de superficie y localización: **los linfocitos B de zona marginal (MZ) y linfocitos B foliculares (FO)**. Los linfocitos B MZ, se localizan en el perímetro de la pulpa blanca, entre los senos marginales y el borde de la pulpa roja del bazo. Expresan niveles elevados de IgM, CD21, CD1 y CD9, con niveles bajos de IgD, CD23, CD5 y CD11b. Estas células dan lugar a una respuesta primaria rápida, fundamentalmente de IgM, a diferencia de los linfocitos FO que son capaces de cambiar el isotipo de IgM a IgG, IgA o IgE. Los linfocitos B MZ participan en respuestas de anticuerpos tempranas de una manera timo-independiente con antígenos que ingresan a la circulación sanguínea gracias a su

ubicación estratégica. Se convierten rápidamente en células plasmáticas de vida corta y no requieren la cooperación por parte de los linfocitos T, se trata de una primera barrera de defensa por parte de la inmunidad adaptativa. (Kraal and Mebius, 2006).

La mayoría de los linfocitos B en el bazo son linfocitos B FO, expresan altos niveles de IgM, IgD y CD23, y bajo de CD21. Se incorporan a los folículos primarios alrededor de células dendríticas foliculares (FDC) en la pulpa blanca del bazo y las áreas corticales de los ganglios linfáticos. Se desplazan entre las FDC buscando antígenos que reconocen y requieren de la cooperación de los linfocitos T cooperadores (Th) a través de CD40-CD40L para cambiar de isotipo y diferenciarse en linfocitos B de memoria productores de anticuerpos de alta afinidad, esta es una respuesta que requiere de la participación de más células, por lo que da como resultado la memoria inmunológica. (Kathrin Pieper, 2013).

En la *figura 3*, se observa un esquema del proceso de diferenciación y maduración de los linfocitos B desde la médula ósea hasta su llegada a los órganos linfoides secundarios.

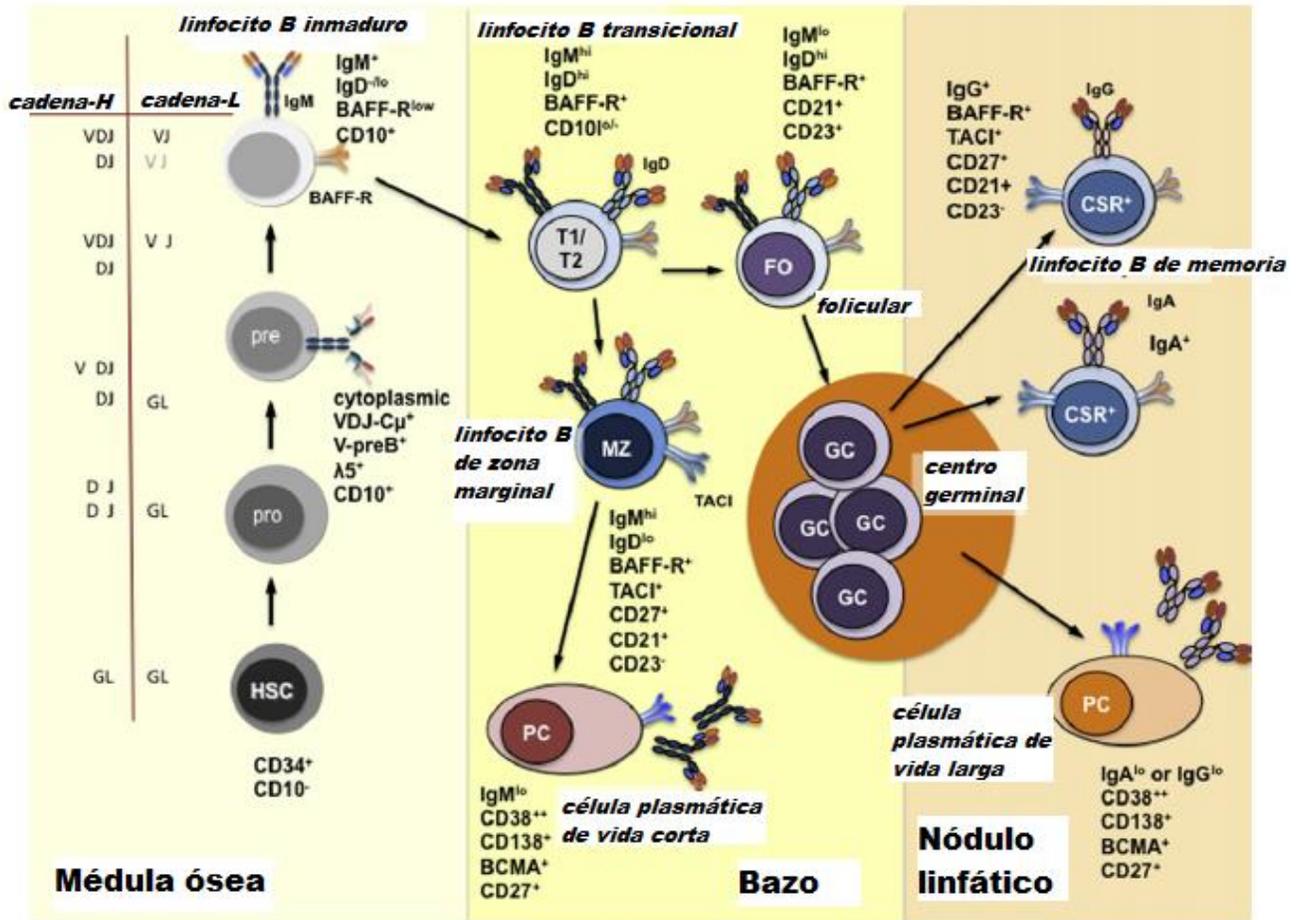


Figura 3. Desarrollo y subpoblaciones de linfocitos B. Los linfocitos B se desarrollan en la Médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas (HSC). Los reordenamientos en la cadena pesada (cadena-H) de los segmentos génicos V, D y J de la línea germinal (GL) comienzan en el estadio pro-B. El reordenamiento del segmento del gen V comienza en el pre-B. En los linfocitos pre-B CD10⁺CD19⁺, las cadenas H funcionales (VDJ-Cμ) se empareja con V-preB y λ-like, formando el pre-BCR, el cual se expresa dentro de la célula y no es detectado en la superficie. La cadena L, κ o λ, reordenada exitosamente reemplaza a V-preB/λ5 del pre-BCR, se empareja con la cadena H y forman la IgM. La IgM expresada por los linfocitos B inmaduros cambia los patrones de expresión de muchos genes e inicia el egreso a circulación. Los linfocitos B inmaduros ingresan al bazo como linfocitos B transicionales, donde reciben

señales de supervivencia a través de citocinas como BAFF (Factor activador de linfocitos B) completando su primer estadio de maduración como linfocitos B MZ o linfocitos B foliculares. Después del contacto con antígenos y con apoyo de neutrófilos cooperadores de linfocitos B (N_{BH}), los linfocitos B MZ se diferencian en células plasmáticas de vida corta. Los linfocitos B foliculares se activan tras interactuar con sus antígenos y se diferencian en los centros germinales con el apoyo de linfocitos T cooperadores (Th) en linfocitos B de memoria con cambio de isotipo (CSR+) o en células plasmáticas (PC). (Tomado y traducido al español de Kathrin Pieper, 2013).

Pese a que la función principal de los linfocitos B es la producción de anticuerpos, estas células ejercen otras funciones importantes. Una de ellas es su papel **como células presentadoras de antígeno** a los linfocitos T. La presentación de antígeno por los linfocitos B es especialmente relevante en el contexto de las enfermedades autoinmunes. Otra función importante de los linfocitos B es su papel como **células inmunorreguladoras**, ya que secretan citocinas e influyen en la acción de otras células. Finalmente, los linfocitos B se diferencian a células de memoria; estos producen anticuerpos de alta afinidad y cambian el isotipo del anticuerpo que expresan, los cuáles, nos protegen permanentemente al recordar los antígenos que los estimularon y producir eficientemente IgG, IgA o IgE, además de ser intermediarios en la activación de los linfocitos T. (A. Prieto Martín, 2013).

La diferenciación de las células T se lleva en el Timo

Los linfocitos T provienen de precursores que se originan en la médula ósea y de ahí migran al timo, donde tiene lugar su maduración. Los linfocitos T presentan un receptor de membrana homólogo a las inmunoglobulinas (Ig) conocido como TCR (*T-cell-receptor*), el cual, de manera similar al BCR, requiere también de recombinación VDJ para poder formar un TCR funcional. Mediante este receptor,

los linfocitos T son capaces de identificar el antígeno de forma específica. Sin embargo, a diferencia de los linfocitos B, los linfocitos T necesitan que el antígeno sea procesado en péptidos cortos (8-30 aminoácidos) y presentarlos en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). (D. Díaz Martín A. P.-M., 2013).

Existen dos tipos fundamentales de linfocitos T: los citotóxicos (Tc), que presentan en su membrana plasmática la molécula correceptora CD8, y los cooperadores (Th [T *helper*]) que expresan la molécula correceptora CD4. Los linfocitos Tc detectan los péptidos presentados por medio de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I). Su función efectora principal es lisar a las células que presentan péptidos extraños por medio de la activación de una cascada de proteínas efectoras; por ejemplo, péptidos presentados en MHC-I por una célula infectada por un virus. Los linfocitos Th reconocen, por su parte, péptidos presentados por medio de MHC-II. Su función es dar soporte y apoyo a las respuestas inmunes y ayudar o estimular que otras células del sistema inmune como linfocitos Tc, linfocitos B y fagocitos funcionen correctamente. (D. Díaz Martín A. P.-M., 2013).

Un grupo de proteínas se asocian al TCR y se denominan CD3, formando parte del complejo TCR/CD3. Por ello el marcador CD3 identifica por definición a todos los linfocitos T. Las cadenas restantes son variables y su función es la transducción de señales. (D. Díaz Martín A. P.-M., 2013).

El timo es el sitio de maduración de los linfocitos T, donde únicamente los linfocitos T que sobreviven a la selección tímica maduran y logran ser inmunocompetentes. Los precursores de linfocitos T, CD4- CD8-, llamados timocitos dobles negativos (DN), llegan de la hematopoyesis en el hígado fetal y en la médula ósea y migran a través del sistema circulatorio al timo, un órgano pequeño bilobulado localizado arriba del corazón. (D. Díaz Martín H. B.-M., 2013).

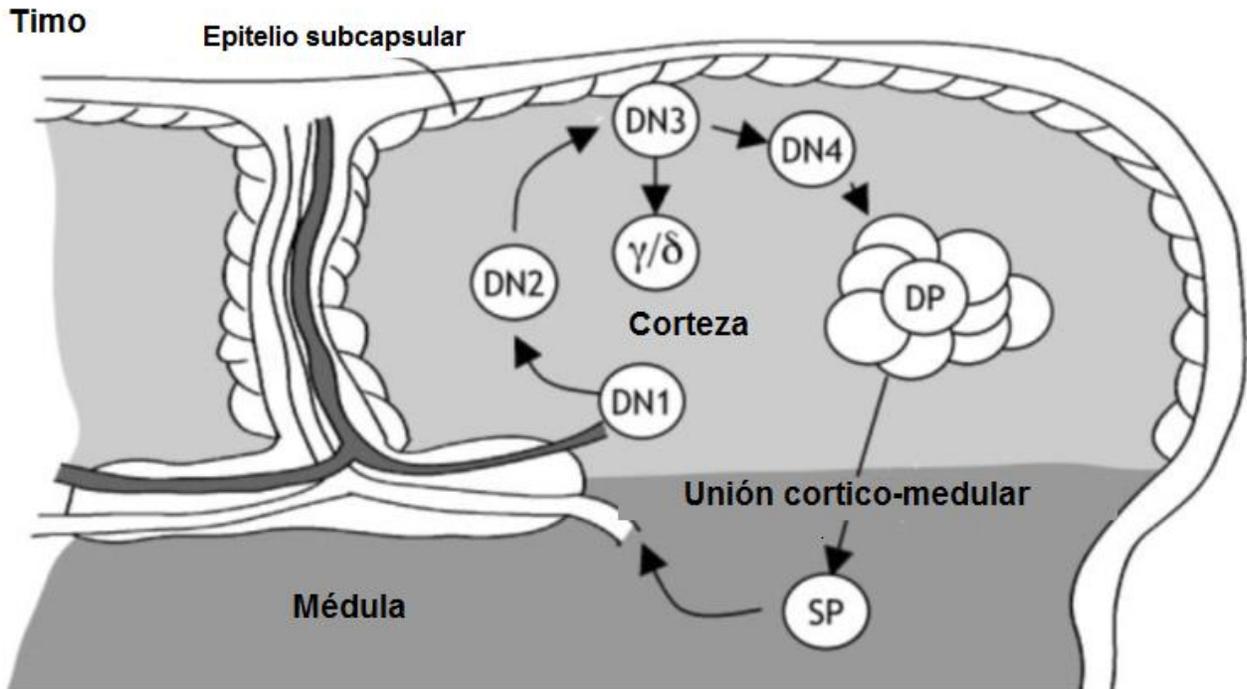


Figura 4. Diferenciación de linfocitos T en timo. Los progenitores de médula ósea DN1 (CD44+ CD25-) ingresan al timo. Al migrar desde el epitelio subcapsular aumentan la expresión de CD25 (DN2), y disminuyen la de CD44 (DN3). En esta etapa se comienza a reordenar el TCR β , posteriormente se deja de expresar CD25 (DN4) y comienza la proliferación y expresión de CD4 y CD8. Continúan los rearrreglos del TCR α , y los timocitos pasan por la selección positiva y negativa. Las células que sobreviven a la selección migran a través de la médula para abandonar el timo. (Tomado de Starr Timothy K, 2003)

El timo contiene cuatro distintas subpoblaciones de maduración de los linfocitos T, y cada una se encuentra en distintas regiones del timo: los timocitos DN están presentes en la corteza externa, en este punto pasan por distintas etapas de diferenciación, hasta que se da lugar a la expresión de las moléculas CD4 y CD8, por lo que se denominan linfocitos T dobles positivos (DP) que ocupan la corteza interna del timo; finalmente se disminuye la expresión de uno de los correceptores y se obtienen linfocitos simples positivos, CD4+ o CD8+ que se encuentran en la

médula del timo. Las células que posean un TCR funcional y que no sean autorreactivas serán capaces de sobrevivir a la selección positiva y negativa, y darán lugar a linfocitos CD4+ o CD8+ restringidos por el MHC que finalmente abandonaran el timo para ingresar a la circulación como linfocitos T maduros. (Starr Timothy K, 2003).

Órganos linfoides secundarios

Existen diferentes órganos linfoides secundarios, sin embargo, para fines del entendimiento del presente trabajo, nos centraremos en el bazo.

Bazo

El bazo es el órgano linfoide de mayor tamaño, lleva a cabo la filtración sanguínea y atrapa antígenos que se encuentran en la sangre, funciona como un “filtro” por el cual pasa toda la sangre que circula por el organismo, lo cual lo convierte en una pieza fundamental en la identificación de antígenos extraños; el volumen total de sangre en los adultos pasa a través del bazo cuatro veces al día. Es un órgano capsulado y tiene una ubicación intraperitoneal y una morfología ovoidea. Se ubica en el hipocondrio izquierdo del abdomen. Está constituido por pulpa roja y blanca, cumpliendo funciones en el mecanismo de defensa del organismo y en la eliminación de células sanguíneas (eritrocitos y plaquetas). La **pulpa blanca** conforma el 20% del bazo y es dominada por linfocitos. La **pulpa roja**, llamada así por su abundancia en eritrocitos, rodea a la pulpa blanca y funciona principalmente en la filtración de material particulado de la sangre y en la disposición de eritrocitos y leucocitos deficientes o senescentes. (N. Larrañaga, 2014).

Los antígenos que se encuentran en circulación entran al bazo por la **arteria esplénica**. La arteria esplénica se ramifica en una red de arterias y arteriolas que viajan a través del órgano. Cada arteriola se encuentra rodeada por **la vaina linfática periarterial (PALS)**, un arreglo cilíndrico de tejido poblado principalmente por linfocitos T maduros y que también contiene números bajos de células plasmáticas, macrófagos, y células dendríticas interdigitantes. Los antígenos son

tomados por las células dendríticas residentes, las cuales los presentan y activan a los linfocitos T. Rodeando a los PALS se encuentran los **folículos** primarios con linfocitos B y macrófagos. Cuando los antígenos son atrapados cerca de estos linfocitos B, son estimulados para formar **centros germinales**, que después se llenan con linfocitos B activados. Rodeando a los folículos se encuentra la **zona marginal**, que también contiene subpoblaciones de linfocitos B. La composición total de linfocitos en el bazo es de ~40% linfocitos B, 50% linfocitos T CD4+, 10% linfocitos T CD8+ y menos del 5% de células NK. (Tak & Mary, 2006). En la *figura 4* se presenta la estructura interna del bazo.

