



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

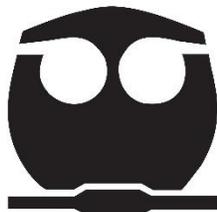
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES *IL2RG*, *CD40L* E *ITGB2*  
EN PACIENTES MEXICANOS CON INMUNODEFICIENCIAS  
PRIMARIAS (IDPs)**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA  
DIEGO IVÁN TORRES VELÁZQUEZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019**



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:**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>PRESIDENTE:</b>    | <b>Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO</b>      |
| <b>VOCAL:</b>         | <b>Profesora: SONIA MAYRA PEREZ TAPIA</b> |
| <b>SECRETARIO:</b>    | <b>Profesora: LAURA BERRÓN RUIZ</b>       |
| <b>1er. SUPLENTE:</b> | <b>Profesor: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA</b> |
| <b>2do. SUPLENTE:</b> | <b>Profesor: ALBERTO ORTEGA VAZQUEZ</b>   |

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN  
INMUNODEFICIENCIAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**ASESOR DEL TEMA:  
LAURA BERRÓN RUIZ**

**SUSTENTANTE(S):  
DIEGO IVÁN TORRES VELÁZQUEZ**

## AGRADECIMIENTOS

## INDICE GENERAL

Página

|   |           |
|---|-----------|
| Lista de abreviaturas   | 6         |
| Índice de figuras   | 8         |
| Índice de tablas  | 12        |
| Resumen   | 15        |
| Abstract  | 16        |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>  | <b>17</b> |
| Inmunodeficiencias primarias y su clasificación   | 17        |
| Inmunodeficiencias primarias  | 17        |
| Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID)   | 19        |
| Citocinas involucradas en la maduración, diferenciación y proliferación de linfocitos T | 21        |
| La cadena gamma común del receptor de IL-2  | 22        |
| Síndrome de Híper-IgM (SHIGM)   | 24        |
| El gen CD40L y su producto proteico   | 26        |
| Hipermutación somática y cambio de isotipo  | 27        |
| Déficit de Adhesión Leucocitaria (LAD)  | 28        |
| Déficit de Adhesión Leucocitaria tipo 1   | 29        |
| Estructura y función normal del gen ITBG2   | 30        |
| Cascada de adhesión leucocitaria  | 31        |
| <b>II. JUSTIFICACIÓN</b>  | <b>33</b> |
| <b>III. HIPÓTESIS</b>   | <b>33</b> |
| <b>IV. OBJETIVO GENERAL</b>   | <b>34</b> |
| <b>V. OBJETIVOS PARTICULARES</b>  | <b>34</b> |
| <b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>34</b> |
| Tipo de investigación   | 34        |
| Criterios de inclusión  | 34        |
| Criterios de exclusión  | 35        |
| Criterios de eliminación  | 35        |
| Obtención de muestras   | 35        |
| Tinciones celulares para citometría de flujo  | 35        |
| Poblaciones leucocitarias y subpoblaciones de linfocitos                                | 35        |

|  |    |
|--|----|
| Purificación de células mononucleares en sangre periférica (PMBC)                | 36 |
| Análisis de la expresión de subpoblaciones de células B en PMBCs                 | 36 |
| Determinación de la expresión de CD40L   | 37 |
| Determinación de CD18. CD11b en monocitos y neutrófilos                          | 37 |
| Técnicas de biología molecular   | 37 |
| Extracción de DNA genómico   | 37 |
| Amplificación de IL2RG por PCR   | 38 |
| Amplificación de CD40L por PCR   | 39 |
| Electroforesis de productos de PCR en gel de agarosa                             | 40 |
| Purificación de productos de PCR mediante digestión enzimática                   | 40 |
| Purificación del producto de secuenciación                                       | 41 |
| Secuenciación y análisis   | 42 |
| <b>VII. RESULTADOS</b>   | 42 |
| Características clínicas de fenotipo y genotipo de pacientes con SCID            | 42 |
| Poblaciones leucocitarias  | 43 |
| Poblaciones de células T, B y NK   | 45 |
| Subpoblaciones de linfocitos T   | 46 |
| Caracterización de mutaciones en el gen IL2RG por técnicas de biología molecular | 51 |
| Amplificación del gen IL2RG por PCR  | 53 |
| Secuenciación y análisis   | 54 |
| Características de fenotipo y genotipo de pacientes con SHIGM                    | 56 |
| Poblaciones leucocitarias  | 56 |
| Poblaciones de linfocitos T, B y células NK                                      | 59 |
| Subpoblaciones de linfocitos T   | 62 |
| Subpoblaciones de linfocitos B   | 64 |
| Caracterización de mutaciones en el gen CD40L por técnicas de biología molecular | 69 |
| Amplificación del gen CD40L por PCR  | 71 |
| Secuenciación y análisis   | 72 |
| Características clínicas de fenotipo y genotipo de pacientes con LAD             | 73 |
| Poblaciones leucocitarias  | 75 |
| Poblaciones de linfocitos T, B y células NK                                      | 78 |

|   |           |
|---|-----------|
| Subpoblaciones de linfocitos T                | 79        |
| Determinación de la expresión de CD18 y CD11b | 82        |
| <b>VIII. DISCUSIÓN</b>                        | <b>91</b> |
| <b>IX. CONCLUSIONES</b>                       | <b>92</b> |
| <b>X. PERSPECTIVAS</b>                        | <b>93</b> |
| <b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>                       | <b>93</b> |
| <b>XII. APÉNDICE</b>                          | <b>98</b> |

## Lista de abreviaturas

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>IDP</b>                  | Inmunodeficiencia Primaria   |
| <b>SCID</b>                 | Inmunodeficiencia Combinada Severa<br>(Del inglés: Severe Combined Immunodeficiency)           |
| <b>SHIGM</b>                | Síndrome de Híper-IgM  |
| <b>LAD</b>                  | Déficit de Adhesión Leucocitaria   |
| <b>DNA</b>                  | <b>Ácido desoxirribonucleico</b>   |
| <b>LASID</b>                | Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias   |
| <b>dNTPs</b>                | Desoxirribonucleotidos trifosfatos   |
| <b>EDTA</b>                 | Ácido etilendiaminotetraacético  |
| <b>Ig</b>                   | Inmunoglobulina  |
| <b>IMF</b>                  | Intensidad media de fluorescencia  |
| <b>PBMC</b>                 | Células Mononucleares de Sangre Periférica (del inglés:<br>Pheripheral Blood Mononuclear Cell) |
| <b>PBS</b>                  | Del inglés: Phosphate-buffered saline  |
| <b>UACM</b>                 | Universidad Autónoma de la Ciudad de México  |
| <b>INP</b>                  | Instituto Nacional de Pediatría  |
| <b>UIID</b>                 | Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias  |
| <b>PMA</b>                  | Del inglés: Phorbol 12-myristato 13-acetato  |
| <b><math>\gamma</math>c</b> | Cadena gamma común del receptor de IL-2  |
| <b>JAK3</b>                 | Cinasa de Janus 3  |
| <b>STAT</b>                 | Del inglés: Signaling transducer and activator of transcription                                |
| <b>AICDA</b>                | Del inglés: Activation-induced cytidine deaminase  |
| <b>UNG</b>                  | Del inglés: Uracil DNA glycosylase   |
| <b>NEMO</b>                 | Modulador esencial de NF-kB (del inglés: NF-kappa-B essential modulator)                       |
| <b>CMV</b>                  | Citomegalo virus   |
| <b>VHB</b>                  | Virus de la hepatitis B  |
| <b>VHC</b>                  | Virus de la hepatitis C  |
| <b>TNF</b>                  | Factor de necrosis tumoral   |
| <b>BCR</b>                  | Receptor de células B  |
| <b>RAG</b>                  | Gen Activador de la recombinación  |

|              |   |
|--------------|---|
| <b>ICAM</b>  | Moléculas de adhesión intercelular (del inglés: Intercellular adhesion molecule)                |
| <b>LFA-1</b> | Antígeno asociado a función linfocitaria (del inglés: Lymphocyte function-associated antigen-1) |
| <b>cbp</b>   | cuanto baste para   |
| <b>PCR</b>   | Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés: Polymerase Chain Reaction)                     |

## INDICE DE FIGURAS

|  | Páginas |
|--|---------|
| Figura 1. Frecuencias de observación de IDPs.  | 19      |
| Figura 2. Porcentajes de registro de IDPs de los países participantes de LASID                                       | 20      |
| Figura 3. Casos y porcentajes de registro de IDPs de cada participante de LASID.                                     | 20      |
| Figura 4. Afinidad del receptor de IL-2 por su ligando de acuerdo con la expresión de las subunidades constitutivas. | 24      |
| Figura 5. Localización cromosómica y estructura del gen IL2RG.   | 24      |
| Figura 6. Modelo de la vía de señalización mediada por el receptor de IL-2.  | 25      |
| Figura 7.- Estructura del gen CD40L y sus regiones o dominios.   | 27      |
| Figura 8.- Señales de activación antígeno-dependiente de los linfocitos B.   | 28      |
| Figura 9.- Diagrama de las vías implicadas en cada una de las variantes de LAD.                                      | 30      |
| Figura 10.- Estructura del gen ITGB2.  | 32      |
| Figura 11.- Condiciones de PCR para IL2RG.   | 40      |
| Figura 12.- Condiciones de PCR para CD40L.   | 41      |
| Figura 13.- Condiciones para incubación de digestión enzimática.   | 42      |
| Figura 14.- Selección de poblaciones leucocitarias en sangre periférica en controles sanos y pacientes.              | 45      |
| Figura 15.- Análisis estadístico de leucocitos totales en controles y pacientes.                                     | 47      |
| Figura 16.- Análisis estadístico de leucocitos totales en controles sanos y pacientes.                               | 47      |
| Figura 17.- Análisis estadístico de neutrófilos totales en controles sanos y pacientes.                              | 48      |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 18.- Análisis estadístico de monocitos en controles sanos y pacientes.</b>   | <b>48</b> |
| <b>Figura 19.- Porcentaje de las poblaciones de células T, B y NK en controles sanos y pacientes.</b>  | <b>49</b> |
| <b>Figura 20. Análisis estadístico de los linfocitos T CD3+ en controles sanos y pacientes.</b>  | <b>52</b> |
| <b>Figura 21- Análisis estadístico de los linfocitos B CD19+ en controles sanos y pacientes.</b>   | <b>52</b> |
| <b>Figura 22.- Análisis estadístico de las células NK CD16+CD56+ en controles sanos y pacientes.</b>   | <b>52</b> |
| <b>Figura 23.- Porcentaje de las poblaciones de células T CD4+ y CD8+ en controles sanos y pacientes.</b>  | <b>53</b> |
| <b>Figura 24.- Análisis estadístico de los linfocitos T CD3+ CD4+ en controles sanos y pacientes.</b>  | <b>54</b> |
| <b>Figura 25.- Análisis estadístico de los linfocitos T CD3+ CD8+ en controles sanos y pacientes.</b>  | <b>55</b> |
| <b>Figura 26.- Amplificación de los exones 1 y 7 del gen IL2RG. El exón 1 consta de 512 pb, mientras que el exón 7 consta de 538 pares de bases.</b> | <b>56</b> |
| <b>Figura 27.- Análisis de la secuenciación del exón 7 del paciente 1.</b>   | <b>57</b> |
| <b>Figura 28.- Análisis de la secuenciación del exón 7 del paciente 2.</b>   | <b>57</b> |
| <b>Figura 29.- Análisis estadístico de los leucocitos totales en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>  | <b>60</b> |
| <b>Figura 30.- Análisis estadístico de neutrófilos en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>   | <b>60</b> |
| <b>Figura 31.- Análisis estadístico de linfocitos en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>  | <b>60</b> |
| <b>Figura 32.- Análisis estadístico de monocitos en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>   | <b>61</b> |
| <b>Figura 33.- Análisis estadístico de linfocitos T CD3+ en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>   | <b>63</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 34.- Análisis estadístico de linfocitos B CD19+ en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>                          | <b>64</b> |
| <b>Figura 35.- Análisis estadístico de células NK CD16+/56+ en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>                        | <b>64</b> |
| <b>Figura 36.- Análisis estadístico de linfocitos T CD3+ CD4+ en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>                      | <b>66</b> |
| <b>Figura 37.- Análisis estadístico de linfocitos T CD3+ CD8+ en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>                      | <b>66</b> |
| <b>Figura 38.- Análisis estadístico de células B naive en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>                             | <b>69</b> |
| <b>Figura 39.- Análisis estadístico de células B de memoria sin cambio de isotipo, en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b> | <b>70</b> |
| <b>Figura 40.- Análisis estadístico de células B de memoria con cambio de isotipo, en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b> | <b>70</b> |
| <b>Figura 41.- Análisis estadístico de células B de memoria total en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>                  | <b>70</b> |
| <b>Figura 42.- Análisis estadístico de células transicionales en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>                      | <b>71</b> |
| <b>Figura 43.- Análisis estadístico de plasmablastos en controles sanos y pacientes con SHIGM.</b>                               | <b>71</b> |
| <b>Figura 44.- Amplificación del gen CD40L mediante PCR.</b>   | <b>73</b> |
| <b>Figura 45.- Análisis de la secuenciación del exón 4 en pacientes 1 y 2 de SHIGM.</b>  | <b>74</b> |
| <b>Figura 46.- Análisis de la secuenciación del exón 3 en paciente 3 de SHIGM.</b>   | <b>74</b> |
| <b>Figura 47.- Análisis estadístico de los leucocitos totales en controles sanos y pacientes con LAD.</b>                        | <b>76</b> |
| <b>Figura 48.- Análisis estadístico de neutrófilos en controles sanos y pacientes con LAD.</b>                                   | <b>76</b> |
| <b>Figura 49.- Análisis estadístico de linfocitos en controles sanos y pacientes con LAD.</b>                                    | <b>77</b> |
| <b>Figura 50.- Análisis estadístico de monocitos en controles sanos y pacientes con LAD.</b>                                     | <b>77</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 51.- Análisis estadístico de linfocitos T CD3+ en controles sanos y pacientes con LAD.</b>                      | <b>79</b> |
| <b>Figura 52.- Análisis estadístico de linfocitos B CD19+ en controles sanos y pacientes con LAD.</b>                     | <b>80</b> |
| <b>Figura 53.- Análisis estadístico de células NK CD16+56+ en controles sanos y pacientes con LAD.</b>                    | <b>80</b> |
| <b>Figura 54.- Análisis estadístico de linfocitos T CD3+ CD4+ en controles sanos y pacientes con LAD.</b>                 | <b>82</b> |
| <b>Figura 55.- Análisis estadístico de linfocitos T CD3+ CD8+ en controles sanos y pacientes con LAD.</b>                 | <b>82</b> |
| <b>Figura 56.- Análisis de citometría de flujo para la determinación de CD18 y CD11b.</b>                                 | <b>83</b> |
| <b>Figura 57.- Análisis estadístico de la determinación de CD18 en monocitos de controles sanos y pacientes con LAD.</b>  | <b>84</b> |
| <b>Figura 58.- Análisis estadístico de la determinación de CD11b en monocitos de controles sanos y pacientes con LAD.</b> | <b>85</b> |

## INDICE DE TABLAS

## Páginas

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1. Fenotipos celulares relacionados con SCID, defectos característicos, localización comosómica, mecanismo de afección y frecuencia relativa.</b> | <b>21</b> |
| <b>Tabla 2.- Variantes del SHIGM y su genotipo asociado.</b>   | <b>26</b> |
| <b>Tabla 3.- Variantes de LAD y su genotipo asociado.</b>  | <b>30</b> |
| <b>Tabla 4.- Anticuerpos utilizados para cada subpoblación de células B.</b>   | <b>38</b> |
| <b>Tabla 5.- Reactivos utilizados en PCR de IL2RG. Para un volumen final de 25 µL.</b>   | <b>40</b> |
| <b>Tabla 6.- Iniciadores de los exones usados en la amplificación de IL2RG.</b>  | <b>40</b> |
| <b>Tabla 7.- Reactivos utilizados en PCR de CD40L. Para volumen final de 25 µL.</b>  | <b>41</b> |
| <b>Tabla 8.- Iniciadores de los exones usados en la amplificación de CD40L.</b>  | <b>41</b> |
| <b>Tabla 9.- Reactivos utilizados en la digestión enzimática de productos de PCR. Para volumen de 20 µL de producto.</b>                                   | <b>42</b> |
| <b>Tabla 10.- Reactivos empleados en la reacción de secuenciación.</b>   | <b>43</b> |
| <b>Tabla 11.- Valores de inmunoglobulinas séricas y características clínicas de los pacientes.</b>   | <b>44</b> |
| <b>Tabla 12.- Resumen de características clínicas de los nueve pacientes.</b>  | <b>44</b> |
| <b>Tabla 13.- Valores normales de inmunoglobulinas séricas en pacientes.</b>   | <b>45</b> |
| <b>Tabla 14.- Valores porcentuales y absolutos de poblaciones leucocitarias en testigos.</b>   | <b>46</b> |
| <b>Tabla 15.- Valores porcentuales y absolutos de poblaciones leucocitarias en pacientes.</b>  | <b>46</b> |
| <b>Tabla 16.- Valores normales de poblaciones leucocitarias.</b>   | <b>46</b> |
| <b>Tabla 17.- Porcentajes y valores absolutos de linfocitos T y B en controles sanos.</b>  | <b>50</b> |
| <b>Tabla 18.- Porcentajes y valores absolutos de linfocitos T y B en los pacientes.</b>  | <b>50</b> |
| <b>Tabla 19.- Valores normales de porcentajes y valores absolutos de linfocitos T y B.</b>   | <b>50</b> |
| <b>Tabla 20.- Valores porcentuales y absolutos de la población de células NK en controles sanos.</b>   | <b>51</b> |
| <b>Tabla 21.- Valores porcentuales y absolutos de la población de células NK en pacientes.</b>   | <b>51</b> |
| <b>Tabla 22.- Valores normales en porcentajes y valores absolutos de</b>   |           |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>células NK CD16+56+.</b>   | <b>51</b> |
| <b>Tabla 23.- Valores porcentuales y absolutos de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en controles sanos.</b>         | <b>53</b> |
| <b>Tabla 24.- Valores porcentuales y valores absolutos de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes.</b>       | <b>54</b> |
| <b>Tabla 25.- Valores normales para los valores porcentuales y absolutos de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+.</b>  | <b>54</b> |
| <b>Tabla 26.- Detalles de secuenciación masiva de los pacientes de estudio en SCID.</b>                                       | <b>55</b> |
| <b>Tabla 27.- Valores de inmunoglobulinas y características clínicas de los pacientes de SHIGM.</b>                           | <b>58</b> |
| <b>Tabla 28.- Valores porcentuales y absolutos de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos en testigos sanos.</b>      | <b>59</b> |
| <b>Tabla 29.- Valores porcentuales y absolutos de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos en pacientes con SHIGM.</b> | <b>59</b> |
| <b>Tabla 30.- Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T y B en testigos sanos.</b>                                     | <b>62</b> |
| <b>Tabla 31.- Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T y B en pacientes con SHIGM.</b>                                | <b>62</b> |
| <b>Tabla 32.- Valores porcentuales y absolutos de células NK en testigos sanos.</b>   | <b>62</b> |
| <b>Tabla 33.- Valores porcentuales y absolutos de células NK en pacientes con SHIGM.</b>                                      | <b>63</b> |
| <b>Tabla 34.- Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ CD4+ y CD3+ CD8+.</b>                                     | <b>65</b> |
| <b>Tabla 35.- Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ CD4+ y CD3+ CD8+.</b>                                     | <b>65</b> |
| <b>Tabla 36.- Valores porcentuales y absolutos de células B de memoria y naive en testigos sanos.</b>                         | <b>67</b> |
| <b>Tabla 37.- Valores porcentuales y absolutos de células B de memoria y naive en pacientes de SHIGM.</b>                     | <b>67</b> |
| <b>Tabla 38.- Valores de referencia para las células B de memoria y naive.</b>  | <b>68</b> |
| <b>Tabla 39.- Valores porcentuales y absolutos de células transicionales y plasmablastos en testigos sanos.</b>               | <b>68</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabla 40.- Valores porcentuales y absolutos de células transicionales y plasmablastos en pacientes con SHIGM.</b>                      | <b>68</b> |
| <b>Tabla 41.- Valores de referencia para células transicionales y plasmablastos.</b>  | <b>69</b> |
| <b>Tabla 42.- Detalles de secuenciación masiva de los pacientes de estudio en SHIGM.</b>  | <b>72</b> |
| <b>Tabla 43.- Valores porcentuales y absolutos de poblaciones leucocitarias en testigos sanos para LAD-1.</b>                             | <b>75</b> |
| <b>Tabla 44.- Valores porcentuales y absolutos de poblaciones leucocitarias en pacientes de LAD-1.</b>                                    | <b>76</b> |
| <b>Tabla 45.- Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T y B en testigos sanos.</b>   | <b>78</b> |
| <b>Tabla 46.- Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T y B en pacientes de LAD-1.</b>   | <b>78</b> |
| <b>Tabla 47.- Valores porcentuales y absolutos de células NK en testigos sanos.</b>   | <b>79</b> |
| <b>Tabla 48.- Valores porcentuales y absolutos de células NK en pacientes de LAD-1.</b>   | <b>79</b> |
| <b>Tabla 49.- Valores porcentuales y absolutos de las subpoblaciones de linfocitos T en testigos sanos.</b>                               | <b>81</b> |
| <b>Tabla 50.- Valores porcentuales y absolutos de las subpoblaciones de linfocitos T para pacientes de LAD-1.</b>                         | <b>81</b> |
| <b>Tabla 51.- Valores de Intensidad Media de Fluorescencia para la determinación de las moléculas CD18 y CD11b en testigos sanos.</b>     | <b>83</b> |
| <b>Tabla 52.- Valores de Intensidad Media de Fluorescencia para la determinación de las moléculas CD18 y CD11b en pacientes de LAD-1.</b> | <b>84</b> |