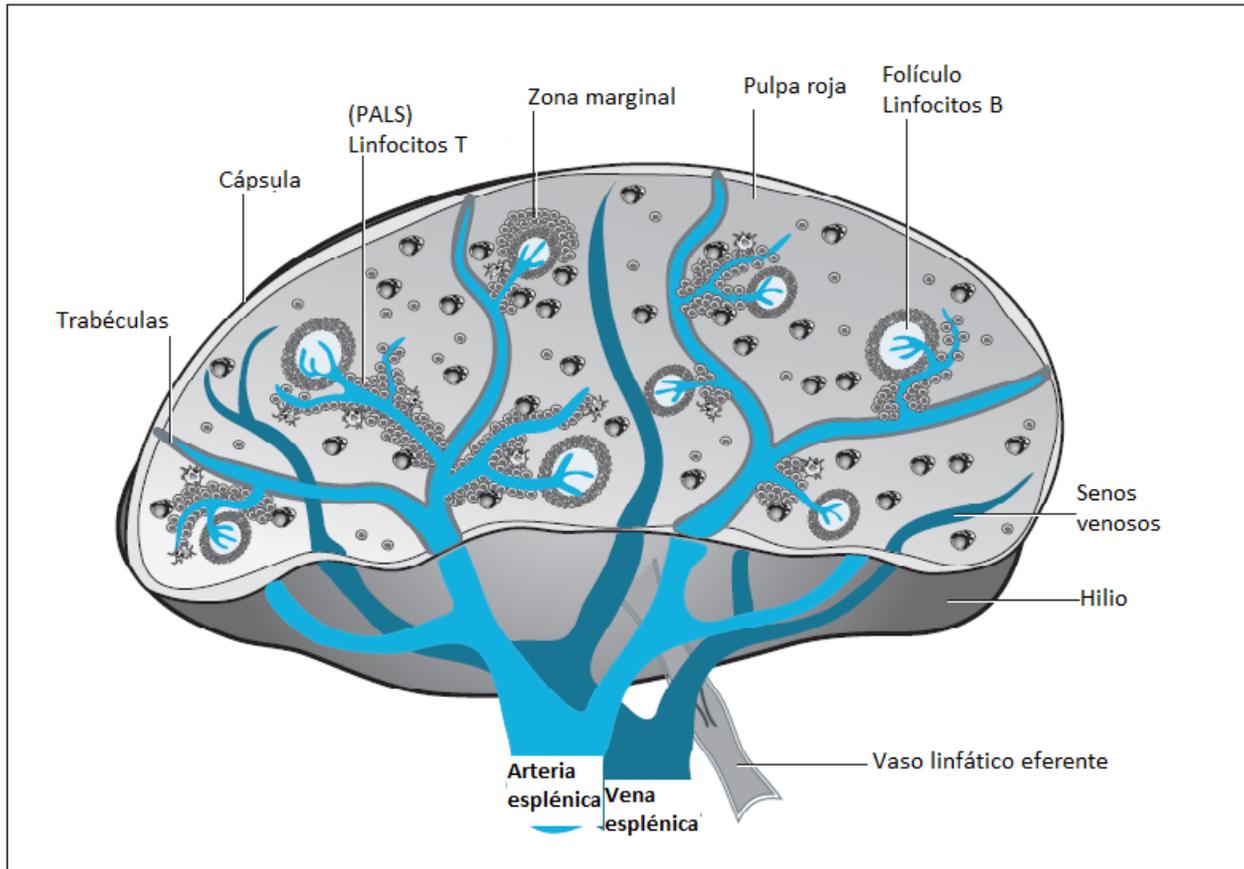


Figura 5. El bazo. La pulpa blanca está compuesta por la vaina linfática periarterial (PALS) ricos en linfocitos T y por folículos de linfocitos B. Las PALS, con linfocitos en su mayoría, junto con algunas células plasmáticas, macrófagos y células dendríticas interdigitantes, rodean las arterias que salen de las trabéculas. Los folículos de linfocitos B primarios y secundarios se localizan a lado de las PALS, usualmente en las ramificaciones arteriales. Los folículos tienen una zona marginal bien definida, que

contiene linfocitos B de memoria en su mayoría. Estos están en proximidad cercana a la pulpa roja, que forma cerca del 75% del volumen esplénico. La pulpa roja está compuesta por cordones esplénicos, una malla de macrófagos, linfocitos, fibroblastos, y fibras de colágeno, y los senos venosos, los cuales son rojos debido a la abundancia de eritrocitos. Tomado de (Tak & Mary, 2006)

Inmunodeficiencias primarias

Las inmunodeficiencias se clasifican en: **inmunodeficiencias hereditarias o inmunodeficiencias primarias (IDPs)** e inmunodeficiencias adquiridas o secundarias.

Las IDPs son enfermedades congénitas causadas por alteraciones cuantitativas y/o funcionales de distintos procesos de la respuesta inmune. Se caracterizan por predisposición a infecciones, tendencia a autoinmunidad, alergia y enfermedades linfoproliferativas. Las IDPs varían en proporciones según su clasificación, siendo más frecuentes las de tipo humoral (50-60%), seguidas las deficiencias combinadas (15%), las deficiencias de fagocitos (10%) y finalmente las deficiencias celulares y de complemento (5%). (Leticia Yáñez, 2016). En la *tabla 1* se muestran la clasificación de las inmunodeficiencias primarias.

Las IDPs se suelen diagnosticar en la infancia, especialmente en el primer año de vida. Sin embargo, hasta en un 25% de los casos se diagnostican en la edad adulta. (V. González de la Calle, 2016).

Combinado con el enorme aumento del conocimiento acerca de la función y la diversidad genética de los humanos, desde que se descifró el genoma humano, las inmunodeficiencias primarias son una fuente de mutaciones que sigue creciendo y brindando oportunidades únicas para el estudio de la función del sistema inmune humano. (Kathrin Pieper, 2013)

Inmunodeficiencias combinadas de células T y B
Déficit predominante de anticuerpos
Otros síndromes de inmunodeficiencias bien definidas
Enfermedades de disregulación inmune
Defectos del número y/o función fagocítica
Defectos en la inmunidad innata
Deficiencias del complemento
Desórdenes autoinflamatorios
Fenocopias de IDP

Fuente: Al-Herz et al.⁹.

Tabla 1. Clasificación de las inmunodeficiencias primarias según la *International Union of Immunology Societies (IUIS)* en 2014. (Leticia Yáñez, 2016).

Inmunodeficiencias primarias de anticuerpos

Las IDPs de anticuerpos o humorales representan las enfermedades genéticas del sistema inmunitario más frecuentes y las primeras en ser descritas durante la historia de la inmunología. Los anticuerpos se reconocieron como parte de la respuesta inmunitaria humoral desde hace más de un siglo, tiempo después de su descubrimiento se reconoció la primera IDP de anticuerpos: la agammaglobulinemia, seguida por la inmunodeficiencia común variable y el síndrome de hiper-IgM. (G. López Herrera, 2016)

Inmunodeficiencia común variable (IDCV)

La IDCV es la inmunodeficiencia primaria sintomática de tipo humoral más frecuente en el adulto, manifestándose con mayor frecuencia a partir de la segunda o tercera década de la vida y afectan tanto a hombres como a mujeres. Se caracteriza porque los pacientes presentan infecciones recurrentes debido a un déficit en la producción de anticuerpos. (Marinovic, 2012).

La IDCV presenta, además, una alteración más profunda en la función de los linfocitos B, que condiciona una disminución de todos los isotipos de

inmunoglobulinas, especialmente IgG e IgA. Los niveles de IgM pueden permanecer normales e incluso disminuidos. (Díez Rubén, 2010). Además de sus defectos en células B, la IDCV también se asocia con defectos en número y función, así como en la proliferación y activación de linfocitos T y células NK. Laura Berrón R. et al reportaron alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8, lo cual podría deberse a apoptosis espontánea y reducción del tamaño del timo. También se ha reportado que los pacientes adultos que padecen IDCV presentan una disminución en los linfocitos B de memoria (L. Berrón Ruiz, 2014).

La IDCV se asocia de manera frecuente con enfermedades autoinmunes como lupus, enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria intestinal o citopenias autoinmunes. La aparición de enfermedades autoinmunes refleja la profunda desregulación del sistema inmune. Esta inmunodeficiencia condiciona también la aparición de infecciones recurrentes de los tractos respiratorio y gastrointestinal. El aparato respiratorio constituye, quizás, el órgano más afectado, principalmente por las infecciones, y su afectación suele llevar al diagnóstico de la inmunodeficiencia. (Díez Rubén, 2010). En la *tabla 2* se muestran las enfermedades autoinmunes derivadas de la IDCV.

HEMATOLÓGICAS:
• Citopenias autoinmunes
• Anemia hemolítica autoinmune
• Púrpura trombocitopénica idiopática
• Neutropenia autoinmune
GASTROINTESTINALES:
• Anemia perniciosa
• Gastritis atrófica
• Enfermedad celíaca
• Cirrosis biliar primaria
• Enfermedad inflamatoria intestinal
REUMATOLÓGICAS:
• Síndrome de Sjögren
• Lupus eritematoso sistémico
• Artritis Reumatoide
• Artritis Crónica Juvenil
• Vasculitis
ENDOCRINOLÓGICAS:
• Tiroiditis de Hashimoto
• Diabetes Mellitus tipo 1
DERMATOLÓGICAS:
• Vitiligo
• Alopecia
NEUROLÓGICAS:
• Síndrome de Guillain Barré

Tabla 2. Manifestaciones autoinmunes en IDCV. (Marinovic, 2012).

La IDCV se asocia con mutaciones en LRBA

La proteína LRBA, (por sus siglas en inglés de *Lypopolisaccharide (LPS)-responsive beige-like anchor*), es codificada por *LRBA*, un gen esencial para el funcionamiento normal del sistema inmune; tiene un peso de 319kD y está compuesta por múltiples dominios. Su expresión es inducida en linfocitos B y macrófagos por lipopolisacáridos bacterianos. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual LRBA regula al sistema inmune, permanece desconocido (Wang J, 2014).

En un principio se le llamo *Lba* al gen que codifica para la proteína conocida como *Lrba* hoy en día. Se demostró que *Lba* presentaba regulación positiva en linfocitos B de ratones en presencia de LPS y a partir de los estudios realizados en *Lba* se revelaron los primeros indicios de la participación de LRBA en el tráfico vesicular tras la activación de células del sistema inmune (Wang J., 2001).

Esta proteína pertenece a la familia de genes WLD-BEACH-W40 (WBW) y está localizada en el citoplasma con el aparato de Golgi, lisosomas, retículo endoplásmico, membrana plasmática, y retículo endoplásmico perinuclear. Los miembros de la familia de genes WBW, parecen funcionar como proteínas soporte en el tráfico vesicular y son importantes en enfermedades humanas. Se cree que LRBA se asocia con la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y puede estar involucrada en el reclutamiento de vesículas intracelulares a diversos receptores celulares, lo que resulta en la secreción y/o disposición membranal de moléculas inmunes efectoras (López Herrera, 2012). En la *figura 6* se muestra un esquema que representa la estructura de la proteína LRBA y se muestran además algunas mutaciones que se han reportado en este gen para casos de IDCV.

Se cree que LRBA interactúa con múltiples vías de transducción de señales importantes, incluyendo posiblemente al receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), Notch, PKA, Ras, E2F1, p53 y proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), LC3 y LIR. Debido a que se ha encontrado que la expresión de *LRBA* se encuentra regulada positivamente en células cancerosas,

se ha sugerido que la proteína actúa como un regulador positivo de la supervivencia celular promoviendo la proliferación y previniendo la apoptosis y posiblemente regulando el proceso de autofagia. (López Herrera, 2012),(Wang J, 2014).

Se cree también que LRBA podría estar involucrada en la secreción de anticuerpos y citocinas, en el reciclamiento de proteínas de membrana, y en el tráfico de proteínas entre distintos compartimentos, o proteínas para degradación por autofagia o por proteosoma. (Wang J, 2014)

La proteína LRBA en humanos y Lrba en ratones son idénticas en un 90% (2587/2859) con homología de aminoácidos del 94% (2690/2859). Se han identificado 3 isoformas para Lrba con diferencias en el C-terminal, mientras que en la proteína humana se han identificado dos isoformas. (Wang J, 2014).

Estructura proteica de LRBA

Mutaciones que pueden causar enfermedades en humanos

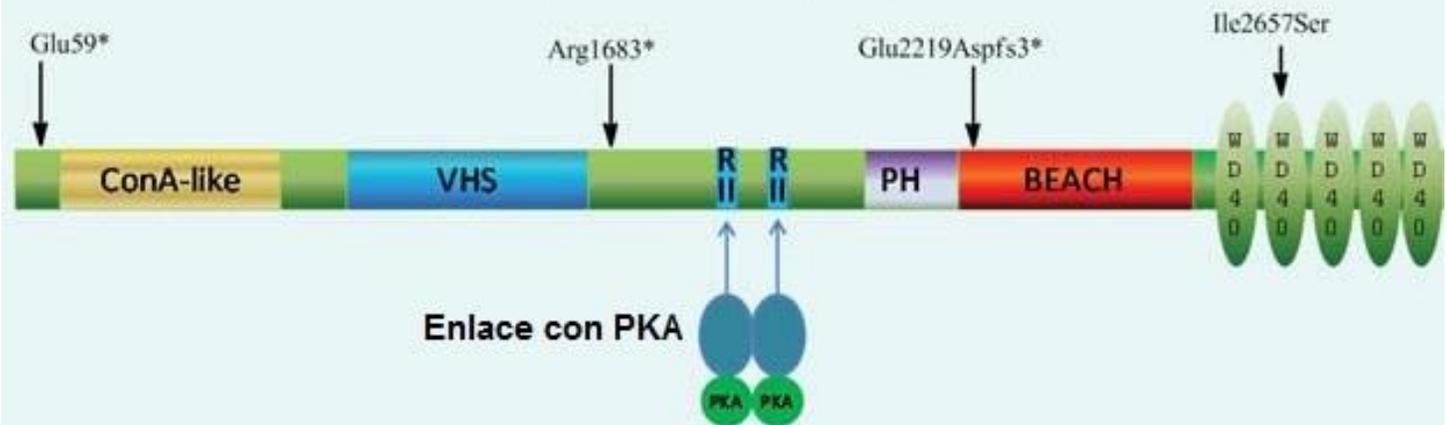


Figura 6. Estructura proteica de LRBA. La proteína LRBA humana tiene 2863 aminoácidos compuestos de múltiples dominios. El peso molecular calculado es de 319kDa. El dominio de anclaje de la lectina Concavalina A (ConA)-like; VHS: VPS (vacuolar protein sorting), dominio Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) y STAM (signal transducing adaptor molecule); RII: motivos de anclaje (RII) de la subunidad reguladora de PKA; PH: dominio Plekstrin Homology (PH)-like; BEACH: dominio beige and CHS; *= codón de paro; fs*3= desplazamiento de 3 codones y luego codón de paro. Traducido al español de Wang, 2014.

La deficiencia de LRBA causa inmunodeficiencia y autoinmunidad. Las manifestaciones clínicas que se presentan en la deficiencia de LRBA incluyen hipogammaglobulinemia debido a la diferenciación defectuosa de linfocitos B, infecciones recurrentes, particularmente del tipo respiratorio, y varios desordenes autoinmunes como trombocitopenia purpura idiopática, anemia hemolítica autoinmune, y enfermedad inflamatoria intestinal. (Wang J, 2014)

En 2012 se identificaron 5 pacientes de 4 familias diferentes con mutaciones homocigotas en *LRBA*, describiendo una inmunodeficiencia nueva, conocida

desde entonces como **deficiencia de LRBA**. La deficiencia de LRBA es causada por la pérdida de la expresión de la proteína LRBA, la cual puede ser causada por mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en *LRBA*. (López-Herrera G, 2012; Gámez Díaz, 2015)

LRBA es el octavo gen que al presentar mutaciones causa inmunodeficiencia común variable (IDCV). Además, puede regular otros genes afectados en la IDCV, como *CD19*, *CD20* y *BAFFR*, ya que sus niveles son bajos en la ausencia de *LRBA*. (Wang J, 2014).