## RESUMEN

Las inmunodeficiencias primarias son trastornos del sistema inmunológico que se encuentran estrechamente relacionados con su desarrollo normal y adecuado funcionamiento. Tienen su origen en alteraciones genéticas de los componentes de la respuesta inmune innata o adaptativa. Sus manifestaciones clínicas suelen presentarse a edades tempranas y son, en muchos casos, muy agresivas. Terapias de restitución de células progenitoras hematopoyéticas o trasplantes de médula ósea, entre otras alternativas, representan al día de hoy, la mejor esperanza de vida de pacientes alrededor del mundo. Debido a su diversa naturaleza, se han clasificado en 8 grupos, mencionados más adelante pero que, abarcan a las 3 inmunodeficiencias que se analizaron en este trabajo.

La Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID) se caracteriza por ausencia o baja cantidad de linfocitos T funcionales, derivando en una falla general de la respuesta inmune adaptativa. La causa del fenotipo T-B+NK- (linfocitos), se asocia a mutaciones en el gen *IL2RG*, codificante para la cadena  $\gamma$  y común ( $\gamma$ c) del receptor de citocinas como IL-2, IL-7 e IL-15, entre otras. Su señalización forma parte fundamental para la maduración y proliferación de los linfocitos T, principalmente. El Síndrome Híper-IgM ligado al X (SHIGM) se caracteriza por niveles séricos normales o elevados de IgM y niveles bajos de IgA o IgG. Causada por fallas en la señalización CD40-CD40L debida a mutaciones en el gen *CD40L*, tiene repercusiones en la maduración e instrucción de linfocitos B para efectuar cambios de isotipo en las inmunoglobulinas y montar memoria contra antígenos específicos. El Déficit de Adhesión Leucocitaria (LAD) específicamente, LAD tipo 1, se caracteriza por afecciones en el paso denominado “de adhesión firme”, de la cascada de adhesión leucocitaria, que permite la respuesta y el desplazamiento de monocitos y neutrófilos a los sitios de infección cuando se requiere. El LAD-1 se asocia comúnmente con mutaciones en el gen *ITGB2*, codificante para la cadena común beta 2 de la integrina, participante en la adhesión firme ya mencionada.

Se realizó un estudio fenotípico a pacientes con diagnóstico de tres inmunodeficiencias (n= 9 SCID; n= 9 SHIGM; n= 6 LAD-1). Se realizó el análisis molecular a pacientes con SCID e SHIGM. Es de destacar la observación de diferencias significativas en las poblaciones celulares que, de acuerdo con la literatura, son las principalmente afectadas como rasgo de las inmunodeficiencias. El propósito del presente trabajo es el de corroborar la localización y efecto de las mutaciones puntuales dentro de los genes de interés para cada IDP, que fueron sugeridas por estudios previos de secuenciación masiva; esto mediante el uso de la secuenciación Sanger, técnica reconocida como estándar para la validación de técnicas como la ya mencionada. Es importante llegar al diagnóstico definitivo en los pacientes con IDP's, para el tratamiento sea oportuno y no ponga en peligro la vida del paciente.

Nuestros resultados fueron la corroboración de dos mutaciones para pacientes con SCID; dos mutaciones en pacientes con SHIGM y el análisis fenotípico en pacientes con LAD-1.

## ABSTRACT

Primary immunodeficiencies are disorders of the immune system that are closely related to their normal development and adequate function. They have their origin in genetic alterations of the components of the innate or adaptive immune response. Their clinical manifestations usually present at an early age and are, in many cases, very aggressive. Therapies of restitution of hematopoietic progenitor cells or bone marrow transplants, among other alternatives, represent, today, the best life expectancy for patients around the world. Due to their diverse nature, they have been classified into 8 groups, mentioned below but that, encompass the 3 immunodeficiencies that were analyzed in this work.

Severe Combined Immunodeficiency (SCID) is characterized by absence or low number of functional T lymphocytes, resulting in a general failure of the adaptive immune response. The cause of the T-B + NK- (lymphocyte) phenotype is associated with mutations in the IL2RG gene, coding for the common  $\gamma$  chain ( $\gamma_c$ ) of the cytokine receptor such as IL-2, IL-7 and IL-15, among others Its signaling is a fundamental part for the maturation and proliferation of T lymphocytes, mainly. X-linked IgM-Hyper Syndrome (SHIGM) is characterized by normal or elevated serum levels of IgM and low levels of IgA or IgG. Caused by faults in the CD40-CD40L signaling due to mutations in the CD40L gene, it has repercussions in the maturation and instruction of B lymphocytes to effect isotype changes in immunoglobulins and mount memory against specific antigens. The Leukocyte Adhesion Deficit (LAD) specifically, LAD type 1, is characterized by conditions in the step called "firm adhesion", the leukocyte adhesion cascade, which allows the response and displacement of monocytes and neutrophils to the sites of infection when required. LAD-1 is commonly associated with mutations in the ITGB2 gene, coding for the integrin beta 2 common chain, participant in the aforementioned firm adhesion.

A phenotypic study was performed in patients with a diagnosis of three immunodeficiencies (n = 9 SCID, n = 9 SHIGM, n = 6 LAD-1). The molecular analysis was performed on patients with SCID and SHIGM. Of note is the observation of significant differences in cell populations that, according to the literature, are mainly affected as a feature of immunodeficiencies. The purpose of this work is to corroborate the location and effect of point mutations within the genes of interest for each IDP, which were suggested by previous studies of massive sequencing; This is done through the use of Sanger sequencing, a technique recognized as a standard for the validation of techniques such as that already mentioned. It is important to arrive at the definitive diagnosis in patients with PID, for the treatment to be timely and not endanger the life of the patient.

Our results were the corroboration of two mutations for patients with SCID; two mutations in patients with SHIGM and phenotypic analysis in patients with LAD-1.

## 1. INTRODUCCIÓN

### **Inmunodeficiencias y su clasificación**

El propósito principal del Sistema Inmunológico (SI) consiste en llevar a cabo el reconocimiento de agentes antigénicos (propios o extraños) y actuar de acuerdo con la naturaleza y procedencia de cada uno de ellos. El reconocimiento específico de antígenos inmunogénicos constituye un mecanismo fundamental para conservar la integridad biológica de los individuos. De presentarse alteraciones en la respuesta del SI, éstas se manifestarán en forma de infecciones agravadas por organismos oportunistas, alergias, procesos autoinflamatorios y/o neoplasias (1) (2).

El término “Inmunodeficiencia” está definido como el amplio grupo de patologías que incapacitan al SI, ya sea a nivel celular o humoral, para montar una respuesta adecuada en contra de agentes antigénicos y/o inmunogénicos a los que un organismo se vea expuesto. Las enfermedades por inmunodeficiencia son entonces, consecuencia o manifestación de los cambios sufridos en las rutas naturales de la respuesta inmune innata o adaptativa. De acuerdo con la naturaleza del defecto en el SI, las inmunodeficiencias se clasifican en dos tipos (3, 4):

1. Inmunodeficiencias primarias o congénitas: Causadas por mutaciones presentes dentro de uno o más de los genes codificantes a componentes del SI. Originan alteraciones en las proteínas codificadas por el material genético. Pueden ser identificadas dentro de la infancia temprana (3) .
2. Inmunodeficiencias secundarias o adquiridas: Se presentan en mayor frecuencia y debido a causas de diversa naturaleza, tales como terapias inmunosupresoras, procesos inflamatorios, desnutrición, extirpación de órganos linfoides, exposición a radiación con fines terapéuticos o medioambientales, etc. (3).

### **Inmunodeficiencias Primarias (IDPs)**

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) son un amplio grupo de trastornos del SI, que impiden su desarrollo y correcto funcionamiento. Su origen se basa en mutaciones dentro de los genes codificantes para los diversos componentes de la respuesta inmunológica. Se presentan mediante múltiples patrones de herencia. Pueden manifestar sus afecciones tanto en la respuesta inmunológica celular como humoral y dependiendo de la localización del fallo y de los mecanismos implicados, será la gravedad de la enfermedad desarrollada (1, 5). Tienen una prevalencia que varía de acuerdo con factores tanto dependientes del paciente

como independientes (desconocimiento de los padecimientos, falta de diagnóstico o registro de pacientes). Aquellas IDPs que siguen un patrón de herencia recesivo ligado al X, afectan principalmente a los varones durante la infancia temprana (6).

Trabajando en conjunto, la Organización Mundial de la Salud, el comité de Clasificación de Inmunodeficiencias Primarias de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología, han clasificado a las IDPs en 8 grupos de acuerdo con el componente del SI que se encuentren afectados por la IDP, de manera tal que podemos hablar de IDPs de la inmunidad celular, humoral y de componentes de la respuesta inmune innata (3, 7).

Los 8 grupos de esta clasificación son:

1. Inmunodeficiencias combinadas de células B y T
2. Inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos
3. Otros síndromes de inmunodeficiencias bien definidos
4. Enfermedades por disregulación inmunitaria
5. Defectos congénitos del número o función de los fagocitos, o de ambos
6. Defectos de la inmunidad innata
7. Trastornos autoinflamatorios
8. Deficiencias del complemento

De entre estos grupos, las IDPs que son observadas con mayor frecuencia son las inmunodeficiencias de anticuerpos. El segundo lugar de frecuencias lo comparten el grupo de inmunodeficiencias bien definidas y los defectos de número y función de los fagocitos. Las IDPs de mayor gravedad son aquellas que afectan el desarrollo de linfocitos T ya que su manifestación, a través de infecciones graves y recurrentes, es observable dentro de los primeros años de vida, siendo mortal de no recibirse atención y tratamiento oportuno (6) .

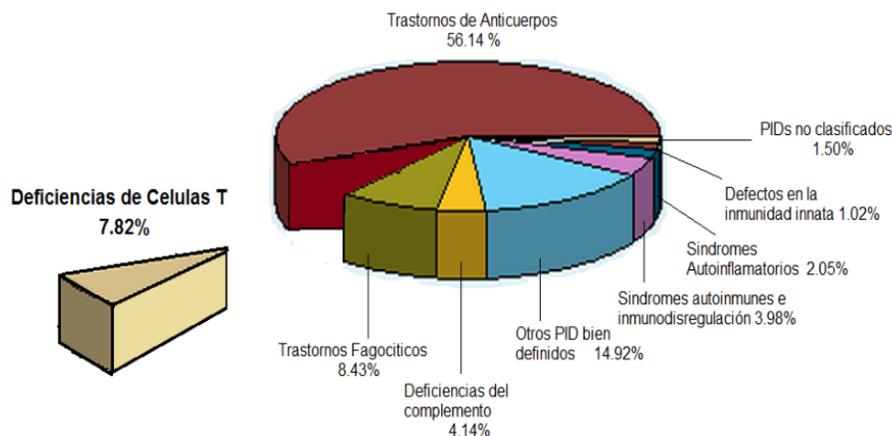


Figura 1. Frecuencias de observación de IDPs. [www.esid.gob](http://www.esid.gob)

Para el año 2015, dentro del periodo de noviembre a diciembre, la Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias (LASID), publicó estadísticas acerca de los registros de IDPs en los 14 países que la conforman. En el periodo mencionado, se llevó a cabo el registro de 6 332 pacientes en la base de datos de LASID (8).

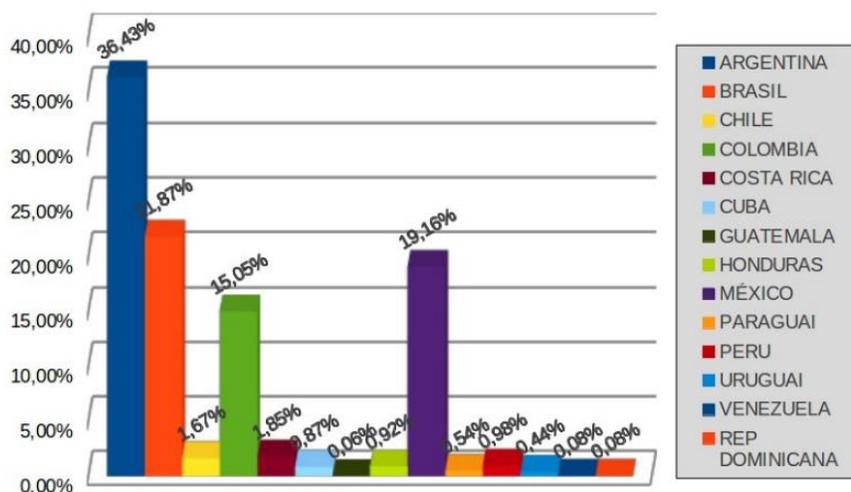


Figura 11. Porcentajes de registro de IDPs de los países participantes de LASID. [https://fumeni.org.mx/wp-content/uploads/2016/01/Estatisticas\\_LASID-2015-Dez.pdf?x79361](https://fumeni.org.mx/wp-content/uploads/2016/01/Estatisticas_LASID-2015-Dez.pdf?x79361)

| PAÍS           | MAIO – JUL  | JUL – AGO   | AGO – SET   | SET – NOV   | NOV – DEZ   |                |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| ARGENTINA      | 2264        | 2281        | 2288        | 2297        | 2307        | 36,43%         |
| BRASIL         | 1304        | 1325        | 1343        | 1378        | 1385        | 21,87%         |
| CHILE          | 104         | 105         | 105         | 106         | 106         | 1,67%          |
| COLOMBIA       | 838         | 844         | 847         | 953         | 953         | 15,05%         |
| COSTA RICA     | 113         | 113         | 117         | 117         | 117         | 1,85%          |
| CUBA           | 55          | 55          | 55          | 55          | 55          | 0,87%          |
| GUATEMALA      | 1           | 1           | 4           | 4           | 4           | 0,06%          |
| HONDURAS       | 58          | 58          | 58          | 58          | 58          | 0,92%          |
| MÉXICO         | 1058        | 1112        | 1171        | 1200        | 1213        | 19,16%         |
| PARAGUAI       | 2           | 14          | 20          | 20          | 34          | 0,54%          |
| PERU           | 56          | 56          | 60          | 62          | 62          | 0,98%          |
| REP DOMINICANA | 3           | 3           | 3           | 5           | 5           | 0,08%          |
| URUGUAI        | 28          | 28          | 28          | 28          | 28          | 0,44%          |
| VENEZUELA      | 5           | 5           | 5           | 5           | 5           | 0,08%          |
| <b>TOTAIS</b>  | <b>5889</b> | <b>6000</b> | <b>6104</b> | <b>6288</b> | <b>6332</b> | <b>100,00%</b> |

Figura 12. Casos y porcentajes de registro de IDPs de cada participante de LASID. [https://fumeni.org.mx/wp-content/uploads/2016/01/Estatisticas\\_LASID-2015-Dez.pdf?x79361](https://fumeni.org.mx/wp-content/uploads/2016/01/Estatisticas_LASID-2015-Dez.pdf?x79361)

### Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID)

La Inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID) es la denominación de un grupo de padecimientos que cuya característica fenotípica más representativa es una cantidad de linfocitos T funcionales baja o prácticamente nula. En muchos casos, dicho rasgo fenotípico

se acompaña de poblaciones disminuidas de células B o células NK; fenotipo que desemboca finalmente en una ausencia de la respuesta inmune adaptativa (6, 9).

Las manifestaciones clínicas de estos pacientes son en su mayoría infecciones recurrentes del tracto respiratorio por organismos oportunistas, susceptibilidad aumentada a infecciones virales de gran severidad o incluso mortales y fallos en el crecimiento presentes desde los primeros meses de vida (10, 11).

Este padecimiento puede seguir dos patrones de herencia: recesivo ligado al X y autosómico recesivo, dependiendo de la localización del gen involucrado. Si el gen involucrado tiene influencia sobre las poblaciones de linfocitos B y células NK, se pueden obtener 4 perfiles fenotípicos que tienen en común la afectación en la población de linfocitos T y una producción alterada de inmunoglobulinas (12).

Tabla 1. Fenotipos celulares relacionados con SCID, defectos característicos, localización cromosómica, mecanismo de afección y frecuencia relativa(12).

| <b>Fenotipo</b> | <b>Defecto causal</b>                            | <b>Localización cromosómica</b> | <b>Mecanismo implicado</b>  | <b>Casos de SCID</b> |
|-----------------|--|---------------------------------|---|----------------------|
| T-B+NK+         | Deficiencia de IL-7R $\alpha$                    | 5p13                            | Señalización defectuosa por receptores de citocinas.                                | ~10%                 |
|                 | Deficiencia de CD3 $\delta$                      | 11q23                           |   | < 2%                 |
|                 | Deficiencia de CD3 $\alpha$                      | 11q23                           | Señalización defectuosa por receptor de células T.                                  | < 2%                 |
| T-B+NK-         | Deficiencia de $\gamma_c$                        | Xq13.1                          | Señalización defectuosa por receptores de citocinas.                                | ~50%                 |
|                 | Deficiencia de JAK3                              | 11q31-1q32                      |   | ~7-14%               |
|                 | Deficiencia de CD45                              | 19p13.1                         | Señalización defectuosa por receptor de células T                                   | < 2%                 |
| T-B-NK+         | Deficiencia de Artemis, Cernunnos, ADN ligasa IV | 10p13, 2q35, 13q33              | Defectos de recombinación V(D)J.  | ~30%<br>(juntas)     |
|                 | Deficiencia de RAG-1 y 2                         | 11p13                           | Defectos de recombinación V(D)J.  |                      |
| T-B-NK-         | Deficiencia de ADA                               | 20q13.11                        | Muerte prematura de precursores linfoides por defecto en el metabolismo de purinas. | ~10%                 |

La SCID puede ser diagnosticada desde el momento del nacimiento cuando se detecta linfopenia con valores de menos de 2000 linfocitos/ $\mu$ L o una proliferación disminuida ante el postestímulo mitogénico *in vitro* (18).

Responsable de aproximadamente el 50% de los casos de este padecimiento, el SCID ligado al X tiene su causa en mutaciones en la cadena  $\gamma_c$  (gamma común) del receptor de interleucinas 2, 4, 7, 9, 15 y 21. Debido a su patrón de herencia, los casos de SCID en varones eran observados con una mayor prevalencia (19).

Como consecuencia de las mutaciones en el gen *IL2RG*, que codifica para la cadena  $\gamma_c$ , pueden presentarse efectos como una expresión disminuida de la proteína en la superficie celular, fallos en la unión de citocinas al receptor compuesto por esta cadena o alteraciones en la transducción de señales intracelular al no existir una buena comunicación con la *Cinasa de Janus 3* (JAK3)(13).

Las mutaciones dentro del gen *IL2RG*, el cual consta de 8 exones, se presentan con una prevalencia de aproximadamente el 50% dentro del exón 5, que codifica para parte de la porción extracelular de la proteína. También se reportan numerosas mutaciones en el exón 7, correspondiente al dominio intracelular con homología de tirosincinasa y encargado de la transmisión de señales por su asociación con JAK3 (13).

En conjunto, estos efectos desembocan en el fenotipo característico de los pacientes con SCID: T-B+NK-. Los trastornos provocados también pueden observarse a nivel de fallos en el desarrollo de células epiteliales y dendríticas del timo (14). El desarrollo y maduración adecuados de los linfocitos T, se estanca dentro del estadio doble negativo (CD4- CD8-), fase previa al rearrreglo de los genes codificante para el receptor de células T(15).

### **Citocinas involucradas en la maduración, diferenciación y proliferación de linfocitos T**

Las citocinas son un amplio grupo de moléculas que tienen un importante papel en múltiples procesos del SI. Son producidos en su mayoría por linfocitos y tienen la capacidad de ejercer su efecto a pesar de encontrarse a muy bajas concentraciones y de contar con una vida media reducida, esto debido a que se unen a receptores específicos de alta afinidad. Las citocinas ejercen un efecto autocrino si se unen y transmiten señales sobre la misma célula por las que fueron producidas; un efecto paracrino si el efecto se ha de producir en una célula diferente a la productora, pero estas células son cercanas y un efecto endocrino si las citocinas deben viajar a través del torrente sanguíneo para llegar a su célula blanco. Dentro

de las clasificaciones de citocinas, las interleucinas son de las más importantes debido a su amplio rango de efectos para el SI (16).

La interleucina 2 (IL-2) es una linfocina de carácter glicoproteico producida por los linfocitos T una vez que es inducida tras la activación celular mediada por antígenos o mitógenos. Actúa dando inicio a la progresión del ciclo celular desde la fase  $G_0$  hasta la fase S en todas las células en las que está presente su receptor (IL-2R), tales como linfocitos T y B, células NK, timocitos y monocitos. Otras de sus funciones consisten en incrementar la capacidad citotóxica de las células NK y de los monocitos, inducir la proliferación y diferenciación de los linfocitos B(17).

Al ocurrir la estimulación de los linfocitos T mediada por la presentación de antígenos, gracias a las células presentadoras, la respuesta consecuente es la proliferación autocrina, es decir, la liberación de citocinas cuyo efecto se llevará a cabo en la misma célula productora y otros linfocitos T. únicamente los linfocitos T reciben la señalización que conlleva a la activación de los genes codificantes de IL-2 (18).

### **La cadena $\gamma_c$ del receptor de IL-2**

El receptor de IL-2, presente en la membrana de linfocitos T, debe su expresión a la activación de estas células por estímulos antigénicos o mitogénicos, así como también la síntesis de IL-2. El receptor está formado por 3 subunidades, las cuales reciben su denominación particular en función de su peso molecular: la cadena  $\alpha$  (p55), la cadena  $\beta$  (p70) y la cadena  $\gamma_c$  (p64). Puede existir en tres formas de las que depende su afinidad por el ligando: baja afinidad (únicamente compuesto por la cadena  $\alpha$ ), afinidad intermedia (compuesto por las cadenas  $\beta$  y  $\gamma_c$ ) y el receptor de alta afinidad (compuesto por las tres cadenas en expresión simultánea). Sólo el receptor de afinidad intermedia y alta son capaces de transmitir los efectos biológicos de la IL-2 (19).

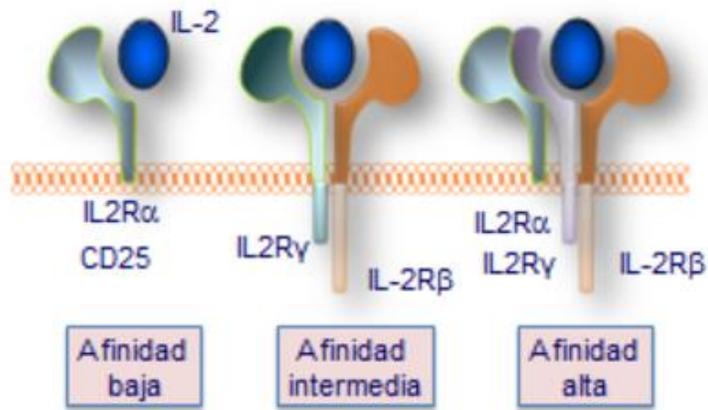


Figura 13. Afinidad del receptor de IL-2 por su ligando de acuerdo con la expresión de las subunidades constitutivas. <http://www.inmunologiaenlinea.es>

La cadena  $\gamma_c$  está compuesta por 347 aminoácidos y es codificada por el gen *IL2RG*, ubicado en Xq13.1. Se trata de un gen de 8 exones cuyo producto proteico tiene un peso de 64 kD distribuidos en distintas regiones. Su región extracelular (de 254 aminoácidos) contiene 4 motivos de cisteína y un motivo WSXWS; está considerada dentro de la familia de receptores para factores de crecimiento y es el dominio responsable de la interacción con la citocina (20).

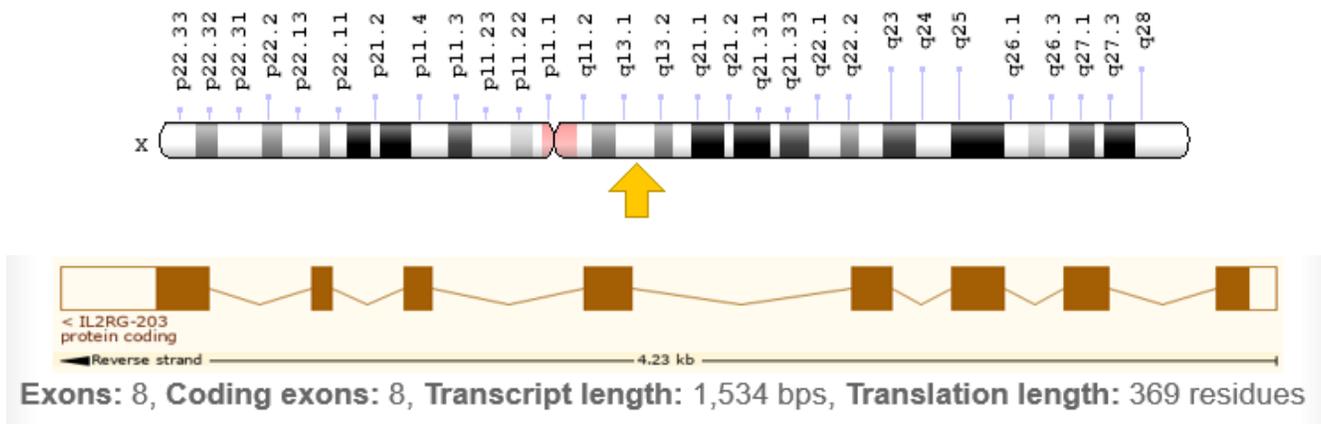


Figura 14. Localización cromosómica y estructura del gen *IL2RG*. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Su región intracitoplasmática (que contiene 86 aminoácidos) participa en conjunto con la cadena  $\beta$  en la transmisión de señales. Es un dominio conocido por su homología con la familia de las tirosincinasas y se encarga de la interacción con JAK3(21) (22).

La vía de señalización mediada por el receptor de IL-2 tiene como primer paso la inducción por el ligando de la asociación, en dímero o trímero, de los componentes del receptor que en

sus dominios intracitoplasmáticos se encuentran acoplados a moléculas de señalización. La señalización continúa con la transfosforilación y posterior activación de JAK3 asociada a la cadena  $\gamma_c$ . Una vez que se efectuó la activación, JAK3 fosforila a las cadenas del receptor con el propósito de generar sitios de unión para las proteínas STATs, las cuales son atraídas por el residuo fosforilado del receptor. Una vez fosforiladas, forman dímeros que se trasladan al núcleo para unirse a sitios promotores en la secuencia de ADN (22, 23).

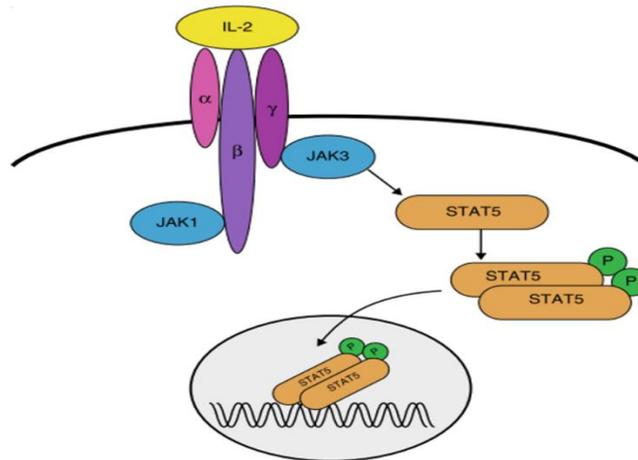


Figura 15. Modelo de la vía de señalización mediada por el receptor de IL-2(23).

### Síndrome de Híper-IgM

El Síndrome de Híper IgM (SHIGM) es la denominación de un grupo de padecimientos por IDPs caracterizados por niveles séricos normales o elevados de la inmunoglobulina IgM, acompañada de niveles disminuidos de inmunoglobulinas IgG, IgA e IgE (24). Sus manifestaciones clínicas guardan similitudes con las de los pacientes con SCID, ya que se observan infecciones recurrentes del tracto respiratorio que pueden ser causadas por organismos oportunistas, además de signos característicos como neutropenia cíclica o crónica, neoplasias y trastornos autoinmunes(25).

El SHIGM es provocado por fallos en la vía de señalización CD40-CD40L, fundamental para el proceso de activación de los linfocitos B, implicada en su proliferación, cambio de isotipo e hipermutación somática. Dichos procesos son llevados a cabo por un mecanismo contacto-dependiente entre los linfocitos T y linfocitos B (24).

En la actualidad se tiene conocimiento de seis variantes de SHIGM que se diferencian en la molécula afectada implicada en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas(26).

Tabla 2.- Variantes del SHIGM y su genotipo asociado(26).

| Forma de SHIGM | Gen mutado   | Defecto causal | Patrón de herencia   | Manifestaciones clínicas                   |
|----------------|--------------|----------------|----------------------|--|
| SHIGM 1        | <i>CD40L</i> | CD40L/CD154    | Recesivo ligado al X | Infecciones bacterianas recurrentes        |
| SHIGM 2        | <i>AICDA</i> | AID            | Autosómico recesivo  | Infecciones bacterianas recurrentes        |
| SHIGM 3        | <i>CD40</i>  | CD40           | Autosómico recesivo  |  |
| SHIGM 4        | --           | --             | Autosómico recesivo  |  |
| SHIGM 5        | <i>UNG</i>   | UNG            | Autosómico recesivo  |  |
| SHIGM 6        | <i>IKKG</i>  | NEMO           | Ligado al x          | Infecciones bacterianas y de micobacterias |

La primera de las causas en ser caracterizada fue un defecto genético con patrón de herencia recesivo ligado al X; mutaciones en el gen *CD40L*, codificante para la proteína ligando de CD40 (también llamada CD154), la cual se expresa en linfocitos T y tiene un papel crucial en el proceso de cambio de isotipo para la producción de inmunoglobulinas en los linfocitos B. Posteriormente se halló evidencia de defectos genéticos asociados con SHIGM pero con un patrón de herencia autosómico recesivo(27).

Se conocen manifestaciones clínicas características del SHIGM ligado al X (XHIGM), tales como las infecciones recurrentes del tracto respiratorio, tanto superior como inferior, que se presentan en la infancia. Dichas infecciones pueden ser causadas por patógenos oportunistas como *Pneumocystis carinii*, con un porcentaje de afectación de entre el 20 y 40% de los pacientes, e infecciones por *Cryptosporidium parvum* en, aproximadamente, 30% de los casos. Dichas infecciones se acompañan de signos como diarrea crónica(28).

Los pacientes con XHIGM también son susceptibles a presentar enfermedad hepática, la cual se observa con mayor frecuencia con la edad; hepatitis crónica por virus de hepatitis B (VHB), virus de hepatitis C (VHC) o cirrosis por progresión de citomegalovirus (CMV).

Las causas de muerte más frecuentes en pacientes con esta IDP son, neumonía ocasionada por *P. carinii*, a edad temprana, enfermedad del hígado y tumores. Sólo el 30% de los pacientes llega a la edad de 25 años(25).

Al momento del diagnóstico, es común la observación de un elevado número de pacientes que presenten niveles séricos normales de IgM y un número normal de linfocitos B en circulación, con expresión de IgM y/o IgD en su membrana. El aumento en los niveles en suero de IgM es paulatino durante el seguimiento. Además de observarse un defectuoso cambio de isotipo, las inmunoglobulinas circulantes son de baja afinidad cuando se trata de respuesta a antígenos dependientes de linfocitos T, así como una falta de generación de linfocitos B de memoria (29).

### El gen *CD40L* y su producto proteico

Localizado en Xq26.3, *CD40L* es un gen que consta de 5 exones que codifica una proteína de 39 kDa; la proteína cuenta con 4 dominios: dominio intracitoplasmático, región transmembranal, dominio único extracelular y un dominio de homología TNF. La proteína *CD40L* tiene su expresión en la superficie de linfocitos T CD4+ activados en mayor proporción que en la superficie de linfocitos T CD8+; consta de 261 aminoácidos. Su dominio intracitoplasmático va de los aminoácidos 1 al 22; su región transmembranal, del 23 al 46 y el resto, compartidos entre los dos dominios restantes(30).

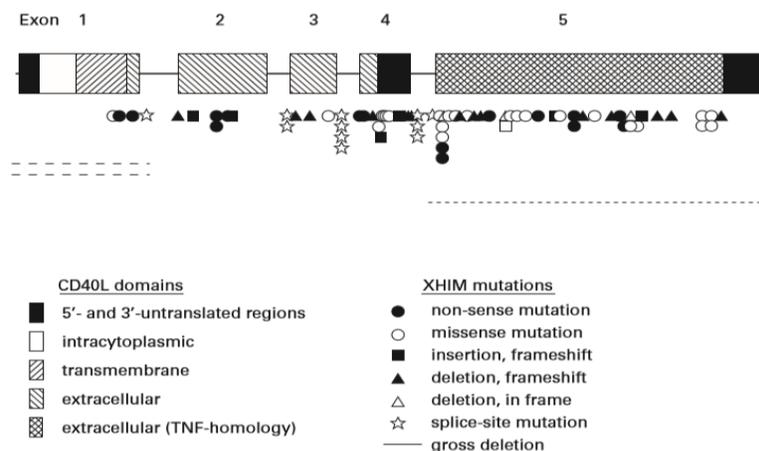


Figura 16.- Estructura del gen *CD40L* y sus regiones o dominios.

De manera similar a otros miembros de la familia TNF, la proteína *CD40L*, o *CD154*, se expresa como un homotrímero; mediante modelados moleculares, se ha elucidado que los

residuos del 189 al 209 están involucrados en la unión con el receptor CD40. La cola citoplasmática de CD40L cuenta con un sitio de fosforilación el cual participa en la transducción señales dentro del linfocito T. Dicha unión es de suma importancia para la proliferación de linfocitos B, el cambio de isotipo de la cadena pesada de inmunoglobulinas y la formación de centros germinales en folículo linfático (31, 32).

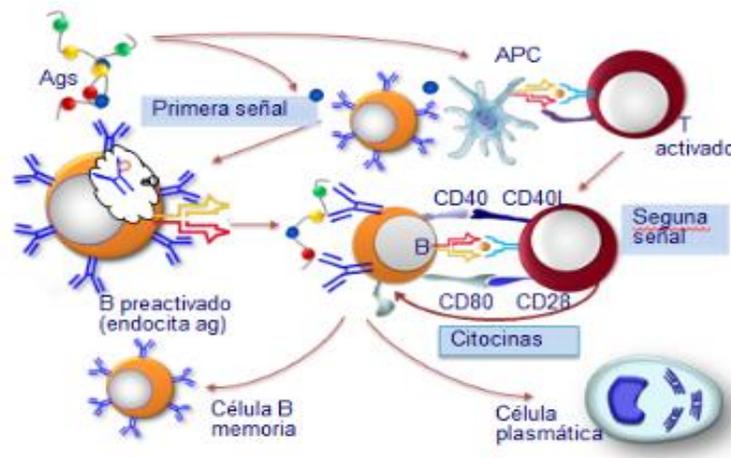


Figura 17.- Señales de activación antígeno-dependiente de los linfocitos B(31).

La interacción entre CD40 de linfocitos B y CD40L de linfocitos T es de gran importancia durante el proceso de activación de linfocitos B dependiente de linfocitos T. Aquí, dicha interacción constituye, junto con la interacción de CD80-CD86 con CD28 (de linfocitos B y T respectivamente), la segunda señal de activación, que potenciará el efecto brindado por la cascada de señalización consecuente del reconocimiento de antígenos mediado por el BCR(31).

### Hipermutación somática y cambio de isotipo

Originalmente, podemos hablar de dos distintos repertorios de anticuerpos producidos por los linfocitos B cuyo origen puede ser tanto dependiente como independiente de antígeno. Un primer repertorio de inmunoglobulinas altamente diversificadas, es el producido por los precursores de linfocitos B residentes de la médula ósea y tiene su origen en un proceso de recombinación genética mediado por la endonucleasa RAG. Se trata de un proceso de diversificación independiente de antígeno en el que la endonucleasa RAG yuxtapone los fragmentos V, D y J, formadores de las regiones V de las inmunoglobulinas. Una vez completado este primer proceso de recombinación, aquellas células B capaces de expresar

tanto IgM como IgD en su superficie, salen de la médula ósea hacia otros compartimientos linfoides (33).