A pesar de que, como ya se mencionó, LRBA podría estar interactuando con varias proteínas y estar mediando varias funciones celulares, a la fecha existe evidencia de que LRBA influye en el reciclamiento de CTLA-4, ya que se ha demostrado su interacción en secuencias específicas, y por extensión, en la capacidad supresora de los linfocitos T reguladores (Tregs), previniendo la degradación de CTLA-4 en lisosomas endocíticos (Shahrzad Bakhtiar, 2017). Estos defectos funcionales de LRBA explican las manifestaciones de tipo autoinmune. Esta es una teoría que se sustenta en estudios realizados en ratones, ya que se ha observado una disminución en los niveles de CTLA-4 en Linfocitos T, aunque en ratones esta deficiencia es compensada. (Burnett DL, 2017). Sin embargo, la disminución en la expresión de CTLA-4 no explica los defectos en la inmunidad humoral, como la poca formación de linfocitos B de memoria, los problemas en el cambio de isotipo y por lo tanto la baja producción de anticuerpos de alta afinidad. (Burnett DL, 2017).

Las anomalías *in vitro* que muestran los pacientes deficientes de LRBA incluyen producción disminuida de anticuerpos IgG, activación y proliferación de linfocitos T deficientes, aumento en apoptosis, y autofagia disminuida en linfocitos B. Además, se ha demostrado alteraciones en linfocitos T reguladores como aumento en apoptosis, y expresión disminuida de marcadores canónicos de linfocitos Treg, como CD25, Helios, FOXP-3 y CTLA-4. (Gámez Díaz, 2016)

A la fecha ya se cuentan con modelos murinos con deficiencia homocigota de *Lrba* (*Lrba*^{-/-}). Interesantemente, en ratones no se ha observado las mismas

manifestaciones clínicas que presentan los humanos deficientes de LRBA, tales como anomalías en la activación de Linfocitos B, así como en su cambio de isotipo o en la formación de centros germinales, por mencionar algunas; por el contrario, los ratones deficientes conservan la funcionalidad de su sistema inmunológico (Burnett DL, 2017).

Gómez-Díaz et al, ha analizado el fenotipo de ratones deficientes de *Lrba*, es decir del *knockout*. Los resultados revelan que, en ratones, independientemente de la edad, tanto en ratones jóvenes como adultos, no se observan manifestaciones clínicas o inmunológicas severas en la ausencia de *Lrba*. Únicamente se ha logrado observar la interacción de *Lrba* con CTLA-4, lo cual ya había sido observado anteriormente en seres humanos; de esta manera se mantiene la teoría de que la ausencia de esta interacción es el origen de los desórdenes de tipo autoinmune que presentan los pacientes deficientes de LRBA. Interesantemente, se ha logrado observar la participación de la proteína en la proliferación celular y supervivencia, así como su probable participación en la regulación de la secreción de IgA. Adicionalmente se analizaron algunas subpoblaciones celulares de Linfocitos B y T sin observar alguna alteración con respecto al control Wild-Type (Laura Gómez-Díaz, 2017).

El estudio de la deficiencia de LRBA en modelos animales, particularmente en modelos murinos, tienen como finalidad llegar a un entendimiento de la fisiopatología del síndrome “*in vivo*”. Hasta la fecha, únicamente se ha logrado comprobar defectos en linfocitos T reguladores, debido a la interacción entre LRBA y CTLA-4 en humanos y ratones, por lo que la función de LRBA continúa sin haber sido revelada en otros tipos celulares. (Laura Gómez-Díaz, 2017). Actualmente, existen muchos aspectos de la respuesta inmune que no se han explorado en el humano y en el ratón deficiente de esta proteína, por lo que el objetivo de este trabajo es realizar una caracterización fenotípica de diferentes subpoblaciones celulares evaluando posibles diferencias dependiendo de la expresión de LRBA.

Planteamiento del problema

Actualmente se desconoce si la proteína LRBA participa en el desarrollo de los linfocitos, sin embargo, se sabe que su participación es esencial para el funcionamiento correcto del sistema inmune. Por lo que el presente trabajo de investigación consiste en determinar si la deficiencia de LRBA se acompaña de alteraciones en el porcentaje de células del sistema inmunológico en ratones. Además, se pretende observar la expresión de LRBA al estimular a las células del sistema inmunológico obtenidas de muestras de sangre periférica de humanos sanos.

El empleo de estímulos mitogénicos para evaluar la expresión de LRBA parte del supuesto de la participación de la proteína en procesos de activación, desarrollo y expresión de células importantes para el funcionamiento correcto del sistema inmune, como lo son los linfocitos.

Objetivos

Objetivo general

- Determinar posibles alteraciones en el desarrollo linfoide en órganos primarios y en bazo de ratones deficientes de *Lrba*, así como determinar el patrón de expresión de LRBA en linfocitos B y linfocitos T obtenidos de humanos sanos.

Objetivos particulares

- Analizar si existen alteraciones en el desarrollo de células pre-B, células B inmaduras y células B foliculares circulantes en médula ósea de ratones *Lrba*^{-/-}.
- Analizar si existen alteraciones en el desarrollo de timocitos dobles negativos, dobles positivos y linfocitos T CD4⁺ ó CD8⁺ en el timo de los ratones *Lrba*^{-/-}.
- Analizar si existen alteraciones en las proporciones de linfocitos B transicionales 1, transicionales 2 y células maduras en el bazo de ratones *Lrba*^{-/-}.
- Analizar la expresión de LRBA en células B y T de humanos sanos por medio de la citometría de flujo en condiciones basales.
- Determinar si se observa la expresión de LRBA al estimular las células humanas con fitohemaglutinina y pokeweed.

Hipótesis

La aplicación de estímulos como la PHA y el PKW a células humanas del sistema inmune llevará a la expresión de la proteína LRBA y será posible obtener un patrón de expresión de la proteína. Además, como resultado de la comparación entre células del sistema inmune en ratones deficientes de Lrba y ratones no deficientes de la misma, se podrán observar algunos efectos de la ausencia de la proteína.

Metodología

Evaluación de la diferenciación linfoide en ratones silvestres, heterocigotos y homocigotos deficientes de LRBA

Los órganos se obtuvieron por disección posterior al sacrificio de los ratones.

Obtención de las células

De cada uno de los órganos obtenidos de los ratones (timo, médula ósea y bazo) se realizaron suspensiones celulares en 1mL de PBS. Posteriormente, se realizó un conteo de las células en cámara de Neubauer y se calculó el número total de células en cada órgano.

Evaluación de subpoblaciones celulares de linfocitos T por citometría de flujo

Se realizaron tinciones en células obtenidas del timo para la evaluación de linfocitos T (*Lrba*^{-/-} (n=2), *Lrba*^{+/-} y *Lrba*^{+/+} (n=3)).

En un principio se identificaron a los linfocitos T (B220⁻) para ello se adicionaron 1.5µL del anticuerpo anti-B220 (APC-Cy7; Biolegend), posteriormente se realizó la tinción de CD4 y CD8 para la identificación de los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺), linfocitos T cooperadores (CD4⁺), los linfocitos T DP (CD4⁺CD8⁺) y los linfocitos T DN (CD4⁻CD8⁻), se adicionaron 1µL del anticuerpo anti-CD4 (PerCP; Biolegend) y 1 µL de anti-CD8 (PE-Cy7; Biolegend). Después de la incubación con los marcadores, protegidos de la luz, se realizó un lavado con 2mL de PBS 1X y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. El botón se resuspendió en 200µL de solución fijadora. Finalmente, se realizó la lectura de las muestras en el citómetro de flujo BD FacsAria, con el software BD FacsDiva (BD Biosciences), y se realizó el análisis de los datos obtenidos con el programa FlowJo X (TreeStar Inc).

Evaluación de subpoblaciones celulares de linfocitos B por citometría de flujo

Se realizaron tinciones en aproximadamente 1x10⁶ células obtenidas de Médula ósea y bazo para la identificación de subpoblaciones de Linfocitos B.

En médula ósea: se identificaron a los linfocitos B CD43- (B220+ CD43-) para ello se adicionaron los siguientes anticuerpos: 3µL de anti-B220 (APC; Biolegend) en una dilución (1:20) y 1.5µL de anti-CD43 (PE;Biolegend); en ésta subpoblación se identificaron a los linfocitos pre-B tardíos (IgD- IgM-), los linfocitos B recién formados (IgD-IgM+) y los linfocitos B foliculares (IgD+IgM+), estas subpoblaciones se denominaron como fracciones D, E y F de acuerdo a la nomenclatura establecida por Hardy, 1991. Para ello se adicionaron los siguientes anticuerpos: 1µL de anti-IgM (PECy7; Biolegend) y 1µL de anti-IgD (APC-Cy7; Biolegend). (*Lrba* -/- (n=2), *Lrba*+/- y *Lrba* +/+ (n=3))

En bazo: se identificaron a los linfocitos B con 5 µL de una dilución (1:20) de anticuerpo anti-B220 (APC; Biolegend), posteriormente se identificaron a los linfocitos B maduros (CD24^{low}CD21+)linfocitos B transicionales T1 (CD24+CD21^{low}) y T2 (CD24+CD21+), para esto se adicionó a los esplenocitos: 3µL de una dilución (1:20) del anticuerpo anti-CD24 (PerCP; eBioscience) y 1.5µL del anticuerpo anti-CD21 (PE; Biolegend). (*Lrba*-/,-*Lrba*+/- y *Lrba*+/+ (n=3))

Después de la incubación con los marcadores, protegidos de la luz, se realizó un lavado con 2mL de PBS 1X y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. El botón se resuspendió en 200µL de solución fijadora. Finalmente se realizó la lectura de las muestras en el citómetro de flujo BD FACS Aria, con el software BD FACS Diva (BD Biosciences), y se realizó el análisis de los datos obtenidos con el programa FlowJo X.

Evaluación de la expresión de LRBA en muestras de humanos sanos.

Obtención de células mononucleares de sangre periférica

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa, a partir de individuos sanos, de edades de 20 a 25 años, empleando tubos con solución ACD (ácido cítrico dextrosa) BD Vacutainer®.

Las muestras de sangre venosa se procesaron de la siguiente forma:

Se obtuvieron las PBMCs empleando un gradiente de densidad con Histopaque-ficol en una concentración 1:2 con respecto al volumen de sangre. Se centrifugó a 1500 rpm, sin aceleración ni desaceleración, durante 30 minutos. Se recuperó la nube de células junto con el plasma en un nuevo tubo y se realizaron dos lavados con 12mL de PBS estéril. Posteriormente, se recuperó el botón y se resuspendió en 1mL de PBS estéril, se realizó el conteo de las células viables obtenidas con cámara de Neubauer, con azul de tripano. Se calculó el número total de células y se cultivaron aproximadamente 3×10^6 células en medio RPMI suplementado, con los estímulos policlonales: fitohemaglutinina (PHA) [10µg/mL], mitógeno Pokeweed (PKW) (10µg/mL; Sigma-Aldrich) durante 48 y 72 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Detección de LRBA por citometría de flujo

Se tomaron dos alícuotas de cada uno de los cultivos celulares con los distintos estímulos, y se les realizó un lavado con 2mL de PBS, se recuperó el botón y se agregaron los anticuerpos para realizar la tinción superficial; para ello se agregaron 5µL de anti-CD3 (PE-Texas red) (Bechman Coulter Immunotech), 5µL de anti-CD19 (APC) y 5µL de anti-CD27 (PE) (BD Pharmingen). Para iniciar la tinción intracelular de LRBA, en un inicio se bloquearon las células con 50µL suero de cabra al 5%, y se incubaron durante 10 minutos; posteriormente, se lavaron las células con 2mL de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se fijaron las células con 500µL de solución fijadora (formaldehído al 1%), y se incubaron durante 10 minutos. Se permeabilizaron las células con 500µL saponina al 0.1%, y se incubaron

durante 10 minutos. Finalmente, se lavaron las células con 2mL de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos.

A una de las alícuotas se adicionaron 3 μ L del anticuerpo anti-LRBA (Abcam) [0.2mg/mL], y a la segunda un control de isotipo, para ello se adicionaron 24 μ L de una dilución (1:40) de IgG de conejo [1000 μ g/mL], para llevar a ambos a una concentración final de 6 μ g/mL, y se incubaron durante 60 minutos, se lavaron las células con 2mL de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Después se agregaron 2 μ L de anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (1:250) conjugado a FITC (Biolegend) a ambos tubos. Finalmente, se lavaron las células con 2mL de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y el botón se resuspendió en 200 μ L de solución fijadora. Desde el momento en que se agregaron los anticuerpos para realizar las tinciones las células se mantuvieron protegidas de la luz.

Finalmente se realizó la lectura de las muestras en el citómetro de flujo BD FacsAria, con el software BD FacsDiva (BD Biosciences), y se realizó el análisis de los datos obtenidos con el programa FlowJo X.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico con el programa XLSTAT® el cual consistió en una *t de student* de dos muestras relacionadas en donde se haya realizado al menos triplicados para cada medición realizada.

Resultados

*Poblaciones de linfocitos en ratones *Lrba*^{-/-}*

Con el objetivo de detectar posibles deficiencias celulares en el modelo murino *Lrba*^{-/-}, nos propusimos realizar una caracterización de tres órganos linfoides claves en el sistema inmunológico, como es el caso del timo, la médula ósea y el bazo.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las muestras obtenidas de ratones. En las tablas se incluyen las medias de los porcentajes obtenidos de las distintas subpoblaciones identificadas en cada uno de estos tres órganos. De igual manera, se incluyen las gráficas comparativas entre los ratones *knockout* (*Lrba*^{-/-}), con mutación heterocigota para *Lrba* (*Lrba*^{+/-}) y *wild type* (*Lrba*^{+/+}).

Análisis de subpoblaciones de Linfocitos T en Timo de ratones

Para el caso del timo, se analizaron las subpoblaciones de timocitos DN, DP, CD4⁺ y CD8⁺ únicamente en dos ratones *Lrba*^{-/-} (n=2) y en tres ratones *Lrba*^{+/+} y *Lrba*^{+/-} (n=3); en la figura 7 se muestra la estrategia de análisis realizado para las células obtenidas del timo de ratones *Lrba*^{+/+}, *Lrba*^{+/-} y *Lrba*^{-/-}. Los timocitos fueron sometidos a las tinciones descritas en la metodología, y posteriormente se realizó el análisis de los datos obtenidos mediante citometría de flujo. Durante el análisis se seleccionaron los linfocitos T por la ausencia de la molécula B220 en su superficie, y posteriormente se identificaron 4 subpoblaciones: linfocitos T CD4⁺CD8⁺ (DP), linfocitos T CD4⁻CD8⁻ (DN), linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺, de acuerdo con su expresión de las moléculas CD4 y CD8.