Para continuar con el proceso de diversificación, los linfocitos B que han dejado la médula ósea, se someterán a los procesos de hipermutación somática y cambio de isotipo. Ambos procesos se llevan a cabo en centros germinales y son dependientes de la presentación de antígeno por parte de linfocitos T y señalizaciones conjuntas para la iniciación. Principalmente, son los linfocitos B-2 los que participan en esta respuesta T dependiente (TD). Las determinantes antigénicas involucradas generalmente son proteínas microbianas presentadas por linfocitos T foliculares. Además de la señalización dada por la propia interacción, los linfocitos T foliculares brindan una segunda señal por la vía CD40-CD40L y por las citocinas IL-21, IL-4 e IL-10 (33).

### **Déficit de Adhesión Leucocitaria**

Clasificada dentro del grupo de los defectos congénitos del número o función de los fagocitos, o ambos y en la subclasificación defectos funcionales de éstos, el Déficit de Adhesión Leucocitaria (LAD) es un extraño grupo de afecciones genéticas en las que el efecto fenotípico observable es una falla en los procesos de adhesión de los leucocitos al endotelio (34). Dichas deficiencias de unión pueden presentarse en una o varias fases de la cascada de adhesión (35). Los primeros signos aparecen durante la infancia, encontrándose leucocitosis graves e infecciones recurrentes. Actualmente, han sido descritos tres diferentes tipos de LAD con sus respectivas mutaciones; LAD-I, caracterizada por presentarse con infecciones bacterianas graves o recurrentes, en este defecto en particular se ve afectada la unión firme de los leucocitos al endotelio; LAD-II, cuyas manifestaciones clínicas son infecciones recurrentes, leucocitosis graves, déficit intelectual y retrasos en el crecimiento, el paso afectado en la cascada de adhesión es el rodamiento de los leucocitos sobre las paredes del endotelio; LAD-III, caracterizada por infecciones bacterianas graves o recurrentes y anomalías en el proceso de coagulación, donde se ve afectada la activación por integrinas  $\beta_{1, 2 \text{ y } 3}$  (36).

Tabla 3.- Variantes de LAD y su genotipo asociado(36).

| Tipo    | Defecto al que se atribuye | Fenotipo observado  | Manifestaciones clínicas  |
|---------|----------------------------|---|---|
| LAD-I   | <i>ITGB2</i>               | Defectos en la adhesión firme de leucocitos al endotelio.   | Infecciones bacterianas graves y recurrentes.   |
| LAD-II  | <i>SLC35C1</i>             | Defectos en el rodamiento de leucocitos sobre el endotelio. | Infecciones bacterianas recurrentes, retraso en el crecimiento grave y déficit intelectual grave. |
| LAD-III | <i>FERMT3</i>              | Defecto en la activación de todas las beta integrinas.      | Infecciones bacterianas graves y anomalías graves de la coagulación.                              |

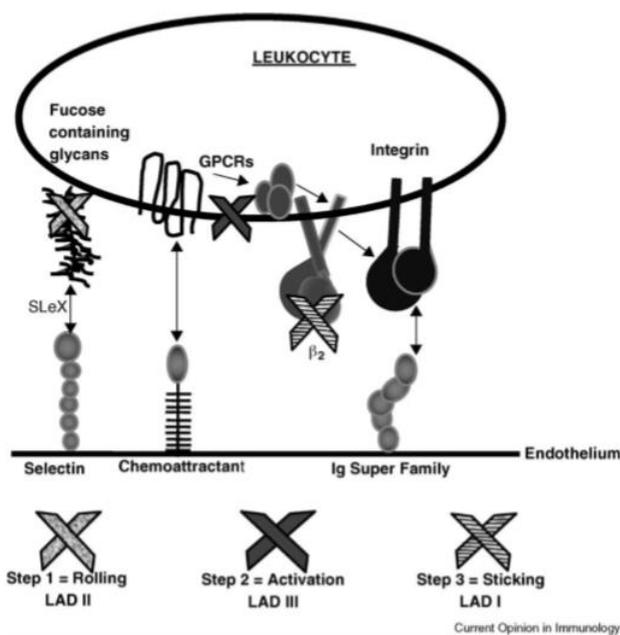


Figura 18.- Diagrama de las vías implicadas en cada una de las variantes de LAD(34).

El proceso de migración de leucocitos al sitio de infección debe estar extremadamente regulado para llevarse a cabo de manera eficiente y con la menor cantidad de daño al tejido a través del cual las células han de trasladarse desde el torrente sanguíneo, tanto a través de las uniones estrechas como también por endocitosis(34).

### Déficit de Adhesión Leucocitaria tipo I (LAD-I)

Un trastorno ocasionado por mutaciones en *ITGB2*, gen codificante para la cadena común β<sub>2</sub> de la integrina, también llamada CD18. Dicho gen se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 21, en la posición 21q22.3. Se han identificado una gran cantidad de

mutaciones dentro del gen responsable de esta variante de la condición, tales como deleciones, sustituciones, cambios en el marco de lectura y mutaciones de paro prematuro, así como también mutaciones intrónicas con consecuencias tales como variaciones en el tamaño o expresión de la proteína en los leucocitos (34).

Un alto porcentaje de las mutaciones descritas en CD18, tienen su impacto en el dominio extracelular de la proteína. Se encuentran dentro del exón 9 de *ITGB2*, región que se conoce por ser altamente conservada. Los dominios en los que se encuentra este segmento, son presuntamente responsables de la asociación y biosíntesis de precursores, además de ser sitios de unión entre los precursores de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (34).

Las manifestaciones clínicas observables son la alta recurrencia de infecciones bacterianas, una deficiencia en la capacidad de curación de heridas y sin formación de pus; la onfalitis y la separación retardada del cordón umbilical también son signos observables, aunque del último, existen reportes de separación normal del cordón en presencia de LAD-I (34).

De acuerdo con la severidad de los síntomas de LAD-I, se tienen dos subclasificaciones de ésta:

1. Forma severa de LAD-I: en ésta, el pronóstico del paciente mejora si se realiza un trasplante de células hematopoyéticas (HTC).
2. Forma moderada de LAD-I: se desconoce el papel de HTC en esta variante de LAD, sin embargo se sabe que el pronóstico mejora al grado de que los pacientes pueden sobrevivir hasta la edad adulta, sometiéndose a tratamientos con inmunoglobulinas durante episodios de infección.

El único método curativo conocido hasta el momento es HTC. Un rasgo característico de los pacientes que sobreviven, es la presencia recurrente de periodontitis (35).

Las integrinas  $\beta_2$  son conformadas por un heterodímero, compuesto por una cadena  $\alpha$ , también llamada CD11 (a, b, c o d), y la subunidad  $\beta_2$  común (CD18). Estos dos componentes se encuentran unidos no covalentemente. Su asociación es de vital importancia para la expresión y correcta función de los receptores (37). De presentarse una falla en la expresión de la  $\beta_2$  integrina, causada por mutaciones que afectan la unión con CD11 o la estructura externa de la proteína, se observan propiedades de adhesión anormales y se presentan las características clínicas de LAD-I (37). Se sabe que los linfoblastos de pacientes con LAD-I son capaces de sintetizar de manera normal al precursor de la subunidad  $\alpha$ , pero este nunca se expresa en la superficie celular. Hay incluso evidencia

de que dicha subunidad puede encontrarse degradada en el citoplasma en ausencia de la subunidad  $\beta$ (38).

### **Estructura y función normal del gen *ITGB2***

Localizado en el brazo largo del cromosoma 21, en la posición 22.3 (21q22.3), *ITGB2*, está compuesto de 17 exones de los cuales sólo 15 son codificantes. La longitud del transcrito es de 3 178 pb y de 769 residuos en la traducción.

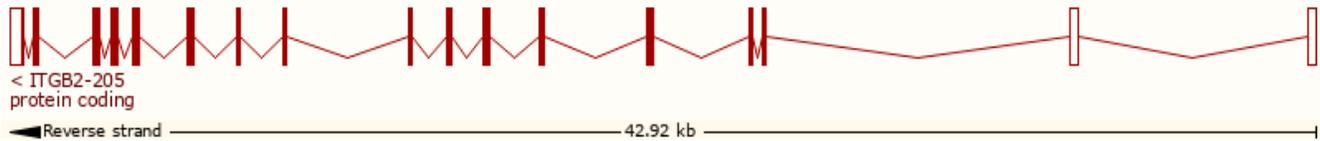


Figura 19.- Estructura del gen *ITGB2*.

Este gen codifica para la proteína denominada subunidad beta 2 de integrina, también conocida como CD18 o LFA-1. Para llevar a cabo su función, debe unirse con distintas cadenas alfa para formar a las integrinas heterodiméricas. Se comprende por integrina a un tipo de proteínas integrales de membrana celular con una participación fundamental en la adhesión celular de la respuesta inmunológica y en la señalización mediada por interacciones con proteínas de membrana. Los defectos en este gen provocan principalmente deficiencias en la adhesión leucocitaria(39).

### **Cascada de adhesión leucocitaria**

La cascada de adhesión leucocitaria es el proceso mediante el cual los leucocitos disminuyen su velocidad de tránsito a través del torrente sanguíneo, son atraídos por quimiocinas a sitios de infección ocasionados por daño a tejidos y migran a dichos sitios a través del endotelio. El proceso de extravasación de los leucocitos al sitio de inflamación está mediado por la acción de múltiples receptores de adhesión celular y de factores quimiotácticos. Es un proceso que implica cambios morfológicos tanto de los leucocitos, como de las células endoteliales que han de recibirlos (40). La correcta integración de señales en ambos sentidos entre leucocitos y el endotelio es de suma importancia para dar continuidad a este proceso. La extravasación de leucocitos es un fenómeno que no sólo tiene lugar durante la respuesta inflamatoria, sino también cuando los leucocitos deben recircular entre el resto del organismo a los órganos linfoides secundarios (40).

Para iniciar la respuesta inflamatoria sobre un tejido, los leucocitos deben ser capaces de adherirse al endotelio. Los primeros pasos de dicho proceso son: el contacto con el endotelio activado y el rodamiento de los leucocitos sobre el mismo. Continúan con la adhesión firme y la migración transendotelial (40).

Los contactos iniciales están mediados por la asociación de selectinas y sus ligandos. Se trata de interacciones con una levada frecuencia de asociación-disociación, propiedad que permite generar contactos que disminuyan la velocidad de los leucocitos así como su rodamiento sobre la superficie endotelial. Gracias a dichas asociaciones, también se verán favorecidas las interacciones mediadas por integrinas y sus ligandos, las cuales aumentan la adherencia de las células y, finalmente, las detienen (40, 41). A partir de aquí, el papel de las integrinas en el resto de la cascada de adhesión es fundamental, ya que estas son moléculas cuya principal función será el control de las interacciones intercelulares y de los leucocitos con la matriz extracelular (40).

Los leucocitos circulantes en el torrente sanguíneo mantienen una expresión en membrana de integrinas con una conformación inactiva; se encuentran de esta forma con el fin de evitar el contacto con paredes endoteliales no inflamadas. Una rápida activación de las integrinas se lleva a cabo cuando encuentran, en su recorrido, un foco inflamatorio (40, 42). Las integrinas tienen la capacidad de regular sus propiedades de adhesión mediante redistribuciones espaciales a lo largo de la membrana y cambios conformacionales, de este modo, tres distintos grados de adhesión están determinados a su vez por tres distintas conformaciones estructurales de dichos receptores: receptor plegado de baja afinidad, receptor extendido con afinidad intermedia y receptor extendido de alta afinidad (40, 42, 43).

Las integrinas miembros de la subfamilia  $\beta_2$ , y en particular LFA-1 (compuesta por CD11a/CD18), junto con otras subfamilias de integrinas como la integrina específica de linaje mielóide Mac-1 (CD11b/CD18), son de las más relevantes para la cascada de adhesión (29). Los receptores LFA-1 interaccionan con las moléculas de adhesión intercelular conocidas como ICAM (de la ICAM-1 a la ICAM-5). Tienen particular importancia las uniones con ICAM-1 e ICAM-3; la primera expresada en células epiteliales, células dendríticas y leucocitos, en los cuales se aumenta su expresión en presencia de estímulos proinflamatorios; ICAM-3 tiene una expresión constitutiva en todos los leucocitos (44).

Cuando los leucocitos han sido activados, se induce en ellos un marcado cambio morfológico que los convierte en células promigratorias, caracterizadas por la polarización que sufren.

Dentro de esta polarización, son distinguibles al menos dos regiones bien definidas: el frente de avance y el urópodo. La polarización tiene el propósito de coordinar a la célula en su locomoción para la extravasación (45).

Como ya se mencionó, las integrinas se encuentran en una conformación plegada para evitar contactos inespecíficos, pero una vez llevada a cabo la activación de leucocitos mediada por quimiocinas, el receptor cambia a una conformación extendida de afinidad intermedia, preparándose así para su unión al ligando en el endotelio. Posteriormente, dicha señalización conduce a la separación de regiones citoplasmáticas de las subunidades de integrina, con el propósito de asociarse ahora con el citoesqueleto cortical de actina. Específicamente, las integrinas  $\beta_2$  se asocian fundamentalmente a través de talina, filamina y otras moléculas estructurales (46).

Los contactos iniciales del leucocito al endotelio son debilitados tras la atenuación de las señales de adhesión firme mediadas por integrinas, lo anterior con el propósito de permitir la migración del leucocito hasta un sitio que sea adecuado para su extravasación, preferentemente entre las uniones estrechas de las células endoteliales (46). Se ha demostrado la importancia de las interacciones de las integrinas  $\beta_2$  y sus ligandos endoteliales para la colocación adecuada de los leucocitos en zonas de extravasación, ya que mediante el bloqueo de ligandos endoteliales de dichas integrinas, se observan migraciones aleatorias, fallos de posicionamiento y diapédesis defectuosa (46).

Cuando se realiza un posicionamiento correcto de los leucocitos en sitios de transmigración, el siguiente paso consta de la extensión de una prolongación de su membrana, llamado pseudópodo de exploración, a través de la unión estrecha entre dos células endoteliales. A lo largo de este proceso, LFA-1 se reorganiza a lo largo de la membrana, formando anillos que interaccionan con ICAM-1 en la interfaz de contacto entre leucocito y endotelio (46).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En México no se cuenta con un registro ni base de datos que hable de la incidencia de los trastornos por inmunodeficiencias primarias. Como ya se mencionó, las IDPs son alteraciones del desarrollo normal y funcionamiento del sistema inmunológico que pueden tener consecuencias fatales ya que se manifiestan a temprana edad. Si el diagnóstico es tardío, muchas de estas alteraciones causarán efectos irreversibles. El subdiagnóstico en México puede deberse a factores tales como el desconocimiento de los signos y síntomas

característicos de cada IDP, lo que retrasa su identificación, así como la poca accesibilidad a técnicas de diagnóstico que se tiene en los hospitales.

La Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias (UIID) del Instituto Nacional de Pediatría (INP) tiene como objetivo el desarrollo de técnicas cuya finalidad es apoyar al diagnóstico clínico mediante la fenotipificación de las muestras de pacientes y la realización de estudios funcionales y moleculares de los componentes del sistema inmune que se ven afectados por causa de IDPs.

### **3. HIPÓTESIS**

Los pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de Inmunodeficiencia Severa Combinada, Síndrome de Híper IgM (ambas con herencia ligada al cromosoma X) y Déficit de Adhesión Leucocitaria tipo 1 (con herencia autosómica recesiva) mostrarán mutaciones en los genes involucrados en el fenotipo de interés de cada IDP (*IL2RG*, *CD40L* e *ITGB2* respectivamente).

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Efectuar el análisis fenotípico y molecular de pacientes con diagnóstico de SCID, SHIGM y LAD-1.

### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar los porcentajes y números absolutos de las poblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo a partir de muestras de sangre periférica de pacientes clínicamente diagnosticados con SCID, SHIGM y LAD-1, así como de testigos sanos.
2. Determinar los porcentajes y números absolutos de las subpoblaciones de linfocitos T y B en pacientes con SCID, SHIGM y LAD-1.
3. Obtener DNA genómico de los pacientes.
4. Realizar la secuenciación Sanger de los genes *IL2RG* y *CD40L*.
5. Analizar los electroferogramas para determinar las mutaciones en los genes *IL2RG* y *CD40L*.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Tipo de investigación**

Estudio transversal, prospectivo, descriptivo de pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de SCID, SHIGM y LAD-1.

### **Criterios de inclusión**

- Para realizar el estudio se incluyeron a pacientes varones que contaban con diagnóstico clínico de las IDPs: SCID, SHIGM y LAD-1; de acuerdo con los criterios de diagnóstico de las mismas. Además, dichos pacientes cuentan también con estudios de secuenciación masiva que sugieren una posible localización de las mutaciones dentro de los genes involucrados. Los pacientes y sus muestras provienen de la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México.
- Se cuenta con la firma de consentimiento informado de los padres o tutores de los pacientes con respecto a la inclusión en el estudio.

### **Criterios de exclusión**

- Pacientes en los que se determine que la IDP presentada se deba a mutaciones en algún otro gen distinto a los genes que se analizan para los fines de este estudio, es decir, cuya condición de inmunodeficiencia corresponda a un subtipo de IDP distinto al planteado.

### **Criterios de eliminación**

- Pacientes de los que no se tenga posibilidad de obtención de muestra inicial o para dar continuidad a los ensayos

### **Obtención de muestras**

Se obtuvieron 12 mL de sangre periférica de pacientes y controles sanos con ayuda del sistema BD Vacutainer® en tubos con EDTA. De las muestras recolectadas, se destinó 1 mL para el análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo y 2 mL para la obtención de DNA genómico. El resto de las muestras fue destinado a estudios funcionales y subpoblaciones de células B.

## **Tinciones celulares para citometría de flujo**

A las muestras de células de cada paciente incluido en los grupos de estudio para cada inmunodeficiencia primaria se le realizaron las siguientes tinciones para ser posteriormente analizadas en el citómetro de flujo ARIAS 1.

## **Análisis Fenotípico por citometría de flujo**

- **Poblaciones leucocitarias y subpoblaciones de linfocitos**

Se obtuvieron muestras de sangre total de pacientes y testigos sanos para realizar la tipificación mediante citometría de flujo. Las tinciones de citometría constan de la mezcla de un volumen de 15 µL de sangre total y los siguientes anticuerpos marcados: anti-CD45 FITC/anti-CD14 PE (BD); anti-CD3 FITC/ anti-CD16+56 PE/anti-CD45 PerCP (BD); anti-CD3 FITC/anti-CD19 PE/anti-CD45 PerCP (BD); anti-CD4 FITC/anti-CD8 PE/anti-CD3 PerCP (BD); control de isotipo anti-CD45 PerCP/γ1 FITC/γ1 PE (BD) y antiCD45RA FITC/antiCD45RO /antiCD3 PerCP/antiCD4 APC (BD). Tras una mezcla de estos componentes, se incuban 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 500 µL de solución de lisis de eritrocitos FACS (BD), después de la cual la mezcla se incuba por 10 minutos más en las mismas condiciones en que la primera incubación. Se realiza un lavado con 2 mL de PBS 1x por duplicado. Por último, las células se fijan con 200 µL de una mezcla conformada por PBS y formaldehído al 1% para ser analizadas en el citómetro de flujo.

- **Purificación de células mononucleares en sangre periférica (PBMC)**

La purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se hará a partir de sangre total la cual se separará en un gradiente de densidad por centrifugación Histopaque-1077 (SigmaAldrich). Se recuperará las PBMC's, las cuales se someterán a lavados en medio RPMI para finalmente resuspenderlas en 1 ml de medio y realizar el conteo celular. El conteo celular se realizará cuantificando únicamente las células presentes en los cuatro cuadrantes de la cámara de "Neubauer". Para ello se hará una dilución 1:50 con la suspensión de células y azul tripano. El número total de células se obtendrá mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Número total de PBMC's} = (\text{Células contadas}) \times \text{Factor de Dilución} \times 10000$$

- **Análisis de expresión de subpoblaciones de células B en PMBC's:**

Los valores de las subpoblaciones de linfocitos B se determinaron por citometría de flujo.  $1 \times 10^6$  PBMC's se tiñeron con una mezcla de anticuerpos específicos para cada subpoblación (**Tabla** ): células B madura (CD19+, IgD-, CD27-), células B de memoria sin cambio de isotipo (CD19+, IgD+, CD27+), células B de memoria con cambio de isotipos (CD19+, IgD-, CD27+), células B transicionales (CD19 +, CD24 ++, CD38 ++) y plasmablastos (CD19 +, CD24 -, CD38 ++); posteriormente se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Las muestras se lavaron con PBS y fijaron con 200  $\mu$ l de solución fijadora.

Tabla 4.- Anticuerpos utilizados para cada subpoblación de células B.

| <b>Población celular</b>                | <b>Anticuerpos</b>                           |
|---|--|
| Linfocitos B                            | Anti-Cd19/APC, Anti-CD20/PerCP               |
| Transicionales                          | Anti-CD19/PerCP, Anti-CD24/PE, Anti-CD38/APC |
| Memoria con/sin cambio de isotipo/naive | Anti-CD19/APC, Anti-CD27/PE, Anti-IgD/FITC   |

- **Determinación de la expresión de CD40L**

Usando citometría de flujo, se determinó la expresión de CD40L en células T, la muestra de sangre total en heparina se activó con PMA y ionomicina, se incubó por 12 a 16 horas para luego hacer tinciones con CD40L FITC, CD3 PerCP y con el control de activación CD69 PE. Se incubó la muestra 30 minutos, se realizaron dos lavados y se fijaron.

- **Determinación de CD18, CD11b en monocitos y neutrófilos**

Se realizó una tinción con la siguiente mezcla en sangre total CD18 FITC, CD11b PerCP y CD14 APC, se incubaron por 30 minutos se lisaron los eritrocitos; se realizaron dos lavados y se fijaron con solución fijadora.

## Técnicas de biología molecular

- **Extracción de DNA genómico**

A una muestra de sangre del paciente o testigo, se le adicionó buffer de lisis de eritrocitos (apéndice) en una proporción 1:3, tras lo cual se incubó durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. Se centrifuga a 1500 rpm/5 minutos. Estos pasos se realizan una vez más o hasta que la lisis de eritrocitos sea evidente. Se resuspende el pellet en 2 mL de buffer de lisis de leucocitos (leukocyte lysis, Promega) hasta la homogeneidad. Se adiciona un volumen de 700 µL de solución precipitadora de proteínas (Protein precipitation solution, Promega) y se centrifuga a 3750 rpm/10 minutos. Se recupera el sobrenadante y se trasvasa midiendo el volumen para adicionar después el mismo volumen de isopropanol (2-propanol for molecular biology, SIGMA). Se mezcla el contenido del tubo por inmersión hasta que se observe la hebra de DNA y ésta ya no aumente de tamaño. Se centrifuga una vez más a 3750 rpm/10 minutos y se decanta el sobrenadante. Se realiza un lavado con 1 mL de etanol (Ethanol for molecular biology, Sigma-Aldrich) al 75% y se centrifuga 10 minutos más. El proceso de lavado se repite y se decanta por completo el sobrenadante. Se deja secar durante 24 horas y finalmente se rehidrata con 24 horas más con solución rehidratadora de DNA (DNA rehydration solution, Promega) y se cuantificó su concentración y pureza con ayuda del equipo Epoch (Bio Tek).

- **Amplificación de *IL2RG* por PCR**

Para la amplificación del gen *IL2RG* a partir de DNA genómico, se utilizaron Iniciadores de sentido y antisentido de cada uno de los exones que componen al gen. Las proporciones de la mezcla de reacción se observan en la tabla siguiente:

Tabla 5.- Reactivos utilizados en PCR de IL2RG. Para un volumen final de 25  $\mu$ L.

| Reactivo                         | Volumen      |
|----------------------------------|--------------|
| Buffer 10x                       | 2.5 $\mu$ L  |
| MgCl <sub>2</sub>                | 0.75 $\mu$ L |
| dNTPs                            | 05. $\mu$ L  |
| Iniciador sentido 25 $\mu$ M     | 0.5 $\mu$ L  |
| Iniciador antisentido 25 $\mu$ M | 0.5 $\mu$ L  |
| Taq DNA Polimerasa               | 0.1 $\mu$ L  |
| DNA genómico                     | 2 $\mu$ L    |
| Agua estéril                     | 17.4 $\mu$ L |

Tabla 6.- Iniciadores de los exones usados en la amplificación de IL2RG

| DNA genómico | Iniciador de sentido (5' – 3') | Iniciador de antisentido (5' – 3') | Fragmento (pb) |
|--------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------|
| E1 – IL2RG   | TTAGCCCGTGTACACAGCAC           | TAGGCAACATAGTGAGACCCTG             | 512            |
| E2 – IL2RG   | TGGTCTCAAACCTCTGGCCTC          | ATATCCAGAGCCTACCCTCATC             | 452            |
| E3 – IL2RG   | TAGCAAGTCTCCCAGGTACCC          | AGTCAGGATCCTGAAGGTAGTG             | 490            |
| E4 – IL2RG   | TTGGAGTCTACAGAGTAGTGTTT        | AAAGGAGTTGGAGGAGGGAGG              | 455            |
| E5 – IL2RG   | TGAGAGAGAAACTGGGCAGTAG         | CAACCCTACACAGAAAAACCTTG            | 445            |
| E6 – IL2RG   | ACATACTACCTCTTTGGCCTTG         | AAACCCTCTTGGGTAATCTCTC             | 434            |
| E7 – IL2RG   | CATCCCTAAACTCTTGGATTCTG        | TATCACCTTCTCCCAGTTGTC              | 538            |
| E8 – IL2RG   | AAGCAGATGGCAACTGGTATTG         | GCACAAAATTCCAAATCAGCCAC            | 471            |

La siguiente figura muestra las condiciones introducidas en el termociclador para llevar a cabo la reacción de PCR:

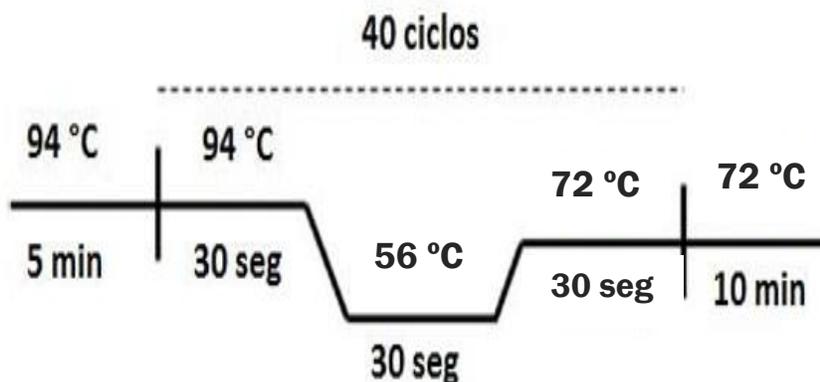


Figura 11.- Condiciones de PCR para IL2RG

- **Amplificación de CD40L por PCR**

Para la amplificación del gen CD40L a partir de DNA genómico, se utilizaron Iniciadores de sentido y antisentido de cada uno de los exones que componen al gen. Las proporciones de la mezcla de reacción se observan en la tabla siguiente:

Tabla 7.- Reactivos utilizados en PCR de CD40L. Para volumen final de 25 µL.

| Reactivo                    | Volumen  |
|-----------------------------|----------|
| Buffer 10x                  | 2.5 µL   |
| MgCl <sub>2</sub>           | 0.75 µL  |
| dNTPs                       | 1 µL     |
| Iniciador sentido 25 µM     | 1 µL     |
| Iniciador antisentido 25 µM | 1 µL     |
| Taq DNA Polimerasa          | 0.4 µL   |
| DNA genómico                | 2 µL     |
| Agua estéril                | 16.35 µL |

Tabla 8.- Iniciadores de los exones usados en la amplificación de CD40L.

| DNA genómico | Iniciador de sentido (5' – 3') | Iniciador de antisentido (5' – 3') | Fragmento (pb) |
|--------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------|
| E1 – CD40L   | CTCATGCTGCCTCTGCCAC            | CCTATGAATTAGTAAGGACCC              | 285            |
| E2 – CD40L   | CATTAGCTGTATTCTCCTTCC          | GACACTTTTACCAGTAATTAAGC            | 221            |
| E3 – CD40L   | CAACAGAGTAATGACAGATGC          | TTCATAGAAATTAGCAAATAGCAA           | 183            |
| E4 – CD40L   | TGTAGAACTGGACCAGATAG           | GGTAACATGACTTCGGCATC               | 205            |
| E5 – CD40L   | CTCTGCTTCACCTCACCAC            | TTATGAAGACTCCCAGCGTC               | 478            |

La siguiente figura muestra las condiciones introducidas en el termociclador para llevar a cabo la reacción de PCR:

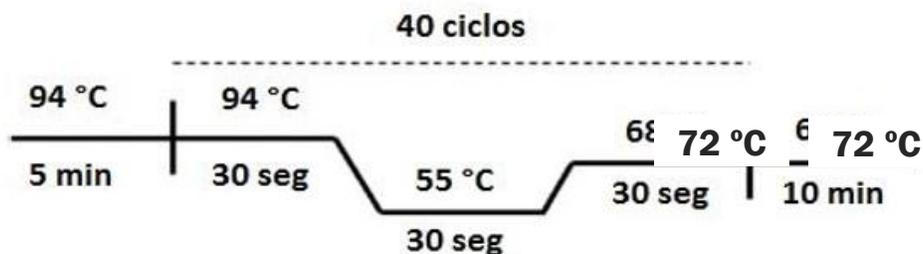


Figura 12.- Condiciones de PCR para CD40L.

### Electroforesis de productos de PCR en gel de agarosa

Para realizar la determinación de la longitud de los amplificadores de reacciones de PCR, se utilizaron 5 µL de cada muestra para correrse en un gel de agarosa al 1% (IL2RG) o al 2% (CD40L), preparado con TAE 1x (apéndice). Las condiciones de la electroforesis fueron 100V durante 30 minutos en una cámara. Transcurrido ese tiempo, los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio con una concentración de 0.5 µg/mL (SIGMA) y se visualizaron con ayuda de un transluminador de luz ultravioleta (Molecular Image Chemi Doc™ XRST, BIO RAD). Para determinar el tamaño del amplificado, se usó un marcador de peso molecular para DNA (Mass Rule DNA Ladder, Thermo Scientific).

### Purificado de productos de PCR mediante digestión enzimática

Una vez corroborada la amplificación mediante la electroforesis, los productos de PCR se purifican mediante digestión enzimática, cuyos componentes se enlistan en la tabla siguiente:

Tabla 9.- Reactivos utilizados en la digestión enzimática de productos de PCR. Para volumen de 20 µL de producto.

| Reactivo | Volumen |
|----------|---------|
| TSAP     | 0.1 µL  |
| Exo I    | 0.5 µL  |
| Buffer   | 0.9 µL  |

La siguiente figura muestra las condiciones introducidas en el termociclador para la incubación de la digestión enzimática:

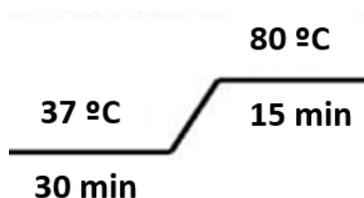


Figura 13.- Condiciones para incubación de digestión enzimática.

## Reacción de secuenciación

Como parte del proceso de secuenciación de Sanger, se realiza una mezcla de reacción con los componentes contenidos en la Tabla 10. Se hace una mezcla de reacción para cada sentido del iniciador, es decir, dos mezclas de reacción por cada uno de los exones:

Tabla 10.- Reactivos empleados en la reacción de secuenciación.

| Reactivo                      | Volumen           |
|-------------------------------|-------------------|
| Buffer 10x                    | 2 $\mu$ L         |
| Big Dye                       | 1 $\mu$ L         |
| Iniciador sentido/antisentido | 0.4 $\mu$ L       |
| DMSO                          | 0.5 $\mu$ L       |
| DNA genómico                  | 0.5 – 2 $\mu$ L * |
| Agua estéril                  | Cbp 10 $\mu$ L    |

\*depende de la concentración del amplificado

## Purificación del producto de secuenciación

Al terminarse la etapa de secuenciación se agrega, a cada uno de los productos, un volumen de 37  $\mu$ L de perlas de vidrio Xterminator. Posteriormente se llevan a agitación durante 30 minutos (vórtex) a velocidad media de agitación. Se centrifugan después a 1000 xg/1 minuto y se recupera el sobrenadante en un tubo nuevo. Finalmente, estas muestras se llevan a secuenciación.

## Secuenciación y análisis

La secuenciación de las muestras se realizó en el Posgrado en Ciencias Genómicas del Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), en un secuenciador capilar ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) de 4 capilares teniendo como muestra los purificados de la reacción de secuenciación. Los resultados de las secuencias se analizaron empleando el programa 4 Peaks y las secuencias obtenidas se compararon con las reportadas en la página de BLAST del NCBI, mediante la herramienta Nucleotide BLAST.

## 7. RESULTADOS

### Características clínicas, de fenotipo y genotipo de los pacientes con Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID)

La población de estudio consta de un total de 9 pacientes con diagnóstico clínico de SCID ligado al X. Las edades de los pacientes oscilan entre los 1 y 8 meses de edad.

Tabla 11.- Valores de inmunoglobulinas séricas y características clínicas de los pacientes.

| PACIENTE | EDAD (MESES) | GÉNERO | IgG (mg/dL) | IgM (mg/dL) | IgA (mg/dL) | NEUMONÍA | GASTROENTERITIS | SEPSIS | BCG | CANDIDIASIS | BRONQUITIS | CMV | EBV |
|----------|--------------|--------|-------------|-------------|-------------|----------|-----------------|--------|-----|-------------|------------|-----|-----|
| 1        | 5            | M      | 156         | 8           | 1           | -        | +               | -      | -   | +           | -          | -   | -   |
| 2        | 8            | M      | 148         | 29          | 19          | +        | -               | +      | -   | -           | -          | +   | +   |
| 3        | 4            | M      | 240         | 41          | 78          | -        | +               | -      | -   | -           | -          | -   | -   |
| 4        | 5            | M      | 69          | 54          | 7           | +        | -               | -      | -   | -           | -          | -   | -   |
| 5        | 6            | M      | 130         | 8           | 9           | +        | +               | -      | -   | -           | -          | -   | -   |
| 6        | 3            | M      | 60          | 10          | 6           | +        | -               | +      | -   | -           | -          | -   | -   |
| 7        | 2            | M      | 75          | 30          | 7           | -        | -               | -      | +   | -           | +          | -   | -   |
| 8        | 3            | M      | 270         | 52          | 25          | +        | -               | +      | -   | -           | -          | -   | -   |
| 9        | 1            | M      | 72          | 18          | 6           | +        | -               | +      | -   | -           | -          | -   | -   |

Los síntomas observados con mayor frecuencia dentro de la valoración clínica de los pacientes, fueron: neumonía (67%), gastroenteritis (33%) y sepsis (33%) como se muestra en la tabla. La edad promedio de los pacientes es de 4 meses; los valores basales promedio de inmunoglobulinas séricas fueron de 135.55 mg/dL para la IgG, 27.77 mg/dL para IgM y 17.55 mg/dL para IgA.

Tabla 12.- Resumen de características clínicas de los nueve pacientes.

| <b>Características de los pacientes (n=9)</b> |            |
|---|------------|
| Promedio de edad (meses)                      | 4          |
| Neumonía                                      | 6 (66.66%) |
| Gastroenteritis                               | 3 (33.33%) |
| Sepsis  | 4 (44.44%) |
| BCG   | 1 (11.11%) |
| Candidiasis                                   | 1 (11.11%) |
| Bronquitis                                    | 1 (11.11%) |
| CMV   | 1 (11.11%) |
| EBV   | 1 (11.11%) |
| Promedio de IgM basal (mg/dL)                 | 27.77      |
| Promedio de IgA basal (mg/dL)                 | 17.55      |
| Promedio de IgG basal (mg/dL)                 | 135.55     |

Tabla 13.- Valores normales de inmunoglobulinas séricas en pacientes pediátricos (46).

| Edad      | IgM (mg/dL) | IgA (mg/dL) | IgG (mg/dL) |
|-----------|-------------|-------------|-------------|
| 7-9 meses | 32-119      | 10.8-89     | 208-867     |
| 1 año     | 40-161      | 13-104      | 331-1164    |
| 2 años    | 45-159      | 13-121      | 402-1008    |
| 4-5 años  | 40-186      | 24-152      | 444-1186    |

### Poblaciones leucocitarias

Se determinó la proporción de las poblaciones de leucocitos a partir de muestras de sangre periférica para los nueve pacientes mediante una doble tinción para citometría de flujo, que constó de anti-CD45 FITC y anti-CD14 PE.

En la Figura 14, observamos la selección de las proporciones celulares de las que se considerarán los porcentajes y valores absolutos de las poblaciones leucocitarias:

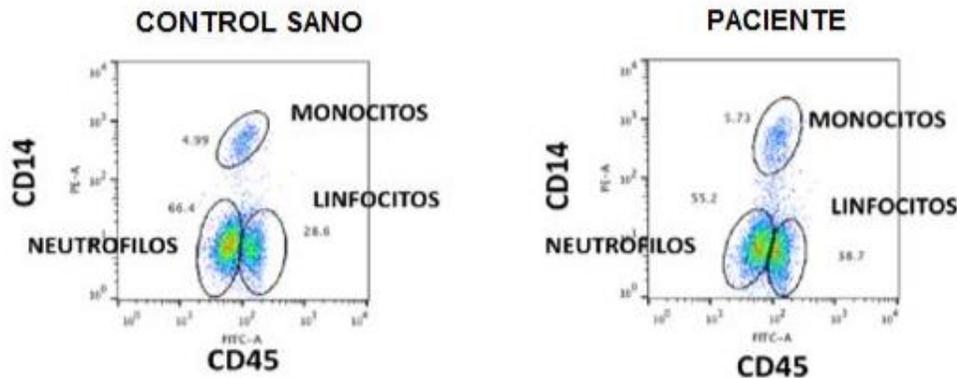


Figura 14.- Selección de poblaciones leucocitarias en sangre periférica en controles sanos y pacientes. Obtenidos a partir de las mezclas de anticuerpos anti-CD45 FITC y anti-CD14 PE.