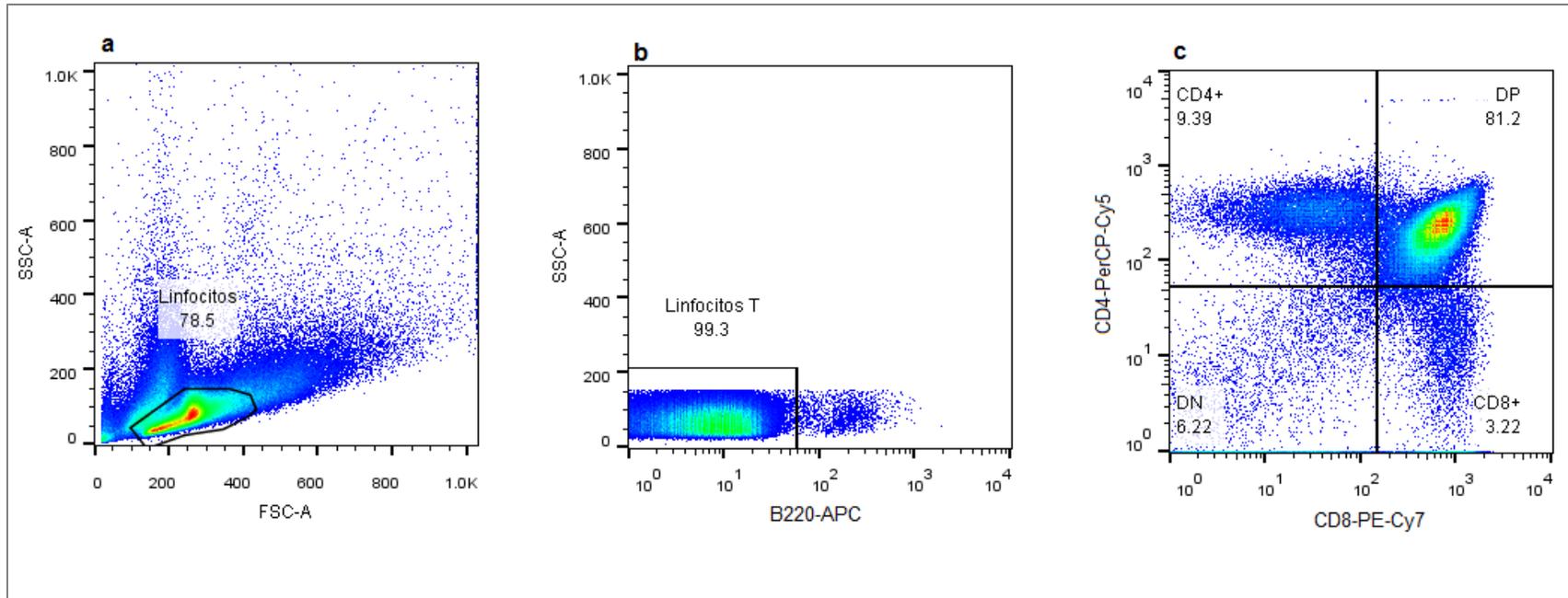


Figura 7. Análisis de las subpoblaciones de linfocitos T obtenidos de timo de ratones. a) Selección de linfocitos por tamaño y granularidad; b) identificación de linfocitos T, que por la falta de expresión de la molécula B220; c) identificación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+, CD8+ Dobles positivos (DP) y dobles negativos (DN) por su expresión de las moléculas CD4 y CD8.

En la tabla 3 se muestran los promedios de las poblaciones analizadas en el timo y se presentan también los valores de p calculados del análisis estadístico ente el grupo de ratones $Lrba+/+$ ($n=3$) y $Lrba+/-$ ($n=3$), en este órgano no fue posible realizar estadística para el grupo $Lrba-/-$ ($n=2$) ya que no se contó con triplicados en este grupo.

Tabla 3. Subpoblaciones de Linfocitos T identificadas en Timo de ratones.

SUBPOBLACIÓN	%		p	%
	$Lrba+/+$	$Lrba+/-$		$Lrba-/-$
CD4+	8.73	7.69	0.066	8.48
CD8+	4.26	3.06	0.097	6.48
DP	76.56	81.7	0.109	62.05
DN	10.38	7.55	0.195	23.09

Los resultados de la Tabla 3 se pueden observar gráficamente a continuación (Gráfica 1), en donde se muestra la representación en barras de los porcentajes calculados en cada subpoblación de linfocitos T, y en los tres grupos analizados. Se puede observar una posible tendencia en aumento de los dobles positivos en el grupo $Lrba+/-$, sin embargo, el valor de p calculado es de 0.109, por lo que la diferencia no es significativa estadísticamente. En las demás subpoblaciones no se observa alguna diferencia o tendencia entre los grupos $Lrba+/+$ y $Lrba+/-$. Finalmente, a pesar de no contar con el análisis estadístico de los datos, se observan proporciones muy similares entre los ratones $Lrba+/+$ y $Lrba-/-$ de las diferentes poblaciones de timocitos analizadas.

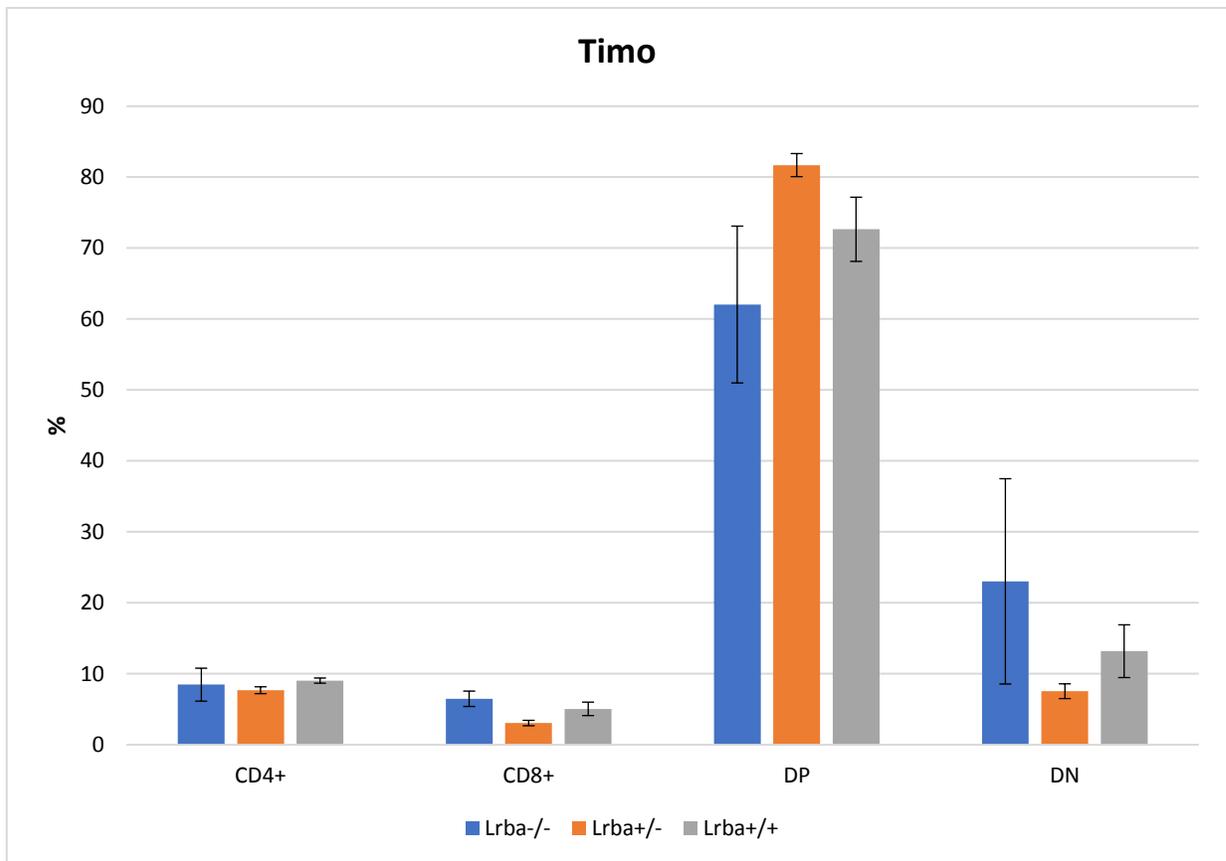


Figura 8. Subpoblaciones de Linfocitos T en Timo de ratones. CD4+ (Linfocitos T CD4+), CD8+ (Linfocitos T CD8+), DP (Dobles positivos, linfocitos T CD4+ CD8+) y DN (Dobles negativos, linfocitos CD4- CD8-). Se muestran las medias de los porcentajes obtenidos en cada población en ratones Lrba-/- (barras azules) (n=2), Lrba+/- (barras anaranjadas) (n=3) y en ratones Lrba+/+ (barras grises) (n=3).

Análisis de subpoblaciones de linfocitos B en Médula ósea de ratones

Para realizar el análisis de los datos obtenidos por medio de la citometría de flujo se realizó el seguimiento que se muestra en la figura 9. El análisis consistió en la identificación de los linfocitos B por su expresión de la molécula B220, y posteriormente se seleccionó la región B220+CD43-, las subpoblaciones de linfocitos B analizadas en médula ósea fueron identificadas como: Fracción D: linfocito pre-B tardíos, Fracción E: linfocitos B recién formados y Fracción F: linfocitos B Foliculares IgM+ IgD+, y fueron identificadas de acuerdo con su expresión de las moléculas IgM e IgD.

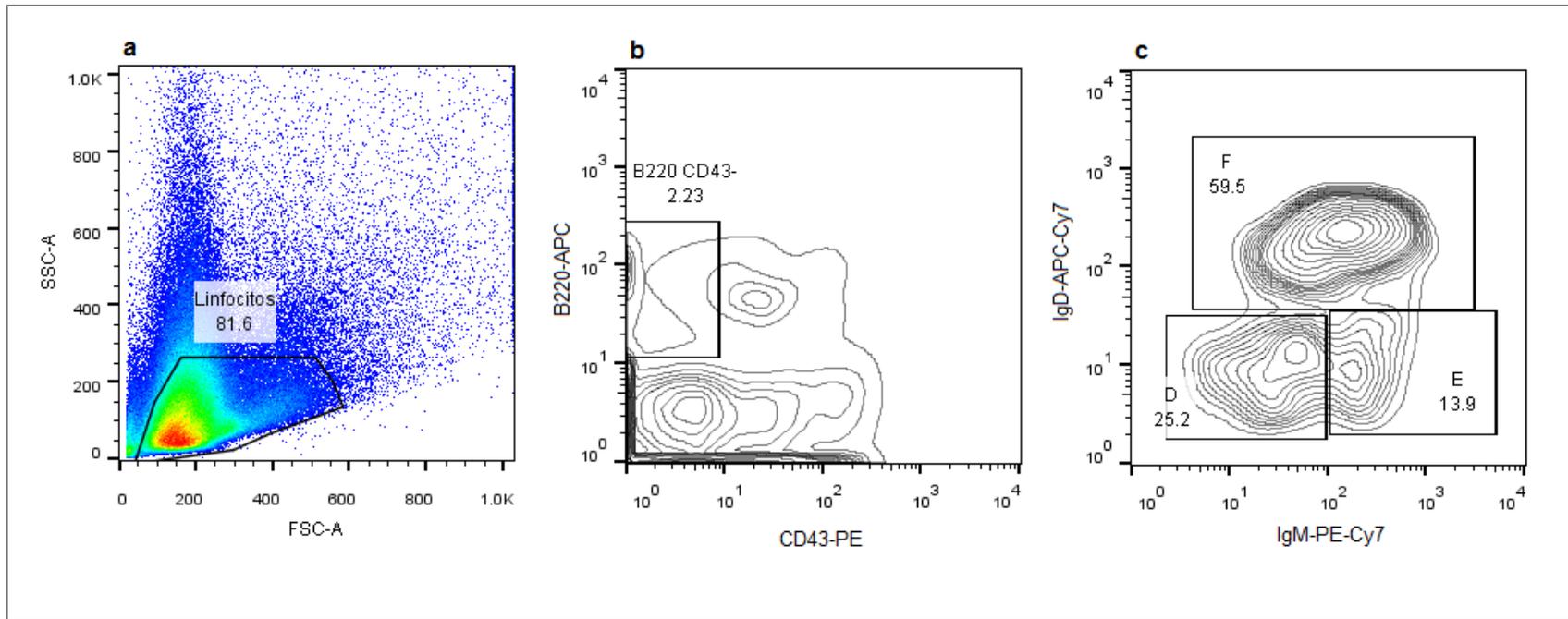


Figura 9. Análisis de subpoblaciones de Linfocitos B en médula ósea de ratones. a) Selección de linfocitos por sus propiedades de tamaño y granularidad; b) identificación de la población B220+ CD43- de acuerdo con su expresión de las moléculas B220 y CD43; c) selección de las subpoblaciones: Fracción D (Linfocitos pre-B tardíos), Fracción E (Linfocitos B recién formados) y Fracción F (Linfocitos B foliculares, IgD+ IgM+).

En la figura 10 se muestra una comparación de las subpoblaciones de linfocitos B de médula ósea identificadas en los tres grupos de estudio, *Lrba*+/, *Lrba*+/- y *Lrba* -/-. En la imagen podemos observar bien definidas las regiones de cada subpoblación en el ratón *Lrba* +/+, además de que se observan algunas diferencias en los otros dos grupos, como es el caso de un aumento en la fracción F, y una disminución de la fracción E en el ratón *Lrba*-/.

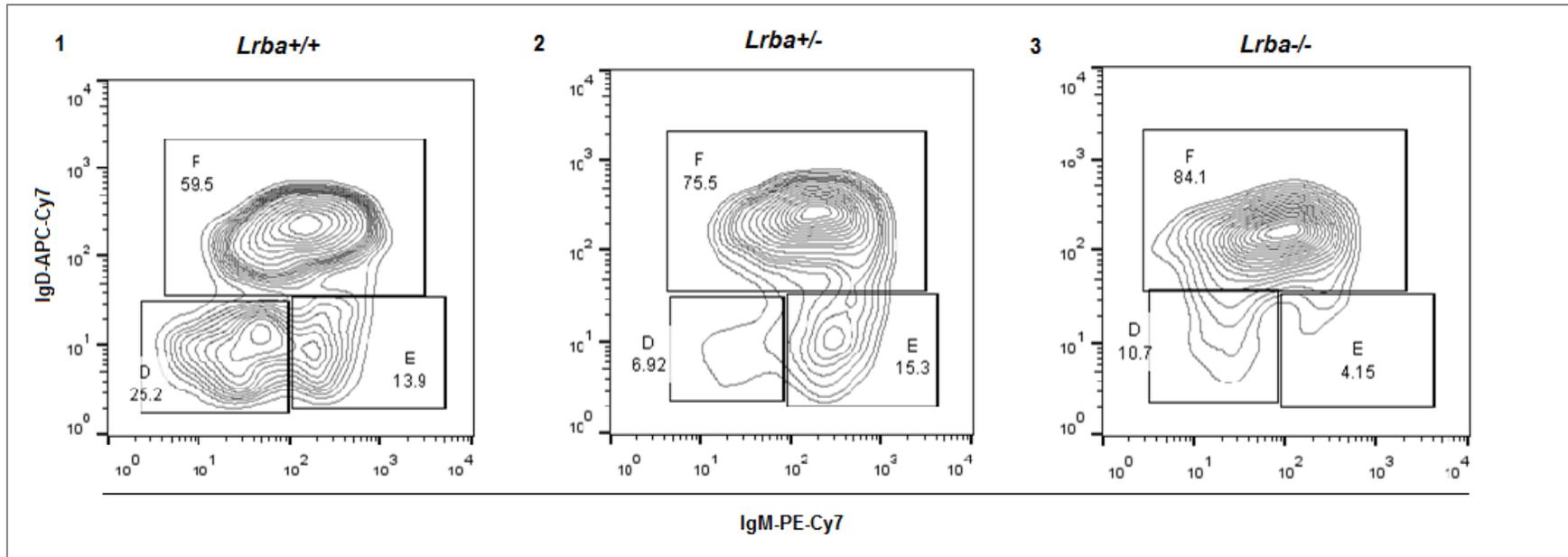


Figura 10. Comparación de las subpoblaciones de linfocitos B analizadas en médula ósea de ratones. Comparación entre las subpoblaciones de linfocitos B obtenidos de medula ósea en los tres grupos de estudio. 1) Ratón *Lrba*^{+/+}, 2) ratón *Lrba*^{+/-} y 3) ratón *Lrba*^{-/-}. D (Linfocitos pro-B), E (Linfocitos pre-B) y F (Linfocitos B inmaduros, IgD+ IgM+).

En el caso de la médula ósea, se analizaron tres ratones para el caso de los ratones *Lrba+/+* ($n=3$) y *Lrba+/-* ($n=3$), sin embargo, para el caso de los ratones *Lrba-/-* ($n=2$), sólo se estudiaron dos ratones. En la tabla 4 se muestran los porcentajes promedio calculados para cada una de las subpoblaciones en los tres grupos de estudio, así como los valores de p calculados en el análisis estadístico. El análisis estadístico para el ratón *Lrba-/-* no se muestra ya que sólo se hicieron duplicados, sin embargo, en las fracciones D y E se observa una tendencia de disminución, mientras que se observa una tendencia de incremento de la fracción F.

Tabla 4. Subpoblaciones de Linfocitos B identificadas en Médula ósea de ratones

SUBPOBLACIÓN	%		p	%
	<i>Lrba+/+</i>	<i>Lrba+/-</i>		
D	17.63	9.73	0.101	6.35
E	17.56	15.3	0.148	4.63
F	63.16	73.23	0.070	75.25

Los resultados obtenidos en la Tabla 4 se muestran gráficamente a continuación, en donde apreciamos las tendencias en disminución en las fracciones más inmaduras (D y E) y el incremento en la fracción F en el ratón *Lrba-/-*; sin embargo, no es posible determinar si la tendencia observada tiene significancia estadística ya que únicamente se trabajó con dos ratones *Lrba-/-*. La tendencia de disminución de la fracción D, y de aumento de la fracción F no fueron significativas estadísticamente, con respecto al grupo *Lrba+/-*.