Se realiza un conteo de la cantidad de leucocitos por  $\text{mm}^3$  en sangre, utilizando la cámara de Neubauer, con la finalidad de calcular el número absoluto de cada una de las poblaciones leucocitarias de interés. Para efectuar el cálculo, se empleó la siguiente fórmula:

$$= \frac{\text{No. de linfocitos, monocitos o polimorfonucleares}}{(\text{Número de leucocitos mm}^3) + (\text{Porcentaje de linfocitos, monocitos o polimorfonucleares})}$$

En las Tablas 14 y 15, se muestran los valores porcentuales y absolutos de las poblaciones leucocitarias en los pacientes de estudio; la Tabla 15 muestra los valores normales:

Tabla 14.- Valores porcentuales y absolutos de poblaciones leucocitarias en testigos.

| Testigo | Leucocitos<br>totales<br>(mm <sup>3</sup> ) | Neutrófilos<br>(%) | Neutrófilos<br>(mm <sup>3</sup> ) | Linfocitos<br>totales<br>(%) | Linfocitos<br>totales<br>(mm <sup>3</sup> ) | Monocitos<br>(%) | Monocitos<br>(mm <sup>3</sup> ) |
|---------|---|--------------------|-----------------------------------|------------------------------|---|------------------|---------------------------------|
| 1       | 12200                                       | 44                 | 5368                              | 43                           | 5246  | 10               | 1220                            |
| 2       | 12000                                       | 59                 | 7080                              | 34                           | 4080  | 6                | 720                             |
| 3       | 8600  | 55                 | 4730                              | 21                           | 1860  | 6                | 516                             |
| 4       | 10700                                       | 13                 | 1391                              | 75                           | 8025  | 9                | 963                             |
| 5       | 6200  | 42                 | 2604                              | 48                           | 2976  | 7                | 434                             |
| 6       | 7800  | 50                 | 3900                              | 38                           | 2964  | 9                | 702                             |
| 7       | 6100  | 44                 | 2684                              | 50                           | 3050  | 6                | 366                             |
| 8       | 5900  | 43                 | 2537                              | 47                           | 2773  | 8                | 472                             |
| 9       | 10100                                       | 53                 | 5353                              | 35                           | 3535  | 10               | 1010                            |

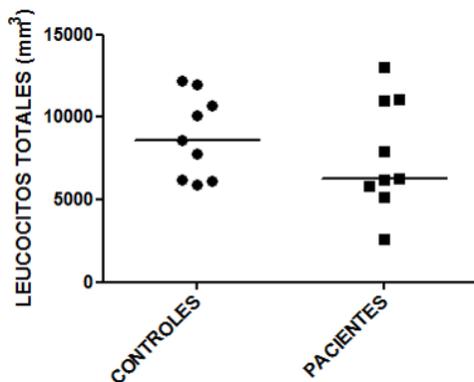
Tabla 15.- Valores porcentuales y absolutos de poblaciones leucocitarias en pacientes.

| Paciente | Leucocitos<br>totales<br>(mm <sup>3</sup> ) | Neutrófilos<br>(%) | Neutrófilos<br>(mm <sup>3</sup> ) | Linfocitos<br>Totales<br>(%) | Linfocitos<br>Totales<br>(mm <sup>3</sup> ) | Monocitos<br>(%) | Monocitos<br>(mm <sup>3</sup> ) |
|----------|---|--------------------|-----------------------------------|------------------------------|---|------------------|---------------------------------|
| 1        | 6200  | 85                 | 5270                              | 0.6                          | 37  | 10               | 301                             |
| 2        | 11075                                       | 71                 | 8289                              | 11                           | 1284  | 8                | 934                             |
| 3        | 7900  | 74                 | 5845                              | 5                            | 395   | 7                | 553                             |
| 4        | 11000                                       | 18                 | 1994                              | 50                           | 5538  | 30               | 3323                            |
| 5        | 2600  | 29                 | 754                               | 28                           | 728   | 18               | 468                             |
| 6        | 13000                                       | 88                 | 11440                             | 2                            | 260   | 6                | 780                             |
| 7        | 5800  | 79                 | 4582                              | 9                            | 522   | 6                | 348                             |
| 8        | 6300  | 56                 | 3528                              | 11                           | 693   | 21               | 1764                            |
| 9        | 5150  | 62                 | 3193                              | 17                           | 876   | 10               | 515                             |

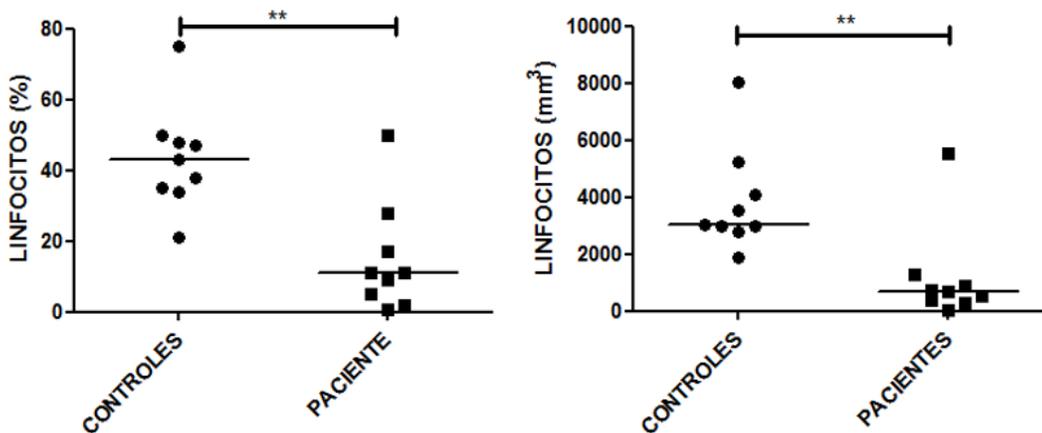
Tabla 16.- Valores normales de poblaciones leucocitarias (47).

| Edad     | Neutrófilos<br>(%) | Neutrófilos<br>(mm <sup>3</sup> ) | Linfocitos<br>Totales (%) | Linfocitos<br>Totales<br>(mm <sup>3</sup> ) | Monocitos<br>(%) | Monocitos<br>(mm <sup>3</sup> ) |
|----------|--------------------|-----------------------------------|---------------------------|---|------------------|---------------------------------|
| 0-1 años | 12.20-53.47        | 1004-5820                         | 28.20-78.66               | 2580-7860                                   | 0.21-12.30       | 20-1320                         |
| 2-5 años | 20-65.70           | 1150-5870                         | 23.89-70.36               | 1650-6390                                   | 1.74-11.0        | 90-860                          |

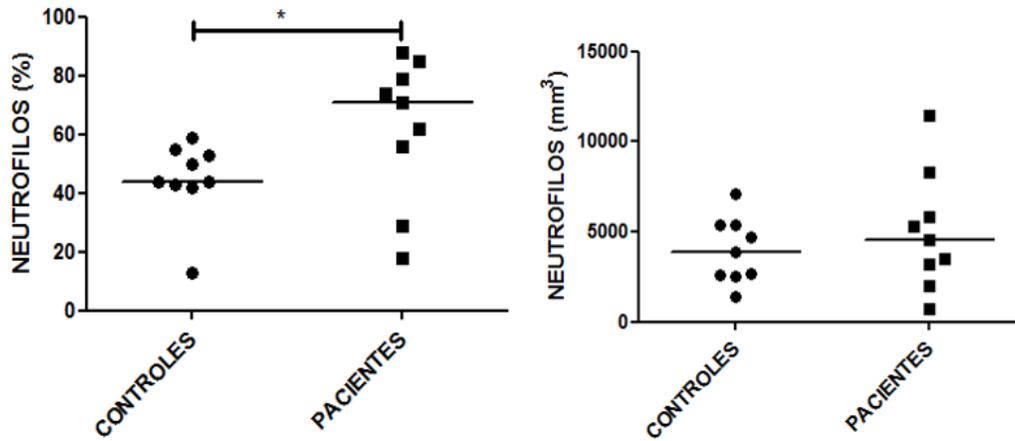
En las figuras que se presentarán a continuación, se muestran los análisis realizados a los resultados de poblaciones leucocitarias de testigos sanos y pacientes:



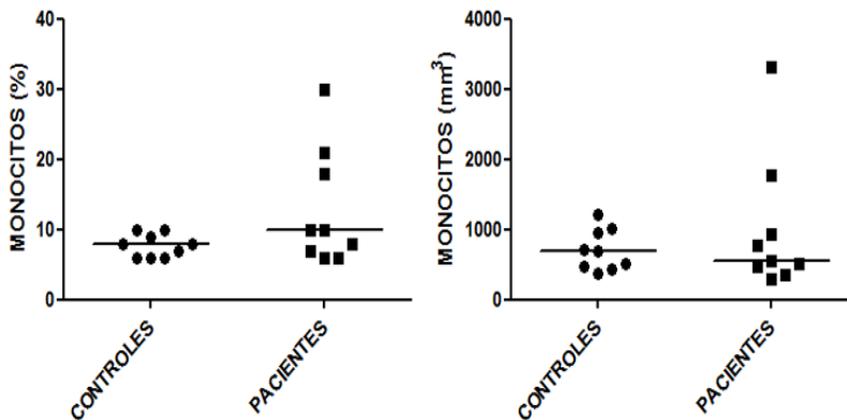
**Figura 15.- Análisis estadístico de leucocitos totales en controles y pacientes.** Análisis, en valores absolutos, de los leucocitos totales en controles sanos y pacientes mediante la prueba de U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente.



**Figura 16.- Análisis estadístico de leucocitos totales en controles sanos y pacientes.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos totales en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 17.- Análisis estadístico de neutrófilos totales en controles sanos y pacientes.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de neutrófilos en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



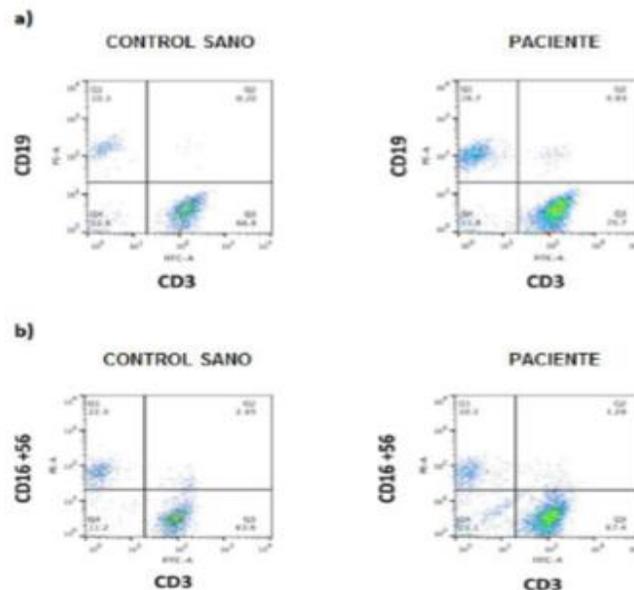
**Figura 18.- Análisis estadístico de monocitos en controles sanos y pacientes.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de monocitos en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .

A partir de las figuras anteriores, se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa para las poblaciones de leucocitos totales y monocitos, sin embargo, existe una diferencia muy significativa para los linfocitos (a nivel porcentual y absoluto) con  $p=0.0054$  y  $p=0.0028$ , respectivamente; y una diferencia significativa para los neutrófilos con  $p=0.0422$ .

### **Poblaciones de células T, B y NK**

Para la determinación de las subpoblaciones leucocitarias, se realizaron tinciones triples que constaban de los anticuerpos anti-CD3 FITC/anti-CD19 PE/anti-CD45 PerCP, para los linfocitos T y B, mientras que para las células NK se utilizaron los anticuerpos anti-CD3 FITC/anti-CD16+56 PE/anti-CD45 PerCP.

A partir de la tinción general efectuada sobre muestras de los pacientes, se seleccionó el grupo celular CD45+, para luego dividirlo e identificar a las poblaciones celulares de linfocitos T (CD3+); B (CD19+) y NK (CD16+56+).



**Figura 19.- Porcentaje de las poblaciones de células T, B y NK en controles sanos y pacientes.** En la figura a) se muestran las poblaciones de células T (CD3+) y B (CD19+), y en la figura b) Las células NK (CD16+56+). Ambas en controles sanos y pacientes.

En las Tablas 17 y 18, se muestran los porcentajes y valores absolutos obtenidos a partir del análisis de citometría de flujo para la detección y cuantificación de linfocitos T y B a partir de la población de linfocitos CD45+. La Tabla 19 contiene los valores normales para dichos porcentajes y valores absolutos:

Tabla 17.-Porcentajes y valores absolutos de linfocitos T y B en controles sanos.

| Testigo | Células T CD3+ (%) | Células T C3+ (mm <sup>3</sup> ) | Células B CD19+ (%) | Células B CD19+ (mm <sup>3</sup> ) |
|---------|--------------------|----------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| 1       | 59.1               | 2272.6                           | 23.9                | 1115.2                             |
| 2       | 69                 | 1477                             | 6.1                 | 131                                |
| 3       | 55                 | 1137                             | 8                   | 165                                |
| 4       | 68.2               | 3210                             | 15.4                | 724.9                              |
| 5       | 75.3               | 1975                             | 11.2                | 294                                |
| 6       | 65.5               | 1394.4                           | 0                   | 0                                  |
| 7       | 76.9               | 1815.3                           | 5.2                 | 123                                |
| 8       | 66                 | 979                              | 15.3                | 227                                |
| 9       | 77.4               | 2867                             | 10.9                | 403.7                              |

Tabla 18.- Porcentajes y valores absolutos de linfocitos T y B en los pacientes.

| No. de paciente | Células T CD3+ (%) | Células T CD3+ (mm <sup>3</sup> ) | Células B CD19+ (%) | Células B CD19+ (mm <sup>3</sup> ) |
|-----------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| 1               | nsd*               | nsd                               | 39                  | 14                                 |
| 2               | 7                  | 90                                | 82                  | 1053                               |
| 3               | 35                 | 138                               | 54                  | 213                                |
| 4               | nsd                | nsd                               | 96                  | 5317                               |
| 5               | nsd                | nsd                               | 96                  | 699                                |
| 6               | 1                  | 3                                 | 82                  | 213                                |
| 7               | 60                 | 131                               | 15                  | 78                                 |
| 8               | nsd                | nsd                               | 78                  | 540                                |
| 9               | 1                  | 9                                 | 82                  | 753                                |

\*nsd: no se detectó

Tabla 19.- Valores normales de porcentajes y valores absolutos de linfocitos T y B (48).

| Edad       | Células T CD3+ (%) | Células T CD3+ (mm <sup>3</sup> ) | Células B CD19+ (%) | Células B CD19+ (mm <sup>3</sup> ) |
|------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| 6-12 meses | 49-76              | 1900-5900                         | 14-37               | 610-2600                           |
| 1-2 años   | 53-75              | 2100-6200                         | 16-35               | 720-2600                           |
| 2-6 años   | 56-75              | 1400-3700                         | 14-33               | 390-1400                           |

Las Tabla 20 y 21 contienen los porcentajes y valores absolutos para la población de células NK, seleccionadas también a partir de las células CD45+ y posteriormente, seleccionando las positivas al marcador CD16+56+. La Tabla 22 contiene los valores normales para porcentajes y valores absolutos de la misma población:

Tabla 20.- Valores porcentuales y absolutos de la población de células NK en controles sanos.

| <b>Testigo</b> | <b>Células NK CD16+56+ (%)</b> | <b>Células NK CD16+56+ (mm<sup>3</sup>)</b> |
|----------------|--------------------------------|---|
| 1              | 16                             | 615.3                                       |
| 2              | 30.2                           | 647   |
| 3              | 0                              | 0   |
| 4              | 12.5                           | 588.4                                       |
| 5              | 15.4                           | 404   |
| 6              | 22.2                           | 472.6                                       |
| 7              | 31.7                           | 748   |
| 8              | 20                             | 297   |
| 9              | 13.4                           | 496   |

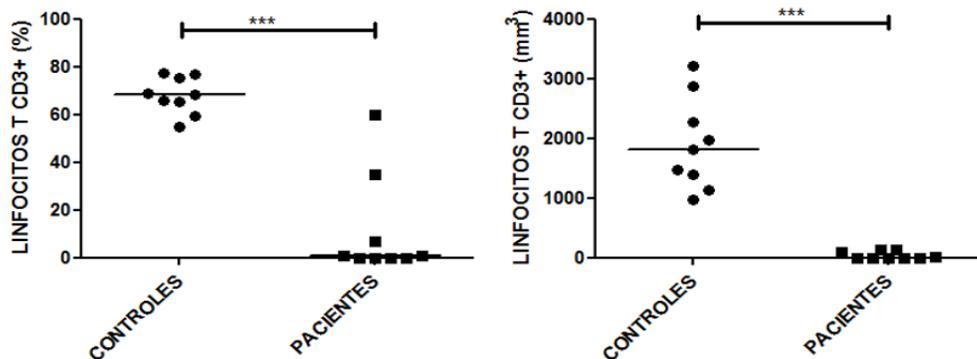
Tabla 21.- Valores porcentuales y absolutos de la población de células NK en pacientes.

| <b>Paciente</b> | <b>Células NK CD16+56+ (%)</b> | <b>Células NK CD16+56+ ( mm<sup>3</sup>)</b> |
|-----------------|--------------------------------|--|
| 1               | 18                             | 7  |
| 2               | 9                              | 116  |
| 3               | 11                             | 43   |
| 4               | 0.3                            | 17   |
| 5               | 2                              | 15   |
| 6               | 2                              | 5  |
| 7               | 25                             | 131  |
| 8               | 1                              | 7  |
| 9               | 1                              | 9  |

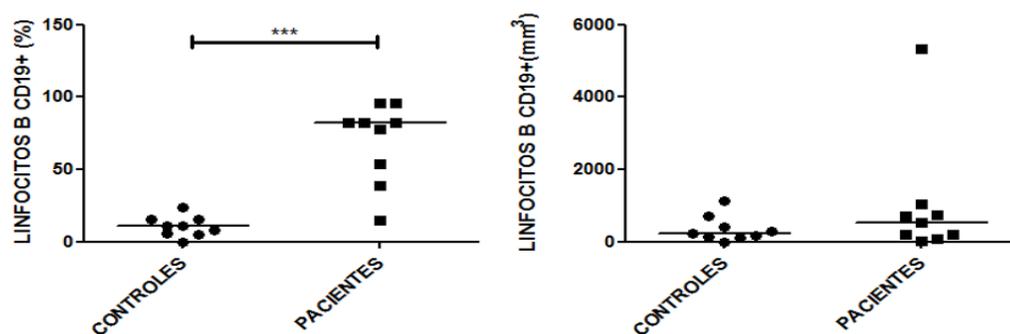
Tabla 22.- Valores normales en porcentajes y valores absolutos de células NK CD16+56+ (49).

| <b>Edad</b> | <b>Células NK CD16+56+ (%)</b> | <b>Células NK CD16+56+ ( mm<sup>3</sup>)</b> |
|-------------|--------------------------------|--|
| 6-12 meses  | 3-15                           | 160-950                                      |
| 1-2 años    | 3-15                           | 180-920                                      |
| 2-6 años    | 4-17                           | 130-720                                      |

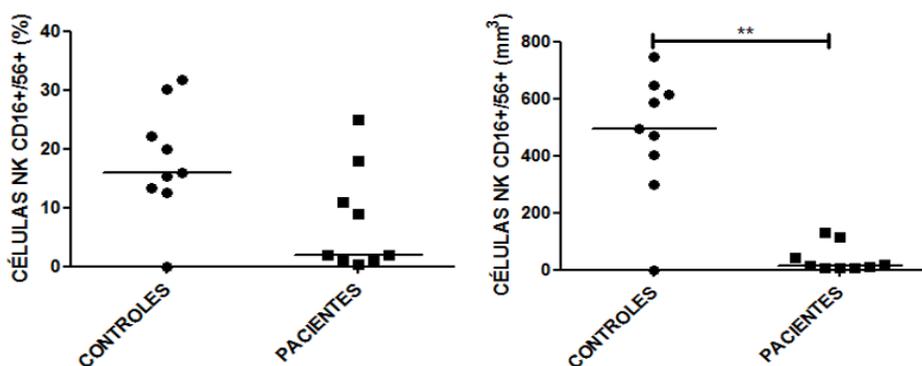
En las figuras 20, 21 y 22 se muestran los análisis para las poblaciones de linfocitos T, B y células NK:



**Figura 20. Análisis estadístico de los linfocitos T CD3+ en controles sanos y pacientes.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 21- Análisis estadístico de los linfocitos B CD19+ en controles sanos y pacientes.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos B CD19+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 22.- Análisis estadístico de las células NK CD16+CD56+ en controles sanos y pacientes.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de células NK CD16+CD56+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .