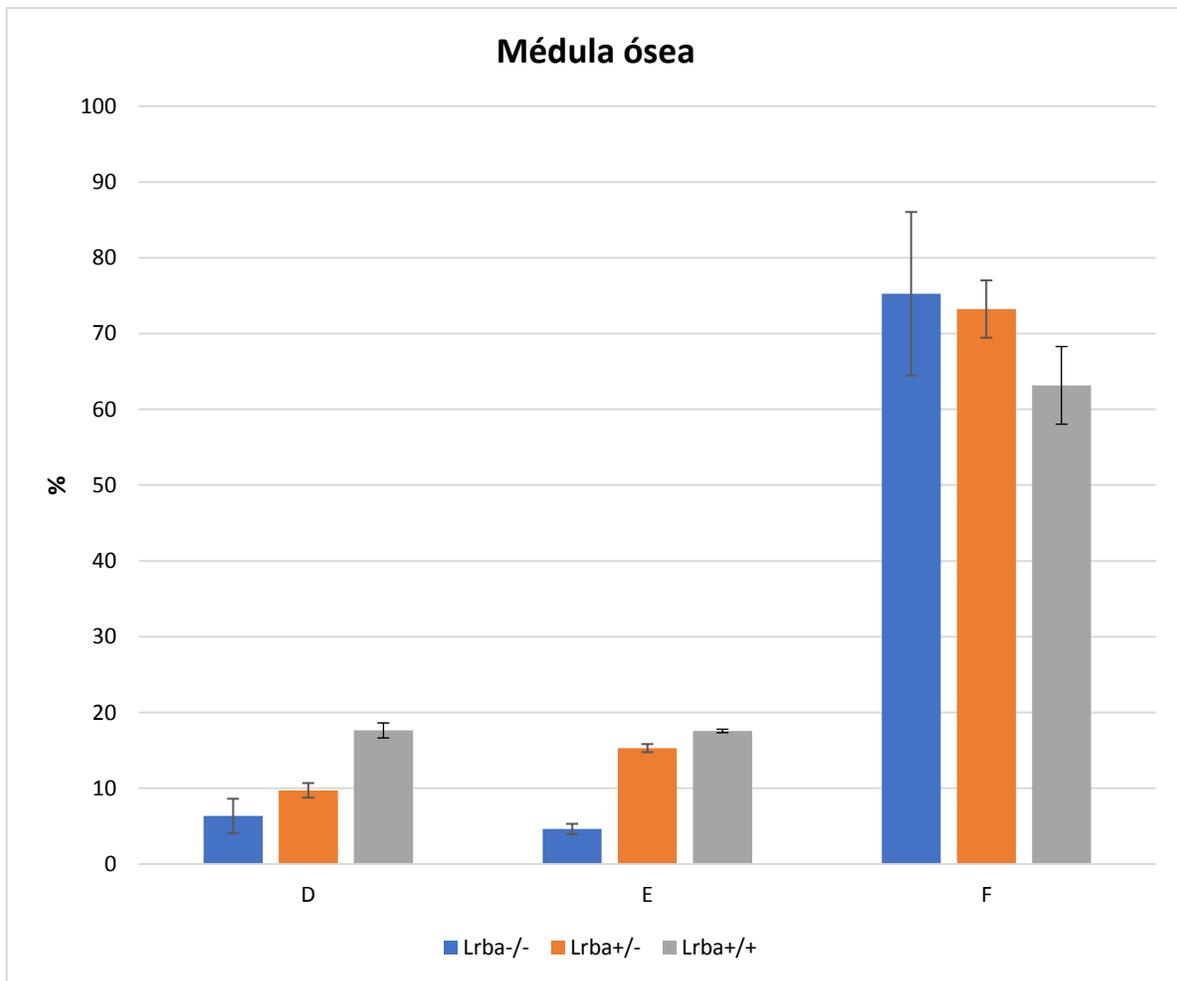


Figura 11. Subpoblaciones de Linfocitos B en médula ósea de ratones. D (Linfocitos pre-B tardíos), E (Linfocitos B recién formados) y F (Linfocitos B foliculares IgD+ IgM+), Se muestran las medias de los porcentajes obtenidos en cada población en ratones *Lrba*^{-/-} (barras azules) (n=2), *Lrba*^{+/-} (barras anaranjadas) (n=3) y en ratones *Lrba*^{+/+} (barras grises) (n=3).

Análisis de subpoblaciones de Linfocitos B en Bazo de ratones

En el caso del bazo, se evaluaron tres subpoblaciones de linfocitos B: linfocitos B transicionales 1 (T1), linfocitos B transicionales 2 (T2) y linfocitos B maduros (M). El análisis consistió en identificar la región de los linfocitos B y posteriormente identificar sus subpoblaciones de acuerdo con su expresión de las moléculas CD21 y CD24. En la figura 12 se describe la estrategia de análisis realizada.

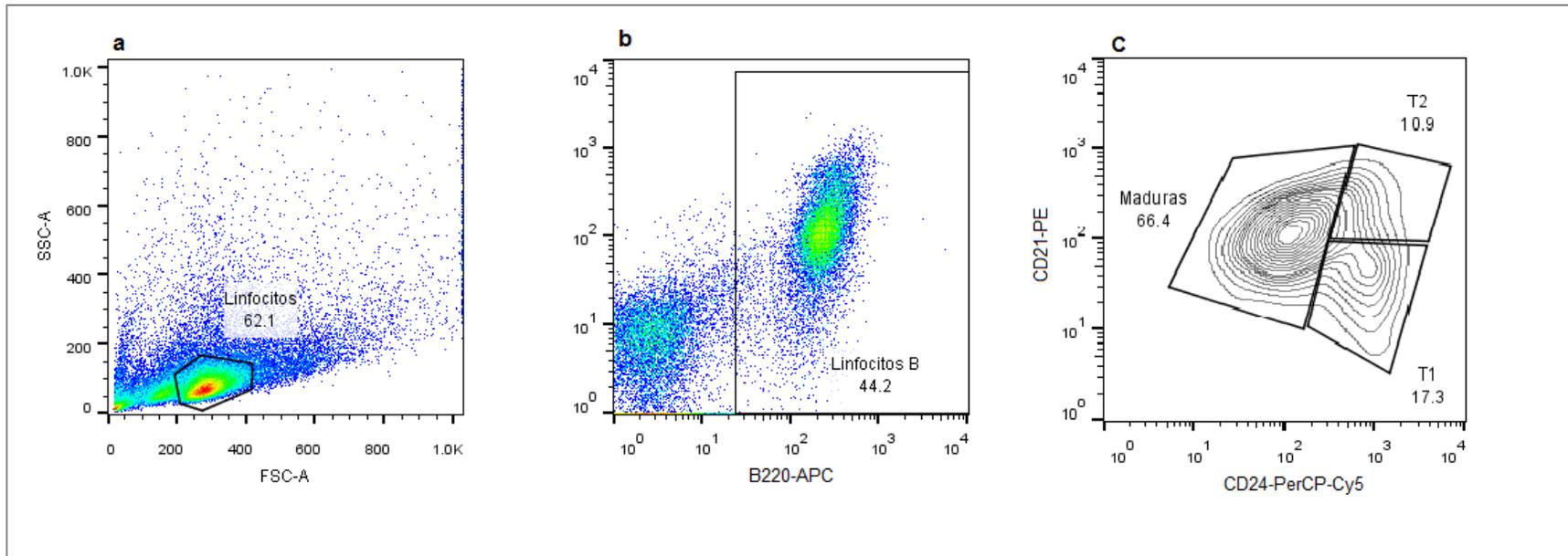


Figura 12. Análisis de linfocitos B y algunas de sus subpoblaciones en células obtenidas de bazo de ratones. a) Selección de linfocitos de acuerdo con sus características de tamaño y granularidad. b) Identificación de linfocitos B por su expresión de la molécula B220. c) Identificación de las subpoblaciones de linfocitos B transicionales 1 (T1), transicionales 2(T2) y maduros, de acuerdo con su expresión de las moléculas CD21 y CD24.

Para el caso del bazo se lograron estudiar a los linfocitos B T1, T2 y M en tres ratones de cada grupo de trabajo. En la tabla 5 se muestran los valores de los porcentajes promedio obtenidos en las subpoblaciones celulares de linfocitos B identificadas en bazo, con sus respectivos valores de p calculados mediante el análisis estadístico.

Tabla 5. Subpoblaciones de Linfocitos B identificadas en Bazo de ratones.

Subpoblación	%		p	%	P
	<i>Lrba+/+</i>	<i>Lrba +/-</i>			
T1	15.9	19.5	0.240	25.3	0.016*
T2	19.6	12.7	0.318	18.4	0.849
Maduras	58.7	62.0	0.522	51.9	0.137

*significativo a nivel alfa= 0.05.

De acuerdo con los porcentajes promedio de las subpoblaciones analizadas en Bazo, no se logra observar diferencias o tendencias claramente marcadas entre los ratones *Lrba+/-* ($n=3$) y los *Lrba+/+* ($n=3$), por otro lado, entre el grupo *Lrba -/-* ($n=3$) y el grupo *Lrba +/+*, se observa una tendencia en aumento de la subpoblación de linfocitos B transicionales 1 (T1) en ausencia de *Lrba*.

Los datos de la Tabla 5 se muestran gráficamente a continuación, resaltando que se observan diferencias significativas únicamente en la población de células B T1, en donde el ratón *Lrba-/-* presenta una mayor proporción de esta población celular con respecto al ratón *Lrba+/+* con un valor de p de 0.016, mientras que el ratón *Lrba+/-* no presenta diferencias significativas, (Figura 13).

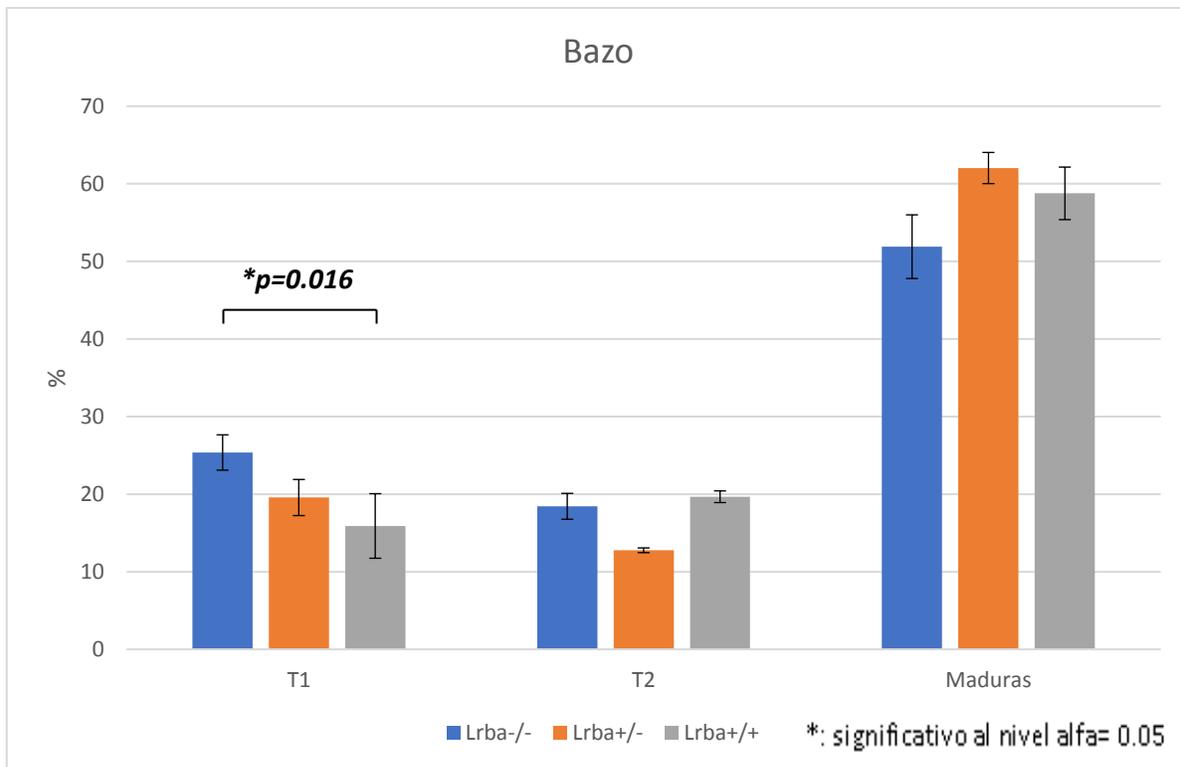


Figura 13. Subpoblaciones de linfocitos B identificadas en Bazo de ratones. T1 (Linfocitos B Transicionales 1), T2 (Linfocitos B Transicionales 2) y maduros. Se muestran las medias de los porcentajes obtenidos en los ratones *Lrba+/+* (barras grises), Heterocigotos (barras anaranjadas) y *Lrba-/-* (barras azules). *significativo al nivel alfa= 0.05, n=3, (*t de student de dos muestras independientes*).

Análisis de la expresión de LRBA en linfocitos humanos

Debido a que se desconoce la función biológica de la proteína LRBA, se propuso investigar si se lograba inducir su expresión al estimular células del sistema inmune, lo cual serviría para poner de manifiesto su participación en la activación de la respuesta inmunológica. Dado que no existe un anticuerpo comercial para analizar la expresión de LRBA en células de ratón, se propuso evaluar la expresión de LRBA en linfocitos humanos. Para realizar el análisis de la expresión de la proteína LRBA en linfocitos humanos se trabajó con las PBMCs obtenidas de 5 donadores sanos como se menciona en la metodología. Se crearon dos grupos de análisis, las células que se cultivaron sin estímulo (SE) y las células que se cultivaron con uno de los dos estímulos utilizados: la fitohemaglutinina (PHA) y el mitógeno de Pokeweed (PKW) ambos son mitógenos, por lo que estimulan la proliferación celular. La PHA se utilizó para estimular la proliferación de los linfocitos T, mientras que el PKW se utilizó para estimular el crecimiento de los linfocitos B; estos estímulos fueron seleccionados ya que con ellos se observó un aumento en la expresión de LRBA. Posteriormente, se analizó la expresión de LRBA después de la incubación con los estímulos mencionados por medio de la citometría de flujo y finalmente se realizó un análisis estadístico para determinar la significancia de los resultados obtenidos.

Análisis de la expresión de LRBA en linfocitos T en linfocitos humanos

Dado que LRBA es una proteína inducible y que el anticuerpo que se encuentra comercialmente disponible se emplea para detectar LRBA humano por Western-Blot y no por citometría de flujo, nos propusimos analizar la expresión de LRBA empleando este anticuerpo en células estimuladas con PHA, mitógeno que se ha reportado previamente que induce la expresión de esta proteína (López Herrera, 2012r). Para realizar el análisis de la expresión de LRBA en linfocitos T después de estimularlos con PHA, se analizaron los dos grupos de células en el citómetro de flujo posterior a la tinción realizada como se describe en la metodología. En la figura 14 se muestra el análisis realizado de los resultados obtenidos de la citometría de flujo en las células SE y en las células estimuladas con PHA, en el

cual se muestra la selección de los linfocitos, seguida de la selección de los linfocitos T y finalmente los histogramas de intensidad media de fluorescencia (IMF) para medir la expresión de LRBA. En la misma figura se puede observar el aumento de la IMF de LRBA con respecto al isotipo, así como podemos observar un aumento en la expresión de la proteína, ya que aumenta la IMF en el grupo de células estimuladas con PHA, con respecto a las células SE.