A partir de las figuras 20, 21 y 22, se observa que sí existe diferencia altamente significativa (porcentual y absoluta) en la población de linfocitos T CD3+ con  $p= 0.0002$  y  $p<0.0001$ , respectivamente; diferencia altamente significativa (nivel porcentual) para linfocitos B CD19+, con  $p=0.0003$ ; y una diferencia muy significativa (nivel absoluto) de las células NK, con  $p= 0.0040$ .

### Subpoblaciones de linfocitos T

Para la detección y cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos T, se llevó a cabo una tinción triple que constó de los siguientes anticuerpos: anti-CD4 FITC/anti-CD8 PE/anti-CD3 PerCP; esta para los linfocitos T CD4+ y CD8+. A partir de la población CD3+, se seleccionan las poblaciones CD4+ o CD8+ y se determinan sus proporciones.

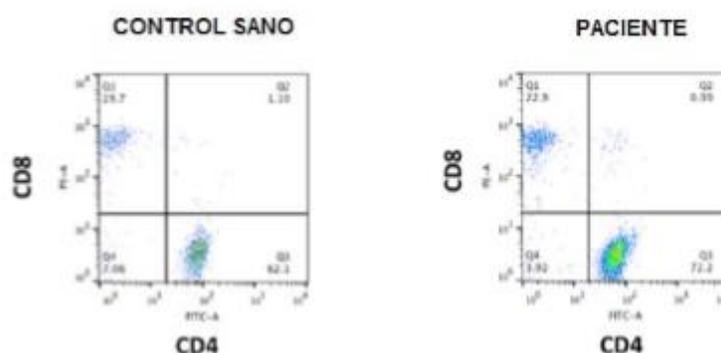


Figura 23.- Porcentaje de las poblaciones de células T CD4+ y CD8+ en controles sanos y pacientes.

Las Tablas 23 y 24, muestran los valores porcentuales y absolutos de los linfocitos T CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+; la Tabla 24, muestra los valores normales para dichas subpoblaciones:

Tabla 23.- Valores porcentuales y absolutos de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en controles sanos.

| Testigo | Células T CD4+ (%) | Células T CD4+ (mm <sup>3</sup> ) | Células T CD8+ (%) | Células T CD8+ (mm <sup>3</sup> ) |
|---------|--------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| 1       | 45.2               | 1027.2                            | 40.5               | 920.4                             |
| 2       | 55                 | 812                               | 27.8               | 411                               |
| 3       | 62.2               | 707                               | 29.2               | 332                               |
| 4       | 72.5               | 2327                              | 21.7               | 696.5                             |
| 5       | 55.5               | 1096                              | 36.1               | 713                               |
| 6       | 45.5               | 634.7                             | 46.8               | 652.6                             |
| 7       | 50.1               | 909                               | 34.6               | 628                               |
| 8       | 62                 | 606                               | 20                 | 196                               |
| 9       | 55.3               | 1585                              | 34.4               | 986                               |

Tabla 24.- Valores porcentuales y valores absolutos de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes.

| Paciente | Linfocitos T CD4+ (%) | Linfocitos T CD4+ (mm <sup>3</sup> ) | Linfocitos T CD8+ (%) | Linfocitos T CD8+ (mm <sup>3</sup> ) |
|----------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| 1        | nsd                   | nsd                                  | nsd                   | nsd                                  |
| 2        | 13                    | 12                                   | 80                    | 72                                   |
| 3        | 50                    | 69                                   | 46                    | 46                                   |
| 4        | nsd                   | nsd                                  | nsd                   | nsd                                  |
| 5        | nsd                   | nsd                                  | nsd                   | nsd                                  |
| 6        | 90                    | 2                                    | 7                     | 1                                    |
| 7        | 14                    | 18                                   | 85                    | 11                                   |
| 8        | nsd                   | nsd                                  | nsd                   | nsd                                  |
| 9        | nsd                   | nsd                                  | nsd                   | nsd                                  |

Tabla 25.- Valores normales para los valores porcentuales y absolutos de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+.

| Edad       | Linfocitos T CD4+ (%) | Linfocitos T CD4+ (mm <sup>3</sup> ) | Linfocitos T CD8+ (%) | Linfocitos T CD8+ (mm <sup>3</sup> ) |
|------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| 6-12 meses | 31-56                 | 1400-4300                            | 12-24                 | 500-1700                             |
| 1-2 años   | 32-51                 | 1300-3400                            | 14-30                 | 620-2000                             |
| 2-6 años   | 28-47                 | 700-2200                             | 16-30                 | 490-1300                             |

Las figuras 24 y 25, muestran el análisis estadístico para las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+:

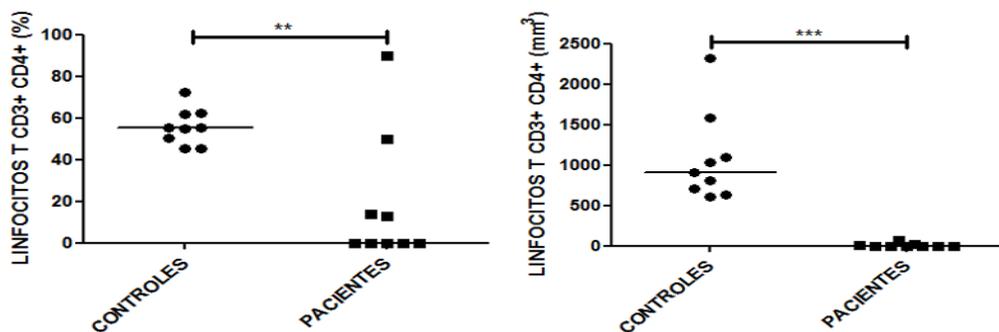
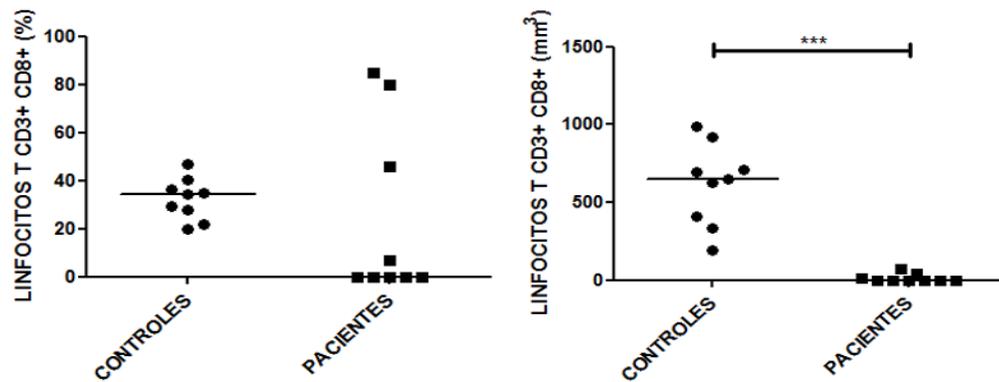


Figura 24.- Análisis estadístico de los linfocitos T CD3+ CD4+ en controles sanos y pacientes. Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ CD4+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 25.- Análisis estadístico de los linfocitos T CD3+ CD8+ en controles sanos y pacientes.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ CD8+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .

A partir de las figuras 24 y 25, se observa que sí existen diferencias significativas (a nivel porcentual y absoluto) de la subpoblación de linfocitos T CD3+CD4+, con  $p = 0.0078$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente; y una diferencia altamente significativa (a nivel de valor absoluto) para la subpoblación de linfocitos T CD3+CD8+, con  $p < 0.0001$ .

### Caracterización de mutaciones en el gen IL2RG por técnicas de biología molecular

#### Amplificación del gen IL2RG por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para los pacientes de estudio SCID, se contaba con información previa adicional a los datos clínicos presentados con anterioridad. La información consiste en la localización y secuencia sugerida de las mutaciones de cada paciente, efectuada mediante la técnica de secuenciación masiva. Dicho proceso fue efectuado antes del estudio que se reporta en esta tesis. El propósito de estudio es efectuar la corroboración por PCR Sanger de las mutaciones sugeridas con anterioridad.

La Tabla 26, muestra los datos mencionados para cada uno de los pacientes del estudio de SCID:

Tabla 26.- Detalles de secuenciación masiva de los pacientes de estudio en SCID.

| Paciente SCID | No. de cambios | Detalles   | Posición | Cambio  | Secuencia                    | Consecuencia   |
|---------------|----------------|--|----------|---------|------------------------------|--|
| 1             | 2              | 1.- Entre exón 2 y exón 3 (61 pb antes del exón 3)         | 71110746 | T>C     | tgaacaacaatgtttgtaga         |  |
|               |                | 2.- Exón 7   | 71108278 | GAA>GA  | gcgttctaccgaaaagtctcc        | UCG por CGG (serina por arginina. Delección, corrimiento no sinónimo de neutro por básico) |
| 2             | 2              | 1.- Exón 7   | 71108336 | G>A     | gaattcggggca                 | CGA por UGA (treonina por STOP prematuro)  |
|               |                | 2.- Entre exón 2 y exón 3 (61 pb antes del exón 3)         | 71110746 | T>C     | cagatattccaga                |  |
| 3             | 1              | 1.- Entre exón 2 y exón 3 (61 pb antes del exón 3)         | 71110746 | T>C     | tgcaatccag                   |  |
| 4             | 1              | 1.- Exón 4 y entre exón 4 y exón 5 (al inicio de intrón 4) | 71110152 | TCAC>TC | tagtcaactcacagtcc            | ACU por ACU <sub>int</sub> (treonina por treonina. Sinónima, sitio de splicing)            |
| 5             | 1              | 1.- Entre exón 2 y exón 3 (18 pb antes del exón 3)         | 71110703 | T>C     | gaggagaaaggttgaag            |  |
| 6             | 0              |  |          |         |                              |  |
| 7             | 1              | 1.- Entre exón 2 y exón 3 (18 pb antes del exón 3)         | 71110703 | T>C     | tagaggagaaaggttgaaggaag      |  |
| 8             | 1              | 1.- Entre exón 2 y exón 3 (61 pb antes del exón 3)         | 71110746 | T>C     | tgggtactgcagatattccagagcctag |  |
| 9             | 2              | 1.- Entre exón 2 y exón 3 (61 pb antes del exón 3)         | 71110746 | T>C     | tgaacaacaatgtttgtaga         |  |

Se logró efectuar la caracterización de mutaciones en 2 pacientes a partir de muestras de DNA genómico. Se utilizaron iniciadores de sentido y antisentido específicos para cada uno de los 8 exones que componen al gen (ver metodología). Tras la amplificación, se realizó un corrimiento electroforético que arrojó los siguientes resultados:

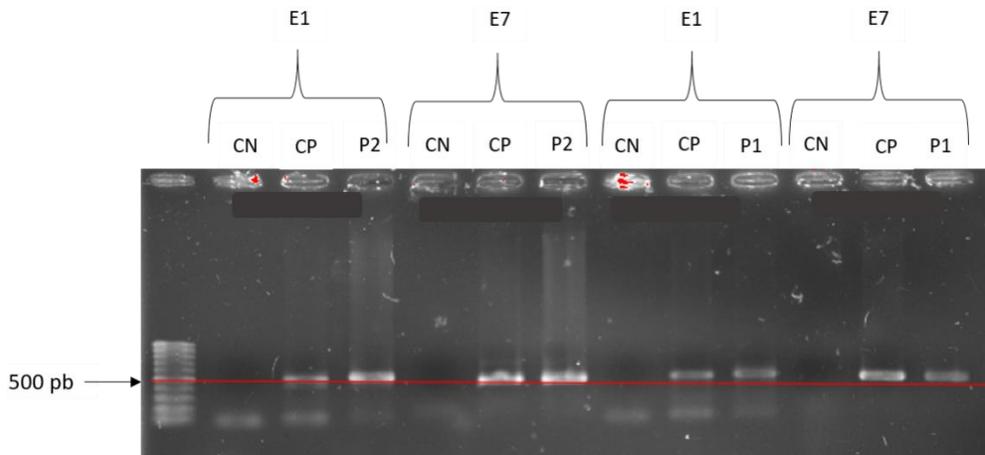


Figura 26.- Amplificación de los exones 1 y 7 del gen *IL2RG*. El exón 1 consta de 512 pb, mientras que el exón 7 consta de 538 pares de bases.

En la figura se pueden apreciar los productos de amplificación que se obtuvieron para los pacientes 2 y 1, respectivamente. Se eligieron los exones 1 y 7 debido a la frecuencia con la que mutaciones responsables de SCID, presentan mutaciones localizadas dentro de la secuencia de dichos exones.

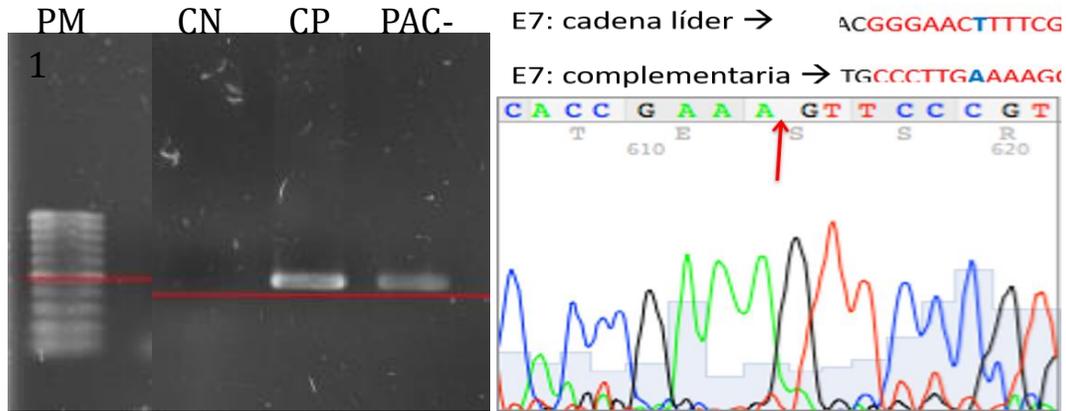
Los pacientes 1 y 2 fueron quienes mejores resultados de amplificación arrojaron, por lo que se decidió continuar la metodología con ellos dos hasta llegar a la secuenciación.

### **Secuenciación y análisis**

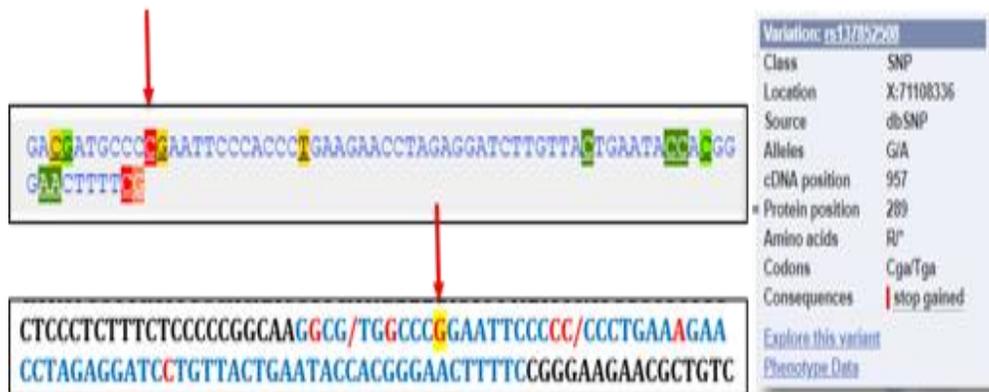
El análisis de secuenciación de *IL2RG* del paciente 1 (P1) corroboró la mutación previamente localizada; una deleción de timina en la posición 1015 (c.T1015d) en el exón 7, lo que provocó un cambio de aminoácido en la posición 308 de serina a arginina (p.S308R). Dicho cambio ocurre en el paso de un aminoácido polar sin carga, por un aminoácido polar con carga positiva. Esta mutación ya está reportada (Noguchi M, Leonard W.J. 2008)

Para el paciente 2 (P2), también se corroboró la información, encontrándose una transición de citosina por guanina en la posición 957 (c.C957G) del exón 7, lo que provocó un cambio de aminoácido en la posición 289 de arginina por glicina (p.R289G). El cambio representa

por el paso de un aminoácido polar con carga positiva a un aminoácido polar sin carga. Esta mutación esta reportada en <https://www.ensembl.org/>



**Figura 27.- Análisis de la secuenciación del exón 7 del paciente 1.** Gel de electroforesis y electroferograma que ilustra los resultados de la secuenciación del DNA genómico. La flecha roja indica el nucleótido que sufrió una deleción visto desde la cadena complementaria.



**Figura 28.- Análisis de la secuenciación del exón 7 del paciente 2.** En la primera imagen se observa la secuencia de referencia, donde la flecha roja señala el sitio donde originalmente se ubica la citosina en la secuencia. En la segunda imagen, se aprecia la secuencia del paciente, donde se señala la transición de guanina a citosina.

En el caso del paciente 2, tanto el electroferograma, como la secuencia mostrada en la Figura 28, mostraban múltiples cambios que no coincidían en ambos sentidos de la secuenciación. Por este motivo, a pesar de presentarse el resultado correspondiente a la mutación que se pretendía corroborar, es necesario efectuar una nueva secuenciación que permita demostrar el cambio reportado como el único y responsable de la condición de SCID en el paciente.

## Características clínicas, de fenotipo y genotipo de los pacientes con Síndrome de Híper IgM (SHIGM)

De la misma manera que para los pacientes con SCID, el grupo de estudio para esta IDP, constó de 9 pacientes masculinos con diagnóstico clínico de SHIGM y con un rango de edades que oscila entre los 6 meses y 18 años de edad.

La edad promedio de los pacientes es de 4 años. Las manifestaciones clínicas de mayor frecuencia son: infecciones de vías respiratorias (100%), neumonía (70%), sepsis (30%) y diarrea crónica (23%); los datos específicos para cada paciente no se muestran.