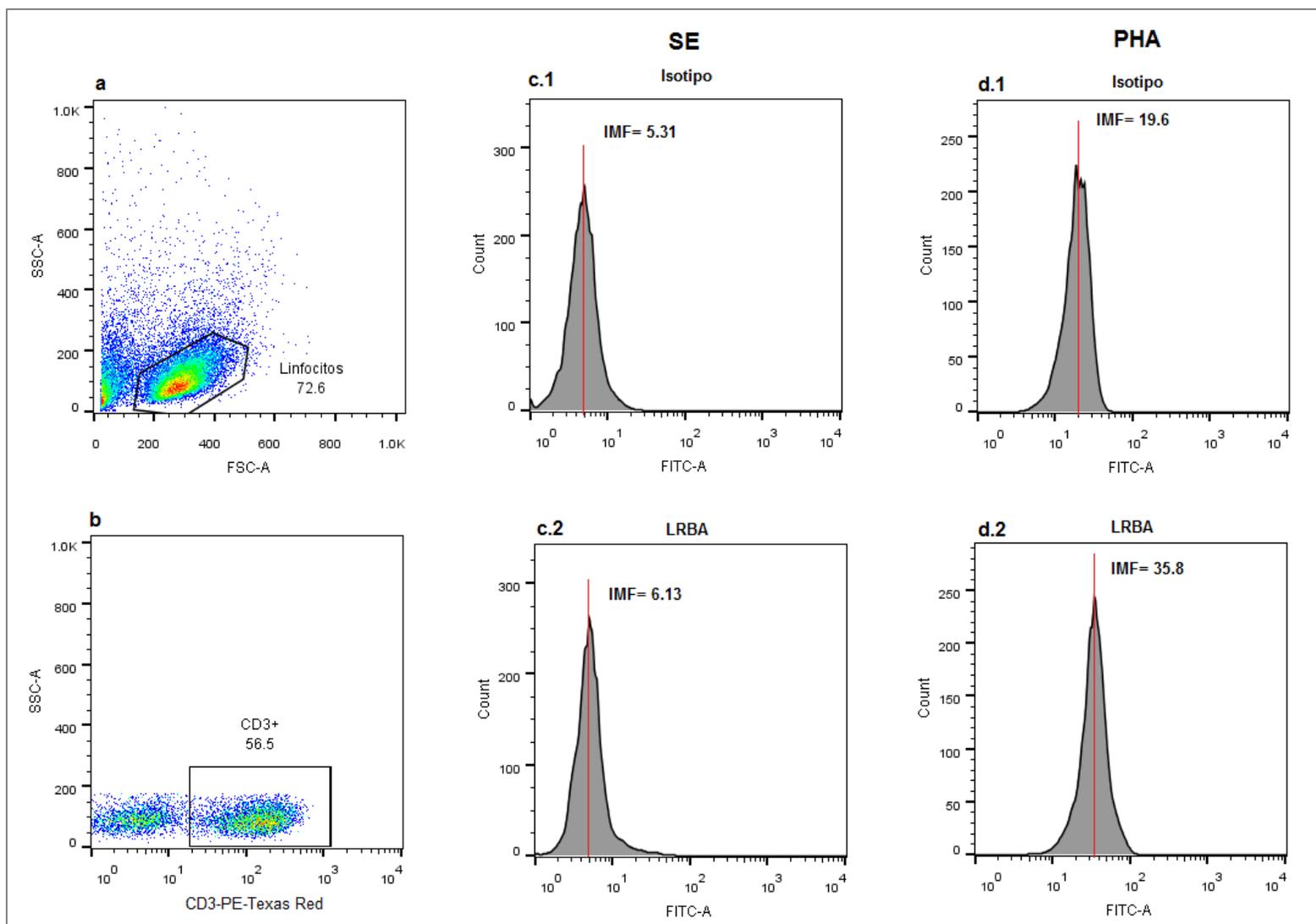


Figura 14. Análisis de la expresión de LRBA linfocitos T (CD3+) humanos estimulados con PHA. a) Identificación de linfocitos de acuerdo con su granularidad y tamaño. b) Identificación de células CD3+ marcadas con el fluorocromo PE-Texas Red. c.1 y c.2) Gráficos de IMF en células SE, y d.1 y d.2) Gráficos de IMF en células estimuladas con PHA.

Durante el análisis de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, se trabajó con la intensidad media de fluorescencia (IMF), la cual se refiere al punto medio o al pico de fluorescencia en el que se midió un mayor número de células marcadas con el anticuerpo contra LRBA.

Se calculó un factor entre el control de isotipo o control negativo y los valores obtenidos de la tinción de LRBA para tener una mejor referencia de la expresión obtenida de la proteína; el factor se obtuvo de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Factor = \frac{MF \text{ de LRBA}}{IMF \text{ Isotipo}}$$

Posteriormente se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos de las células analizadas de los 5 donadores sanos. Por lo que se calcularon las medias de los factores calculados para ambas condiciones de cultivo: SE y estimuladas con PHA, se calcularon los valores de *p* mediante una prueba de *t de student* de dos muestras relacionadas, y se graficaron los resultados obtenidos a las 48 y a las 72 horas de incubación de ambos grupos. Los tiempos de incubación fueron seleccionados durante la estandarización de la técnica, ya que en estos periodos se observó mejor el aumento de la expresión de LRBA.

En la Tabla 6 se muestra la media de los factores calculados de acuerdo con la IMF obtenida para el control de isotipo y para LRBA en linfocitos T, se muestran los valores a las 48 y 72 horas de incubación, así como los valores de *p* obtenidos. De acuerdo con los valores obtenidos para las células sin estímulo (SE) y el grupo con PHA como estímulo, podemos observar un aumento en la expresión de LRBA.

Tabla 6. Medias de los factores obtenidos utilizando PHA como estímulo.

Tiempo de incubación	Sin estímulo (SE)	PHA [10µg/mL]	<i>p</i>
48h	0.88057783	0.96198347	0.179
72h	0.96198347	1.3558186	0.007*

*significativo al nivel alfa= 0.05

Al realizar el análisis estadístico, observamos una expresión basal de LRBA a las 48 horas sin estímulo y un ligero incremento en la expresión en presencia de PHA; Sin embargo, la diferencia entre el grupo sin estímulo y el estimulado no es estadísticamente significativa ya que se obtuvo un valor de $p= 0.179$ (Figura 15).

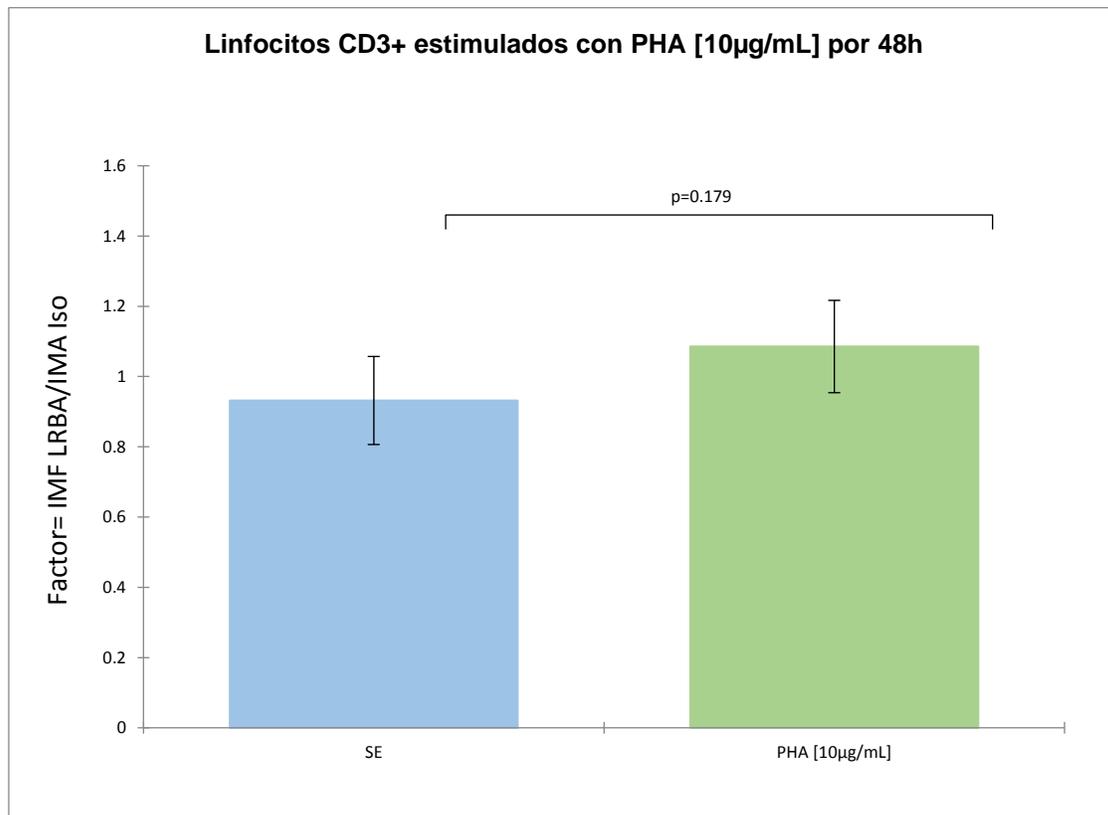


Figura 15. Gráfico de las medias de los factores LRBA/Isotipo obtenidos tras el estímulo de linfocitos T humanos con PHA [10µg/mL] durante 48h. En las barras azules se presentan los resultados de las células sin estímulo (SE) y en las barras verdes los resultados del estímulo con PHA [10µg/mL]. Valor de $p= 0.179$.

Por otro lado, se realizó también cultivos celulares durante 72h de PBMCs SE y con PHA, en este caso se observó una mayor inducción en la expresión de LRBA, ya que el factor obtenido en promedio en las células sin estímulo es de 0.96, y en presencia de PHA es más alto con un valor de 1.35, ésta diferencia sí es estadísticamente significativa ya que se calculó un valor de $p= 0.007$ (Figura 16).

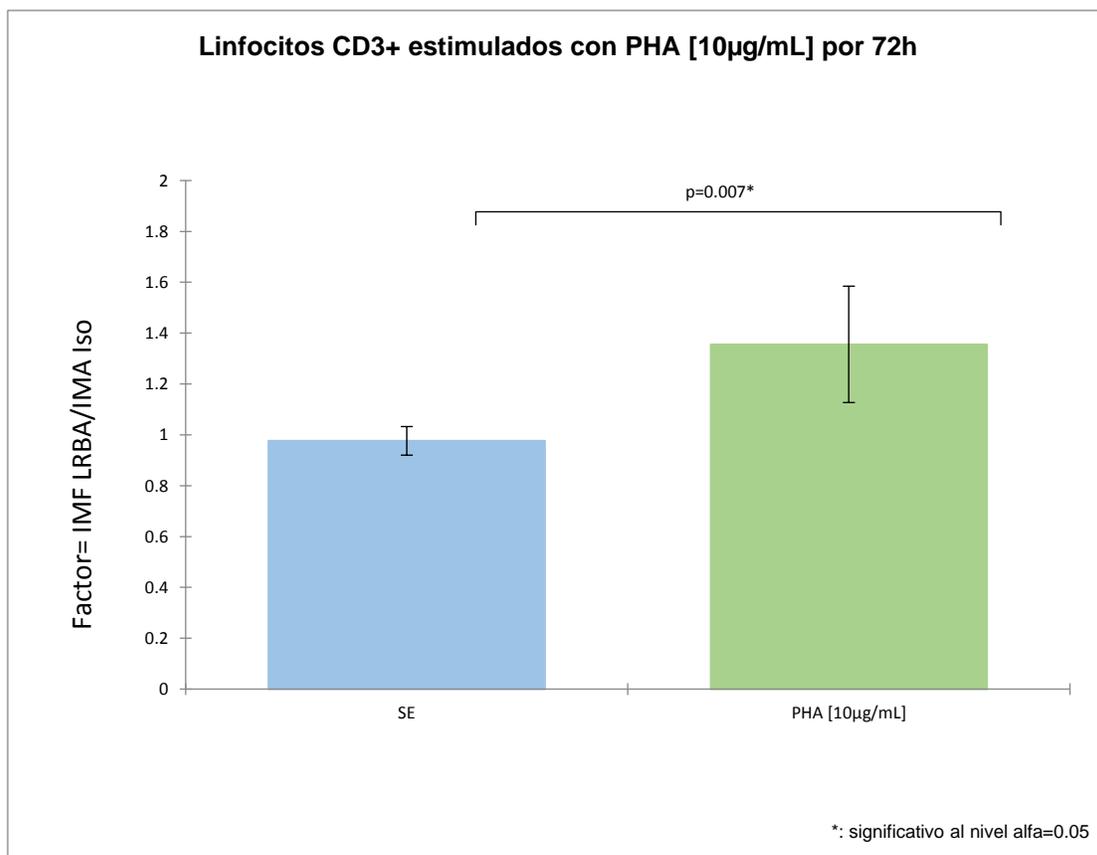


Figura 16. Gráfico de las medias de los factores LRBA/Isotipo obtenidos tras el estímulo con PHA [10µg/mL] durante 72h, en linfocitos T humanos. En las barras azules se presentan los resultados de las células sin estímulo (SE) y en las barras verdes los resultados del estímulo con PHA [10µg/mL]. Valor de $p= 0.007^*$, *t de student de dos muestras dependientes*.

Análisis de la expresión de LRBA en linfocitos B en humanos

Para el caso del análisis de LRBA en linfocitos B, dado que el anticuerpo empleado no reconoce Lrba en el ratón, se determinó la expresión de LRBA en linfocitos B humanos, esto tras activarlos mediante la incubación con PKW. Para ello se realizó el análisis de los datos obtenidos a partir de la citometría de flujo. En la figura 8 se muestra el análisis realizado para el grupo de células SE y las estimuladas con PKW. En un inicio se seleccionó la región de linfocitos, seguido de la selección de los linfocitos B de acuerdo con su expresión de la molécula CD19. Posteriormente se identificaron las dos subpoblaciones de linfocitos: los linfocitos vírgenes CD27- y los linfocitos de memoria CD27+. Y finalmente se obtuvo la IMF de la expresión de LRBA (Figura 17).

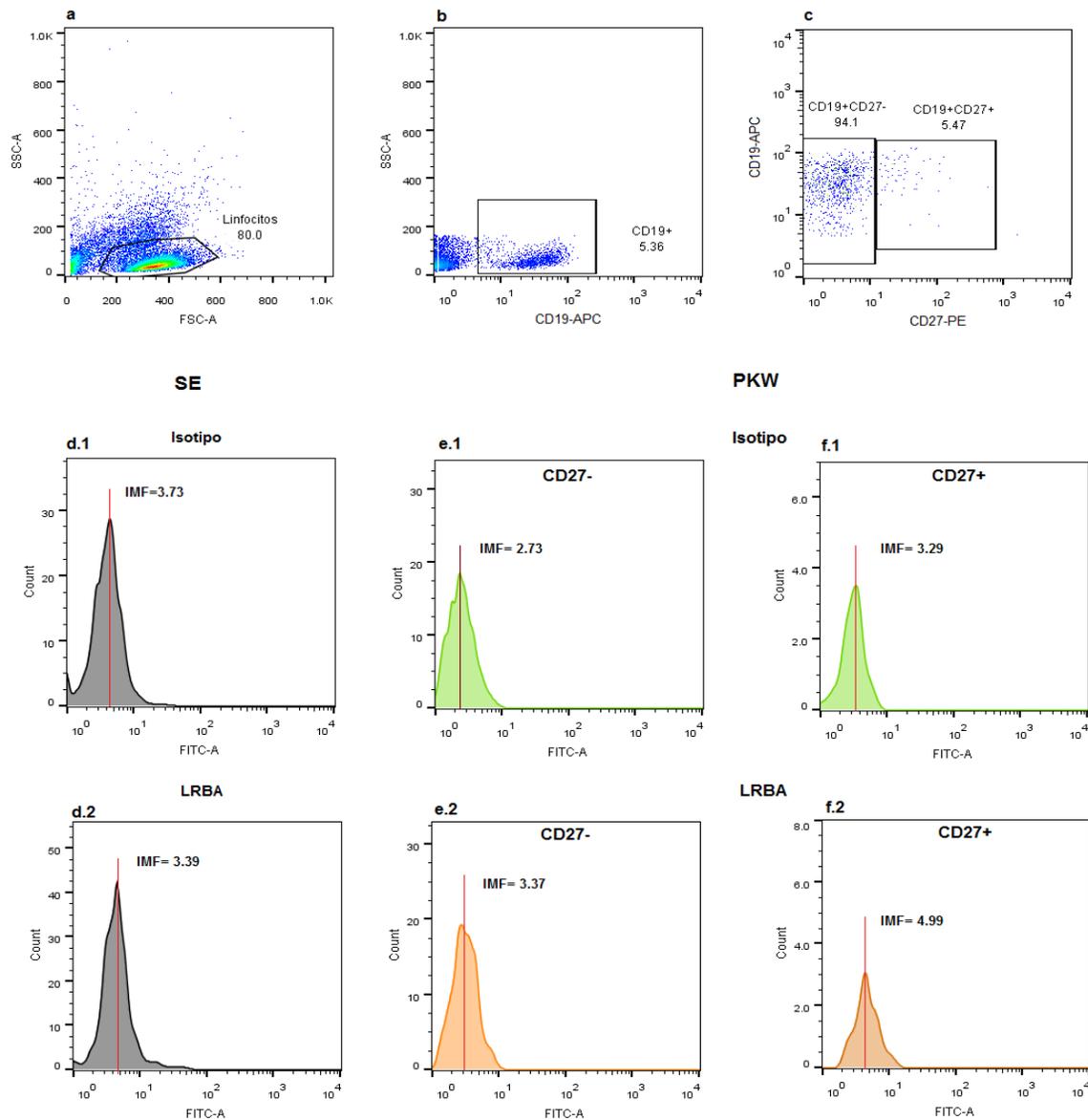


Figura 17. Análisis de subpoblaciones de Linfocitos B humanos CD27+ Y CD27- estimuladas con PKW. a) Identificación de linfocitos de acuerdo con su granularidad y tamaño. b) Identificación de linfocitos B por su expresión de la molécula CD19 (CD19+) marcada con el fluorocromo APC. c) identificación de las subpoblaciones de linfocitos B de acuerdo con su expresión de la molécula CD27 marcada con PE, siendo CD27+ linfocitos B de memoria y CD27- linfocitos B vírgenes. d.1 y d.2) Gráfico de la IMF de las células SE. e.1 y e.2) Gráficos de la IMF de la expresión de LRBA en linfocitos B CD27-. f.1 y f.2) Gráficos de la IMF de la expresión de LRBA en linfocitos B CD27+.

Una vez realizado el análisis de los datos obtenidos de la citometría de flujo, se procedió a calcular los factores para analizar la expresión de LRBA con respecto al control de isotipo, utilizando la misma ecuación presentada en la sección anterior.

Posteriormente se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos de las células analizadas de los 5 donadores sanos. Por lo que se calcularon las medias de los factores calculados para las dos subpoblaciones de linfocitos B analizadas: los linfocitos B vírgenes y los linfocitos B de memoria, dentro de los cuales se trabajaron dos grupos: el grupo de células sin estímulo (SE) y las células estimuladas con PKW, se calcularon los valores de p mediante una prueba de *t de student* de dos muestras relacionadas, y se graficaron los resultados obtenidos a las 48 y a las 72 horas de incubación de ambos grupos en cada una de las subpoblaciones.

Los resultados presentados en la tabla 7 muestran los factores obtenidos en promedio de la expresión de LRBA en las células cultivadas con PKW durante 48 horas; se muestran los valores para los linfocitos B CD27- y CD27+ con sus respectivos valores de p .

Tabla 7. Medias de los factores obtenidos de la estimulación con PKW en linfocitos B humanos, durante 48h.

Linfocitos B	48h		P
	SE	PKW [10µg/mL]	
CD27-	0.90625347	1.11283422	0.161
CD27+	0.91164253	1.2410584	0.028*

*significativo al nivel alfa= 0.05

En la figura 18, se muestra la representación gráfica de los datos obtenidos a las 48 horas de incubación. Se puede observar que tanto en los linfocitos B de memoria como en los vírgenes hay un aumento en la expresión de LRBA tras la activación con PKW durante 48 horas, ya que se obtuvo un factor de la expresión de LRBA con respecto al isotipo mayor que el calculado en las células SE. Cabe mencionar que dicho aumento en la expresión de LRBA se observa más acentuado en los linfocitos B de memoria. Y la diferencia entre el grupo SE y PKW es estadísticamente significativa, con un valor de $p=0.028$

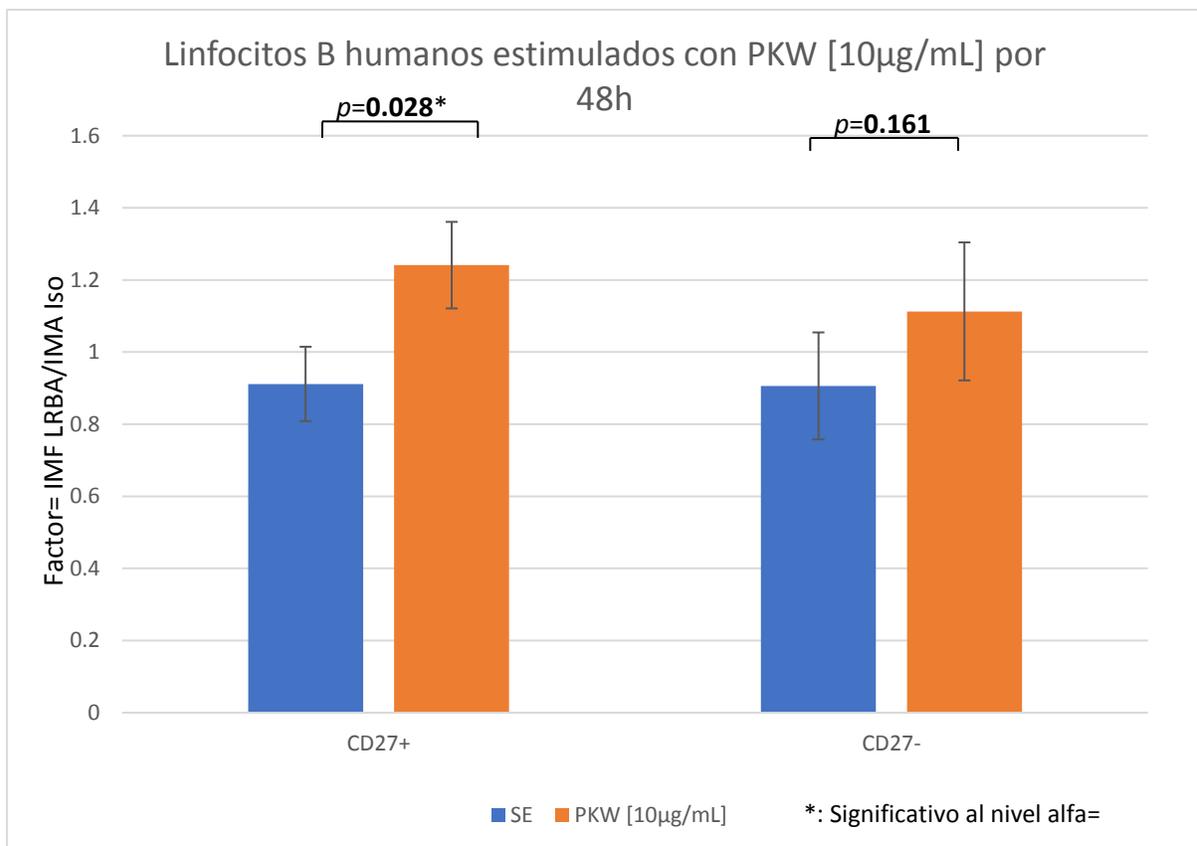


Figura 18. Gráfico de las medias de los factores LRBA/Isotipo calculados tras el estímulo con PKW [10µg/mL] durante 48 horas, en linfocitos B humanos. Las barras azules representan a los linfocitos B CD27+ y las barras anaranjadas representan a los linfocitos B CD27-; valores de p 0.028* y 0.161 respectivamente; *t de student de dos muestras dependientes*.

Las diferencias observadas en la expresión de LRBA en los linfocitos B de memoria CD27+ se hacen más notorias a las 72 horas, como se observa en la tabla 8, en donde se muestran las medias de los factores calculados, así como los valores de p .

Tabla 8. Medias de los factores obtenidos de la estimulación con PKW en linfocitos B humanos, durante 72h.

Linfocitos B	72h		<i>P</i>
	SE	PKW [10µg/mL]	
CD27-	0.92979349	1.11733447	0.091
CD27+	0.87037268	1.59908628	0.001*

* Significativo al nivel alfa= 0.05

En la figura 19 se representan gráficamente las medias de los factores calculados de los resultados obtenidos a las 72 horas de incubación, en los grupos SE y estimulados con PKW. En dicho gráfico se observa un incremento significativo en la expresión de LRBA en los linfocitos B vírgenes y en los de memoria, al haber sido incubados con PKW durante 72 horas. También podemos observar que existe una expresión de la proteína en el grupo SE, la cual aumenta al estimular las células con PKW, y esto se ve más pronunciado en los linfocitos B de memoria. El valor de p calculado para las células CD27- es de 0.091, mientras que para las CD27+ es de 0.001.

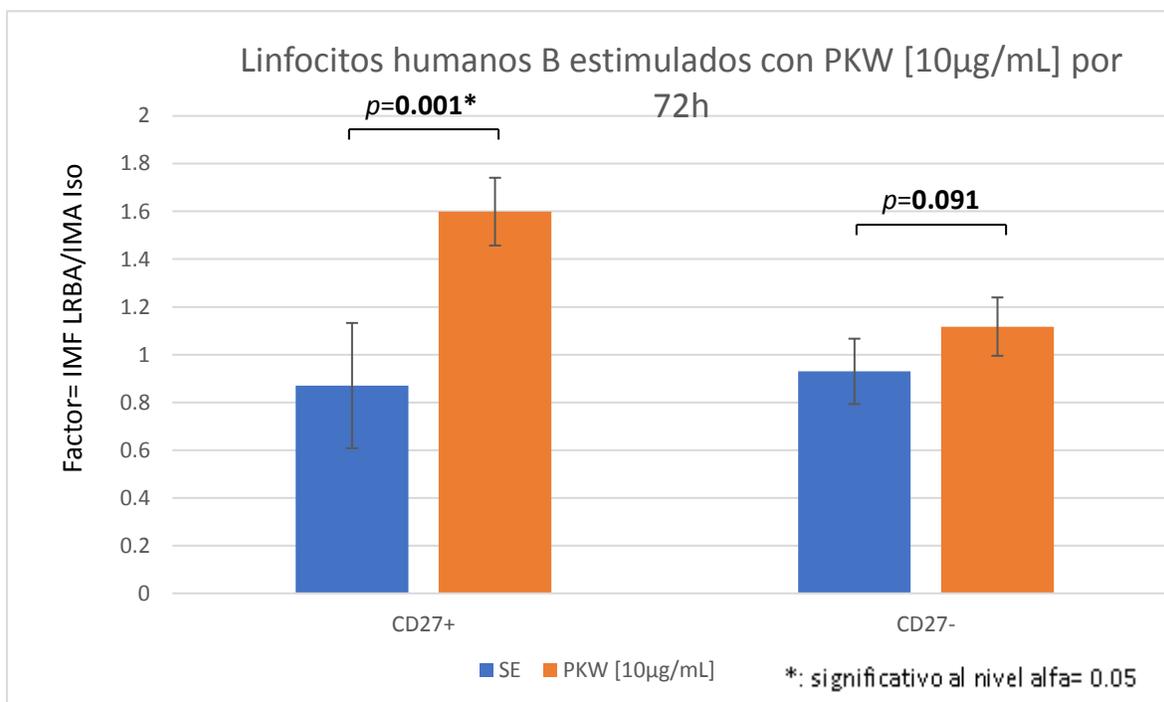


Figura 19. Gráfico de las medias de los factores LRBA/Isotipo calculados tras el estímulo con PKW [10µg/mL] durante 72 horas, en linfocitos B humanos. Las barras azules representan a los linfocitos B CD27+ y las barras anaranjadas representan a los linfocitos B CD27-; valores de p 0.001* y 0.091 respectivamente; *t de student de dos muestras relacionadas*.

Para lograr obtener una representación más gráfica del aumento de la expresión de la proteína LRBA al cultivar a los linfocitos T y B con ciertos estímulos, se realizó la superposición de los gráficos de IMF, en los cuáles se puede apreciar el aumento de la expresión de LRBA, con respecto al control de isotipo. En la figura 20 se muestran los gráficos superpuestos en los distintos grupos analizados: las células SE, los linfocitos T estimulados con PHA, los linfocitos B vírgenes y los linfocitos B de memoria estimulados con PKW.

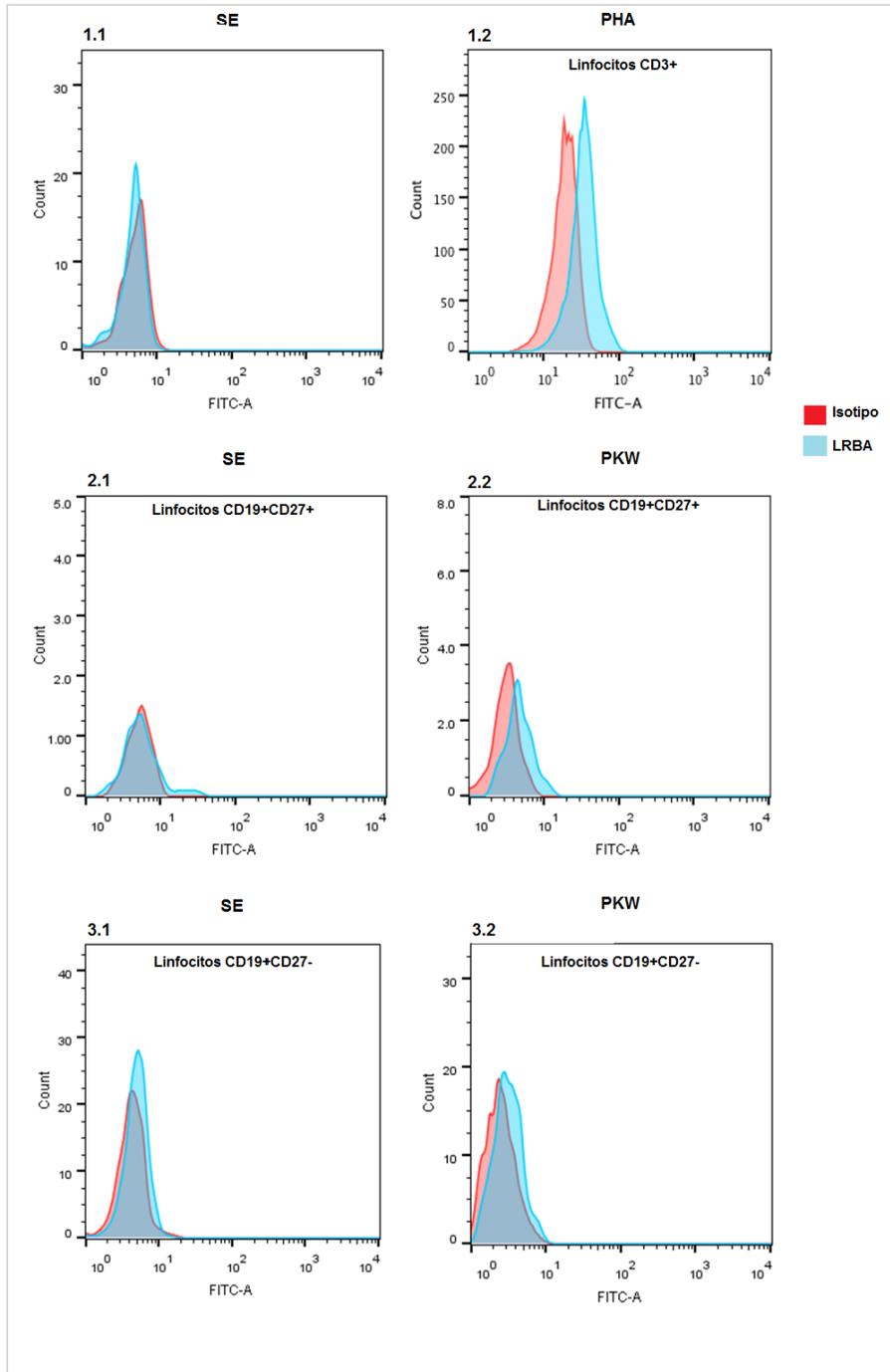


Figura 20. Superposición de gráficos de IMF entre el control de isotipo y LRBA en linfocitos T (CD3+) y linfocitos B (CD19+) humanos. 1.1) Superposición entre control de isotipo y expresión de LRBA en linfocitos humanos sin estímulo (SE). 1.2) Superposición entre control de isotipo y expresión de LRBA en linfocitos CD3+ después de ser estimulados con PHA. 2.1) Linfocitos B CD27+ SE; 2.2) linfocitos B CD27+ después de haber sido estimulados con PKW; 3.1) linfocitos B CD27- SE y 3.2) linfocitos B CD27- después de haber sido estimulados con PKW.

Discusión

LRBA es una proteína cuya deficiencia se asocia con un fenotipo de deficiencia en la producción de anticuerpos, problemas en la sobrevivencia de linfocitos y defectos en procesos de regulación de la respuesta inmune en seres humanos. (Gabriela López Herrera, 2012). Se desconoce la función de LRBA en la mayoría de los procesos celulares mencionados, excepto para el caso de la regulación inmunológica, ya que se describió recientemente que LRBA tiene que ver con el reciclamiento de CTLA4 en linfocitos T (Laura Gámez-Díaz, 2017). El estudio de LRBA desde la descripción de la deficiencia genética ha sido lento, esto se ha debido a la carencia de modelos animales que nos permitan explorar defectos celulares en diferentes órganos linfoides, por lo que en este trabajo exploramos el fenotipo inmunológico mediante la caracterización de las poblaciones celulares en diversos órganos linfoides en un ratón deficiente de *Lrba*, y dado que no hay anticuerpos comerciales para *Lrba* murino, y que en el ratón no es posible identificar a los linfocitos B de memoria, realizamos la búsqueda de esta proteína en células B humanas de memoria mediante la identificación de la expresión de la molécula CD27.

Con respecto al análisis de los timocitos se determina que, de acuerdo con los resultados, no se logra identificar alguna diferencia o tendencia de aumento o disminución en ninguna de las subpoblaciones analizadas en ausencia de *Lrba*, ya sea de forma incompleta (*Lrba*^{+/-}) o totalmente ausente (*Lrba*^{-/-}), por lo que se debe hacer la inclusión de más ratones para poder obtener mejores resultados en el análisis de estas subpoblaciones.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Gámez-Díaz et al, donde se menciona que al realizar el análisis de ratones deficientes de *Lrba*, en los cuales no se identificaron manifestaciones clínicas o inmunológicas de enfermedad. (Gámez-Díaz et al, 2017) Desafortunadamente, estos resultados no correlacionan con lo observado en humanos, por lo que será necesario continuar con las investigaciones.

En médula ósea se observaron dos tendencias, una tendencia a la baja por parte de las fracciones más inmaduras de linfocitos B que se analizaron (fracciones D y E) y una tendencia de aumento de los linfocitos B foliculares (fracción F). La disminución en las subpoblaciones de linfocitos B inmaduros podría indicarnos problemas en el proceso de maduración, posiblemente, estas poblaciones están muriendo rápidamente por apoptosis, la disminución de linfocitos B de las fracciones D y E se relacionaría con el aumento de linfocitos B foliculares. Los linfocitos B foliculares (Fo), tienen un papel importante en la generación de linfocitos B de memoria y de células plasmáticas de vida larga; López Herrera, et al, menciona una deficiencia en los linfocitos B de memoria en la ausencia de LRBA, debido a la presencia de defectos en la diferenciación. El aumento de B foliculares en médula ósea podría relacionarse con defectos en su diferenciación que por ende ocasionaran problemas en la producción de células de memoria. Se ha reportado que la deficiencia de LRBA conlleva a defectos en procesos de autofagia, suprimiéndola hasta en un 50%; sin embargo, el mecanismo molecular por el cual lo realiza permanece desconocido. Se ha especulado que la interacción de LRBA con otras proteínas como LC3 es necesaria para completar el proceso de autofagia, por lo que en su ausencia se observa una activación del crecimiento celular. (Wang J, 2014). Las tendencias encontradas en las subpoblaciones analizadas en médula ósea no fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo *Lrba*^{+/-}, por lo que será necesaria la inclusión de más ratones *Lrba*^{-/-} para poder realizar un análisis con respecto a este grupo.

En bazo, los linfocitos B transicionales, en específico la subpoblación linfocitos B T1, presenta una tendencia de aumento, la cual fue significativa estadísticamente con un valor de *p* de 0.016. Los linfocitos B transicionales son células recién llegadas a bazo, que están atravesando un proceso de diferenciación, los cuales pasaran por etapas de selección positiva y negativa, durante el estadio T1 se eliminarán a las células autorreactivas. (Hamilton JA, 2017). Es importante ver alterada la subpoblación T1, ya que podemos suponer la presencia de células autorreactivas, por lo que es posible el desarrollo de autoinmunidad. (Vossenkömper and Spencer, 2011).

En los linfocitos B maduros analizados en bazo se observa una tendencia a disminuir con la pérdida de la expresión de Lrba, se observa un menor porcentaje de linfocitos B maduros en los ratones *Lrba* *-/-* con respecto al grupo *Lrba* *+/+*, Se podría suponer que en la deficiencia de LRBA se tiene una disminución de linfocitos B maduros que probablemente presenten defectos en su desarrollo, así como en su activación. Sin embargo, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa.

En un intento de correlacionar los resultados observados en las subpoblaciones celulares analizadas en médula ósea y bazo, podríamos suponer que el aumento de células transicionales en bazo y la disminución en las fracciones D y E en médula ósea, se deben a que los linfocitos inmaduros están llegando precipitadamente al bazo, con defectos en su diferenciación desde médula ósea. Al mismo tiempo, se presentará una disminución de células maduras en bazo debido a estos problemas en el desarrollo de los linfocitos B. Esto podría explicar en parte, los problemas de autoinmunidad observados en la deficiencia de LRBA y al mismo tiempo ocasionar problemas en la generación de linfocitos B de memoria, ya que no están pasando por un proceso de diferenciación correcto.

Con respecto a los hallazgos realizados en linfocitos B humanos, observamos que tanto los linfocitos T y los linfocitos B expresan LRBA de manera basal, pero, dicha expresión es inducible y se observa mejor a las 72h, en presencia de mitógenos policlonales como son la fitohemaglutinina (PHA) y el mitógeno de Pokeweed (PKW).

En la figura 20 se pueden observar los histogramas superpuestos entre el control de isotipo y la expresión de LRBA, aquí podemos observar como aumenta la expresión de LRBA al utilizar los estímulos PHA y PKW, esto con respecto a la expresión basal de la proteína que se representa en el gráfico sin estímulo (SE).

En la figura 16, se puede observar el aumento en la expresión de LRBA en linfocitos T tras su incubación con PHA durante 72 horas, la diferencia entre el grupo de células sin estímulo y las estimuladas con PHA es significativa estadísticamente con un valor de p de 0.007.

La PHA es un mitógeno, por lo que induce la síntesis de DNA y favorece el crecimiento celular. En el caso de los linfocitos T, su desarrollo y activación necesita de la expresión de una amplia cantidad de moléculas, por lo tanto, el hecho de observar que la proteína LRBA aumenta su expresión basal al momento de presentarse un estímulo, es un indicativo de que probablemente se encuentre envuelta en algún proceso necesario para el crecimiento celular de los linfocitos T, así como en su diferenciación y activación, ya que se ha mencionado que está asociada con proteínas motoras, y por lo tanto, involucradas en el tráfico vesicular. (Wang J, 2014)

El observar una señal fluorescente mayor de LRBA en las células estimuladas con respecto a las no estimuladas, sugeriría que el anticuerpo empleado detecta esta proteína por citometría, lo cual es relevante ya que dicho anticuerpo se emplea normalmente para ensayos de Western Blot y de inmunohistoquímica; el empleo de este anticuerpo por citometría de flujo favorece su uso en la caracterización de la detección de LRBA en diferentes poblaciones celulares, información que sería de utilidad para determinar a aquellas células en las que LRBA podría estar ejerciendo una función.

Dado que LRBA es importante en diversas funciones en el linfocito B, analizamos su expresión en estas células, los resultados muestran que LRBA se expresa en los linfocitos B de memoria CD27+ estimulados con PKW durante 72 horas, mientras que los linfocitos B naive no muestran un incremento en la expresión de esta proteína (figura 19), esto resulta relevante, dado que los pacientes con IDCV presentan una deficiencia profunda en el desarrollo de linfocitos B de memoria (L. Berrón Ruiz, 2014), lo cual podría implicar un posible papel de LRBA en la sobrevivencia o diferenciación de este subtipo celular.

Es importante observar la expresión de LRBA durante un proceso de crecimiento celular, más específico, en la activación de los linfocitos B, esto es un indicativo de que la presencia de LRBA es necesaria durante este proceso. Durante el reconocimiento de antígeno, los linfocitos B proliferan para su expansión clonal, un proceso importante para su diferenciación en células de memoria o células

plasmáticas. Se ha demostrado que la deficiencia de LRBA conlleva a defectos en la diferenciación de linfocitos B y a defectos en las células de memoria, esto en suma a la presencia de dominios en la estructura de LRBA asociados con interacciones proteína-proteína, proteína-DNA, y su participación en múltiples procesos como la transducción de señales, tráfico vesicular, el ciclo celular y regulación transcripcional, etc. (López Herrera, 2012).

La expresión de LRBA en los linfocitos B de memoria y linfocitos B vírgenes, puede poner de manifiesto el papel que juega la proteína durante la proliferación de linfocitos B como respuesta a un estímulo, y la importancia de su presencia para una buena diferenciación y activación de estas células. Por otra parte, los linfocitos B de memoria presentan una autofagia activa, mecanismo que se ha implicado con la larga vida de estas células, cabe la posibilidad que LRBA esté involucrado con este proceso, ya que en pacientes con deficiencia de LRBA la autofagia es deficiente (Miller 2008, López Herrera 2012).

Conclusiones

No fue posible observar diferencias o tendencias de aumento o disminución en las subpoblaciones de linfocitos T analizadas en timo. Sin embargo, las diferencias encontradas en las subpoblaciones de linfocitos B analizadas en médula ósea y bazo, reflejan la probable desregulación que presenta el sistema inmune en la ausencia de la proteína Lrba, ya que se encontraron alteraciones en células de gran importancia en el proceso de diferenciación de los linfocitos B, como lo son los linfocitos B transicionales, así como en la población encargada de la producción de las células de memoria, en este caso se trata de los linfocitos B foliculares.

La expresión de LRBA fue exitosamente estimulada con la fitohemaglutinina (PHA) en los linfocitos CD3+, ya que logramos observar un aumento en la expresión de la proteína, la cual fue mayor a las 72 horas de incubación, estas observaciones validan el uso del anticuerpo para explorar la expresión de LRBA por citometría de flujo. Por otro lado, la expresión de LRBA aumenta durante la activación de linfocitos B con PKW, por lo que probablemente esté involucrada en este proceso; la expresión de LRBA fue mayor en los linfocitos B de memoria.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación nos dieron una idea de por qué se considera que la proteína LRBA es esencial para el funcionamiento correcto del sistema inmune. Por otro lado, revelan la necesidad de continuar con los estudios en los modelos animales deficientes de Lrba, para acercarnos al entendimiento de su función biológica y lograr el desarrollo de terapias eficientes para la población deficiente de esta proteína. Nuestros datos sugieren que existen defectos de diferenciación de los linfocitos B en células inmaduras de médula ósea y de bazo en el ratón, así como linfocitos B de memoria, indicando que estos dos tipos celulares deben estudiarse de manera más profunda respecto a la función de LRBA.

Referencias

1. A. Prieto Martín, e. a. (2013). Funciones de los linfocitos B. *Medicine*, 1752-1759.
2. A. R. S. Badari Nath, e. a. (2015). A comparative study of phytohaemagglutinin and extract of *Phaseolus vulgaris* seeds by characterization and cytogenetics. *Spectrochimica acta*, 143-147.
3. Burnett DL, P. I.-F. (14 de Junio de 2017). Murine LRBA deficiency causes CLTA-4 deficiency in Tregs without progression to immune dysregulation. *Immunol Cell Biol*, 95(9), 775-788.
4. Camicia, G., & De Larrañaga, G. (Julio de 2012). Trampas extracelulares de neutrófilos: un mecanismo de defensa con dos caras. *Medicina clínica*, 140(2), 70-75.
5. D. Díaz Martín, A. P.-M. (2013). Linfocitos T. *Medicine*, 1699-1709.
6. D. Díaz Martín, H. B.-M. (2013). Funciones efectoras de los linfocitos T. *Medicine*, 1743-1751.
7. Eva Lévy, e. a. (2016). LRBA deficiency with autoimmunity and early onset chronic erosive polyarthritis. *Clinical immunology*, 88-93.
8. Gabriela López Herrera, e. a. (2012). Deleterious mutations LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *The American Journal of Human Genetics*, 986-1001.
9. Godini R, F. H. (2018). Network analysis of inflammatory responses to sepsis by neutrophils and peripheral blood mononuclear cells. *PLoS ONE*, 13(8), e0201674.
10. Hamilton JA, W. Q. (Octubre de 2017). Cutting edge: Endogenous IFN- β regulates survival and development of transitional B cells. *The Journal of Immunology*, 199(8), 2818-2623.
11. Hardy, R., Carmack, C., Shinton, S., Kemp, J., & Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of Pro-B and Pre-Pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med*, 1213-1225.
12. Herrera, G. L. (2016). Los linfocitos B y las inmunodeficiencias primarias. *Rev Alerg Mex*, 58-70.
13. Hirokazu Kanegane, e. a. (2017). Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Allergology international*, 1-12.

14. José Mateus, e. a. (2013). Diseño de un panel multicolor para evaluar moléculas intracelulares y de superficie mediante citometría de flujo. *Biomédica*, 660-672.
15. Karim, Y., & Lakkis, F. (2015). A brief journey through the Immune system. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1274-1281. Review.
16. Kathrin Pieper, B. G. (2013). B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 950-971.
17. Kraal, G., & Mebius, R. (2006). New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. *International review of cytology*, 250, 175-216.
18. L. Berrón Ruiz, e. a. (2014). Lymphocytes and B-cell abnormalities in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Allergologia et immunopathologia*, 35-43.
19. Laura Gámez Díaz, e. a. (2016). The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 223-230.
20. Laura Gámez-Díaz, J. N.-S. (2017). Immunological phenotype of the murine Lrba knockout. *Immunology and Cell biology*.
21. Leticia Yáñez, e. a. (2016). Inmunodeficiencias primarias en niños gravemente enfermos: a propósito de 3 casos clínicos. *Revista chilena de pediatría*, 1-6.
22. Marinovic, M. A. (2012). Inmunodeficiencias y su relación con enfermedades autoinmunes. *Rev. Med. Clin. Condes*, 484-491.
23. Martín, A., Escudero, J. B., & Sanz, C. G. (2013). Linfocitos B. *Medicine*, 1710-1718.
24. Miller, B. C. (2008). The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development. *Autophagy*, 309-314.
25. Monserrat Sanz, J. (2017). Introducción al sistema inmune. Componentes celulares del sistema inmune innato. *Medicine*, 12(24), 1369-1368.
26. N. Larrañaga, e. a. (2014). No nos olvidemos del bazo: el órgano huérfano. *Revista argentina de radiología*, 206-217.
27. Reyes Martín, E., & al, e. (2013). Inmunidad innata e inmunidad adaptativa. *Medicine*, 11(28), 1760-1767.
28. Rubén Díez, e. a. (2010). Manifestaciones gastrointestinales en pacientes con inmunodeficiencias primarias que cursan con déficit de anticuerpos. *Gastroenterología y Hepatología*, 347-351.

29. Sánchez Ramón, S., & Butnaru, D. (2013). Modelos de reconocimiento inmunológico: tolerancia e inmunidad en el marco de la evolución del conocimiento científico. *Inmunología*, 32(4), 139-147.
30. Shahrzad Bakhtiar, e. a. (2017). Treatment of infantile inflammatory bowel disease and autoimmunity by allogenic stem cell transplantation in LPS-Responsive Beige-like anchor deficiency. *Frontiers in immunology*, 1-9.
31. Sima Shokry, e. a. (2016). LPS-responsive beige like anchor gene mutation associated with possible bronchiolitis obliterans organizing pneumonia associated with hypogammaglobulinemia and normal IgM phenotype and low number of B cells. *Acta Medica Iranica*, 620-623.
32. Starr Timothy K, J. S. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol*, 21, 139-176.
33. Tak, M., & Mary, S. (2006). *The Immune Response*. London: Elsevier.
34. V. González de la Calle, M. P.-A. (2016). Inmunodeficiencias primarias. *Medicine*, 1191-1200.
35. Vossenkämper, A., & Spencer, J. (2011). Transitional B cells: How well are the checkpoints for specificity understood? *Arch. Immunol. Ther. Exp.* , 379-384.
36. Wang J, L. R. (2014). Lipopolysaccharide-Responsive Beige-like Anchor (LRBA), a novel regulator of human disorders. *Austin Journal of Clinical Immunology*, 1-9.
37. Wang Wang, J., Howson, J., Haller, E., & G. Keer, W. (2001). Identification of a novel Lipopolysaccharide-inducible gene with key features of both a Kinase anchor proteins and chs1/beige proteins. *The Journal of Immunology*, 166(7), 4586-4595.
38. Zhao, E., Xu, H., Wang, L., Kryczek, I., Wu, K., Hu, Y., . . . Zou, W. (2012). Bone marrow and the control of immunity. *Cellular and Molecular Immunology*, 11-19. Review.