Tabla 27.- Valores de inmunoglobulinas y características clínicas de los pacientes de SHIGM.

| Paciente SHIGM | Edad (años) | Género | IgG (mg/dL) | IgM (mg/dL) | IgA (mg/dL) |
|----------------|-------------|--------|-------------|-------------|-------------|
| 1              | 2           | M      | nsm         | nsm         | nsm         |
| 2              | 18          | M      | nsm         | nsm         | nsm         |
| 3              | 6 (m)       | M      | 270         | 15          | 36.2        |
| 4              | 1           | M      | nsm         | nsm         | nsm         |
| 5              | 1           | M      | 141         | 129         | 10          |
| 6              | 6           | M      | 420         | 273         | <23         |
| 7              | 1           | M      | 364         | 69          | 27          |
| 8              | 2           | M      | 200         | 29          | 6.3         |
| 9              | 2           | M      | 379         | 261         | 53          |

\*nsm: no se muestra

## Poblaciones leucocitarias

Se determinó la proporción de poblaciones leucocitarias a partir de sangre periférica para pacientes y testigos sanos (ambos grupos con una n=9) mediante la misma técnica de tinción utilizada para las poblaciones leucocitarias en pacientes con SCID. El número absoluto de cada población leucocitaria fue determinado mediante la misma fórmula empleada para el grupo de pacientes de SCID.

En las tablas presentadas a continuación, se muestran los valores porcentuales y absolutos de las poblaciones leucocitarias en testigos sanos y pacientes. Los valores de referencia porcentuales y absolutos para cada población, son los mismos que se reportan en la Tabla 16:

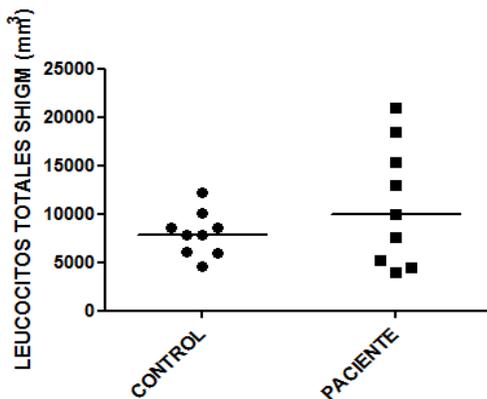
Tabla 28.- Valores porcentuales y absolutos de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos en testigos sanos.

| <b>Testigo SHIGM</b> | <b>Leucocitos totales (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Neutrófilos (%)</b> | <b>Neutrófilos (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Linfocitos (%)</b> | <b>Linfocitos (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Monocitos (%)</b> | <b>Monocitos (mm<sup>3</sup>)</b> |
|----------------------|--|------------------------|-------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 1                    | 8600                                       | 55                     | 4730                                | 21                    | 1860                               | 6                    | 516                               |
| 2                    | 7800                                       | 69.6                   | 5429                                | 25.3                  | 1973                               | 4                    | 312                               |
| 3                    | 12200                                      | 44                     | 5368                                | 43                    | 5246                               | 10                   | 1220                              |
| 4                    | 8600                                       | 55                     | 4730                                | 21                    | 1860                               | 6                    | 516                               |
| 5                    | 7800                                       | 50                     | 3900                                | 38                    | 2964                               | 9                    | 702                               |
| 6                    | 4600                                       | 53.3                   | 2452                                | 34.2                  | 1573                               | 9.6                  | 442                               |
| 7                    | 6100                                       | 44                     | 2684                                | 50                    | 3050                               | 6                    | 366                               |
| 8                    | 5900                                       | 43                     | 2537                                | 47                    | 2773                               | 8                    | 472                               |
| 9                    | 10100                                      | 53                     | 5353                                | 35                    | 3535                               | 10                   | 1010                              |

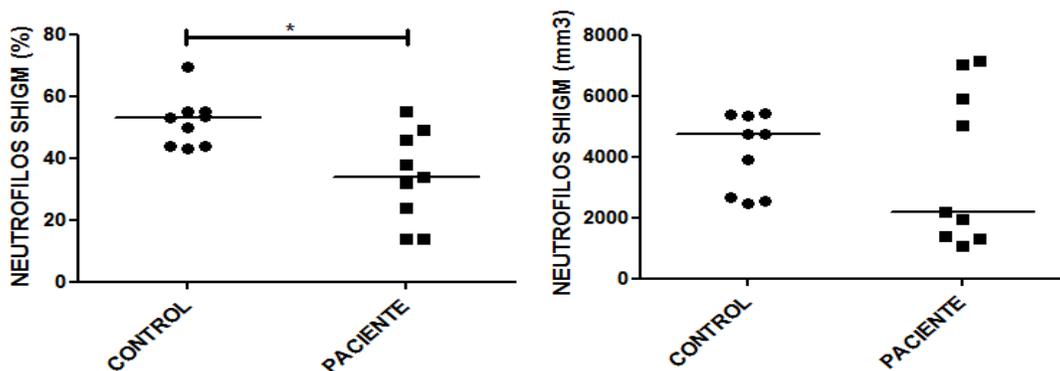
Tabla 29.- Valores porcentuales y absolutos de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos en pacientes con SHIGM.

| <b>Paciente SHIGM</b> | <b>Leucocitos totales (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Neutrófilos (%)</b> | <b>Neutrófilos (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Linfocitos (%)</b> | <b>Linfocitos (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Monocitos (%)</b> | <b>Monocitos (mm<sup>3</sup>)</b> |
|-----------------------|--|------------------------|-------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 1                     | 18450                                      | 32                     | 5904                                | 56                    | 10332                              | 4                    | 811                               |
| 2                     | 5166                                       | 38                     | 1963                                | 50                    | 2583                               | 7                    | 362                               |
| 3                     | 21000                                      | 24                     | 5040                                | 67                    | 14070                              | 4                    | 840                               |
| 4                     | 10000                                      | 14                     | 1400                                | 79                    | 7900                               | 5                    | 500                               |
| 5                     | 15275                                      | 46                     | 7027                                | 35                    | 5346                               | 9                    | 1375                              |
| 6                     | 4500                                       | 49                     | 2205                                | 31                    | 1395                               | 14                   | 630                               |
| 7                     | 3900                                       | 34                     | 1326                                | 41                    | 1599                               | 17                   | 663                               |
| 8                     | 7567                                       | 14                     | 1059                                | 74                    | 5600                               | 3                    | 227                               |
| 9                     | 13000                                      | 55                     | 7150                                | 39                    | 5070                               | 6                    | 780                               |

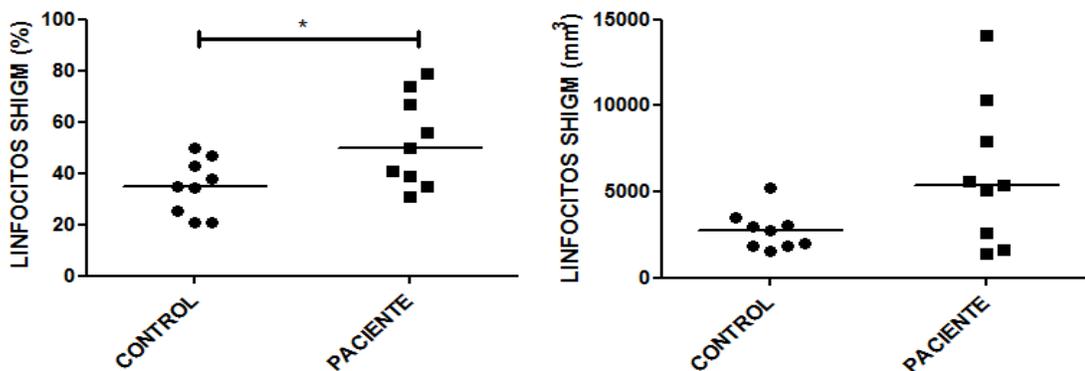
En las figuras 29, 30, 31 y 32 se muestran los análisis estadísticos para las poblaciones leucocitarias en testigos sanos y pacientes:



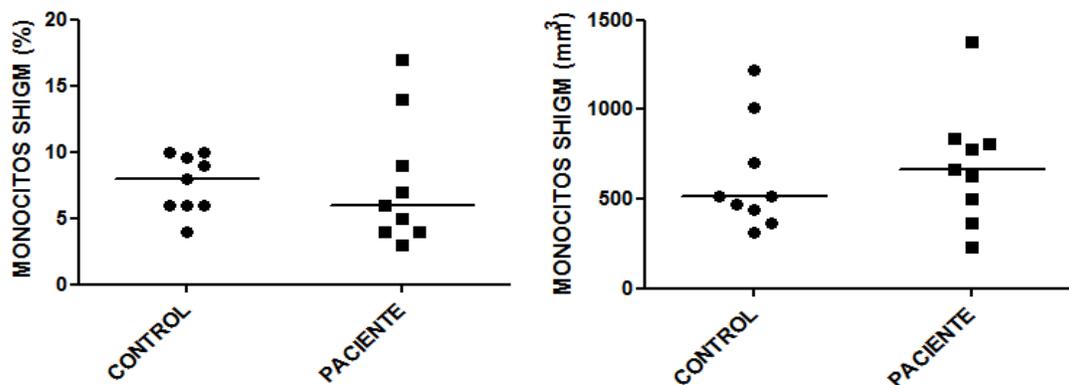
**Figura 29.- Análisis estadístico de los leucocitos totales en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores absolutos de leucocitos totales en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente.



**Figura 30.- Análisis estadístico de neutrófilos en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de neutrófilos en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 31.- Análisis estadístico de linfocitos en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 32.- Análisis estadístico de monocitos en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de monocitos en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente.

En las figuras presentadas, observamos que no existe diferencia significativa en los valores de leucocitos totales, comparando entre testigos sanos y pacientes. Existe una diferencia significativa en los valores porcentuales de neutrófilos con una  $p= 0.0168$ ; diferencia significativa en los porcentajes de linfocitos, con una  $p= 0.0419$ ; y no se observa diferencia en porcentajes y valores absolutos de la población de monocitos.

### **Poblaciones de linfocitos T, B y células NK**

Mediante las mismas técnicas de tinción para citometría de flujo, y los mismos criterios de selección para la elección de poblaciones celulares ya descritas, se determinaron los valores porcentuales y absolutos de linfocitos T, B y células NK.

Las Tablas 30 y 31 muestran los valores porcentuales y absolutos de las poblaciones de células T y B en testigos sanos y pacientes respectivamente; para ambas, se consideran normales los valores de referencia de la Tabla 19.

Las Tablas 32 y 33 muestran valores porcentuales y absolutos de las poblaciones de células NK en testigos y pacientes, respectivamente, considerándose para ambas los valores de referencia de la Tabla 22:

Tabla 30.- Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T y B en testigos sanos.

| <b>Testigo SHIGM</b> | <b>Linfocitos T CD3+ (%)</b> | <b>Linfocitos T CD3+ (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Linfocitos B CD19+ (%)</b> | <b>Linfocitos B CD19 (mm<sup>3</sup>)</b> |
|----------------------|------------------------------|---|-------------------------------|---|
| 1                    | 55                           | 1137                                      | 8                             | 165                                       |
| 2                    | 71.4                         | 1751                                      | 11.7                          | 287                                       |
| 3                    | 59.1                         | 2273                                      | 23.9                          | 1115                                      |
| 4                    | 55                           | 1137                                      | 8                             | 165                                       |
| 5                    | 65.5                         | 1394                                      | 5                             | 120                                       |
| 6                    | 64                           | 1540                                      | 7.8                           | 188                                       |
| 7                    | 76.9                         | 1815                                      | 5.2                           | 123                                       |
| 8                    | 66                           | 979                                       | 15.3                          | 227                                       |
| 9                    | 77.4                         | 2867                                      | 10.9                          | 404                                       |

Tabla 31.- Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T y B en pacientes con SHIGM.

| <b>Paciente SHIGM</b> | <b>Linfocitos T CD3+ (%)</b> | <b>Linfocitos T CD3+ (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Linfocitos B CD19+ (%)</b> | <b>Linfocitos B CD19 (mm<sup>3</sup>)</b> |
|-----------------------|------------------------------|---|-------------------------------|---|
| 1                     | 50                           | 5166                                      | 38                            | 3926                                      |
| 2                     | 67                           | 1731                                      | 27                            | 697                                       |
| 3                     | 75                           | 10553                                     | 16                            | 2251                                      |
| 4                     | 65                           | 5135                                      | 31                            | 2449                                      |
| 5                     | 29                           | 1550                                      | 34                            | 1818                                      |
| 6                     | 63                           | 879                                       | 25                            | 349                                       |
| 7                     | 54                           | 864                                       | 28                            | 448                                       |
| 8                     | 71                           | 3976                                      | 17                            | 952                                       |
| 9                     | 68                           | 3448                                      | 24                            | 1217                                      |

Tabla 32.- Valores porcentuales y absolutos de células NK en testigos sanos.

| <b>Testigo SHIGM</b> | <b>Células NK CD16+/56+ (%)</b> | <b>Células NK CD16+/56+ (mm<sup>3</sup>)</b> |
|----------------------|---------------------------------|--|
| 1                    | 20                              | 450  |
| 2                    | 15.8                            | 388  |
| 3                    | 16                              | 615  |
| 4                    | 17.2                            | 420  |

|   |      |     |
|---|------|-----|
| 5 | 22.2 | 473 |
| 6 | 18   | 433 |
| 7 | 31.7 | 748 |
| 8 | 20   | 297 |
| 9 | 13.4 | 496 |

Tabla 33.- Valores porcentuales y absolutos de células NK en pacientes con SHIGM.

| Paciente SHIGM | Células NK CD16+/56+ (%) | Células NK CD16+/56+ (mm <sup>3</sup> ) |
|----------------|--------------------------|---|
| 1              | 8                        | 827                                     |
| 2              | 5                        | 129                                     |
| 3              | 6                        | 844                                     |
| 4              | 4                        | 316                                     |
| 5              | 28                       | 1497                                    |
| 6              | 12                       | 167                                     |
| 7              | 19                       | 304                                     |
| 8              | 11                       | 616                                     |
| 9              | 4                        | 203                                     |

En las Figuras 33, 34 y 35 se muestran los análisis estadísticos para las poblaciones de linfocitos T, B y células NK en testigos sanos y pacientes:

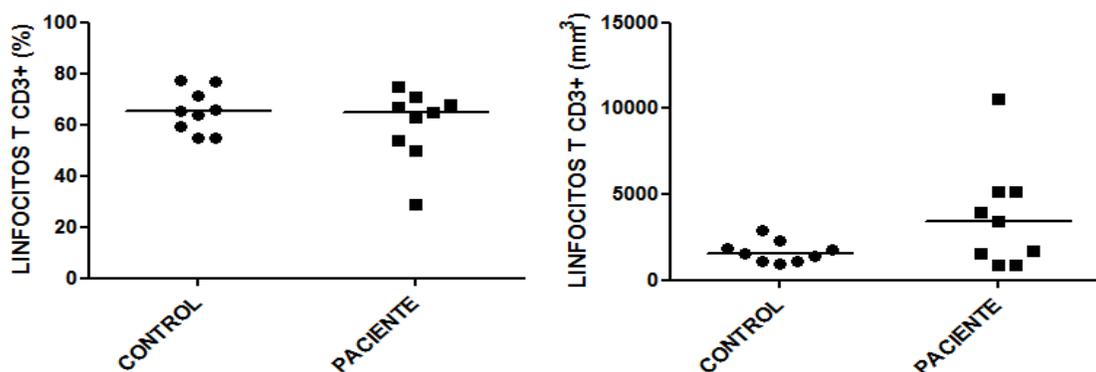
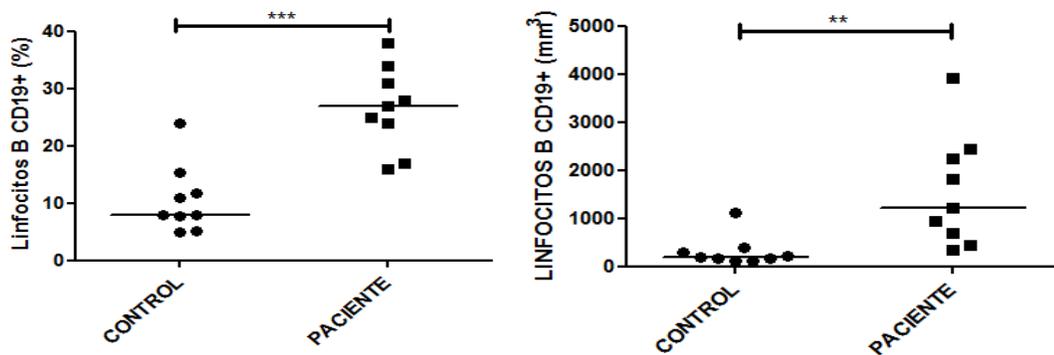
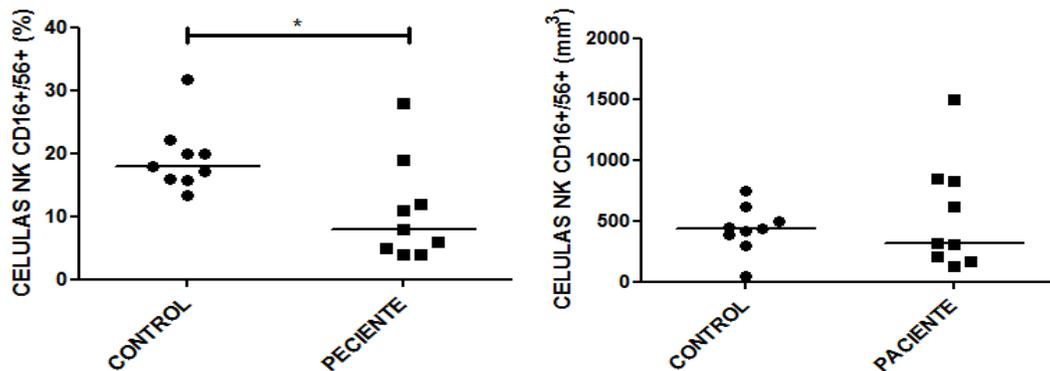


Figura 33.- Análisis estadístico de linfocitos T CD3+ en controles sanos y pacientes con SHIGM. Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente.



**Figura 34.- Análisis estadístico de linfocitos B CD19+ en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos B CD19+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 35.- Análisis estadístico de células NK CD16+/56+ en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de células NK CD16+/56+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .

En las Figuras 33, 34 y 35, observamos que no existe diferencia significativa en valores porcentuales ni absolutos de la población de linfocitos T CD3+. Existe diferencia altamente significativa para los valores porcentuales de linfocitos B CD19+, con una  $p = 0.0008$ , y una diferencia muy significativa para los valores absolutos de la misma población, con  $p = 0.0020$ . Finalmente, existe una diferencia significativa para los valores porcentuales de células NK, con  $p = 0.0171$ .

### Subpoblaciones de linfocitos T

Mediante las mismas técnicas de tinción para citometría de flujo, y los mismos criterios de selección para la elección de poblaciones celulares ya descritas, se determinaron los valores porcentuales y absolutos de las subpoblaciones de linfocitos T.

Las Tablas 34 y 35 muestran los valores porcentuales y absolutos de las subpoblaciones de células T en testigos sanos y pacientes respectivamente; para ambas, se consideran normales los valores de referencia de la Tabla 25:

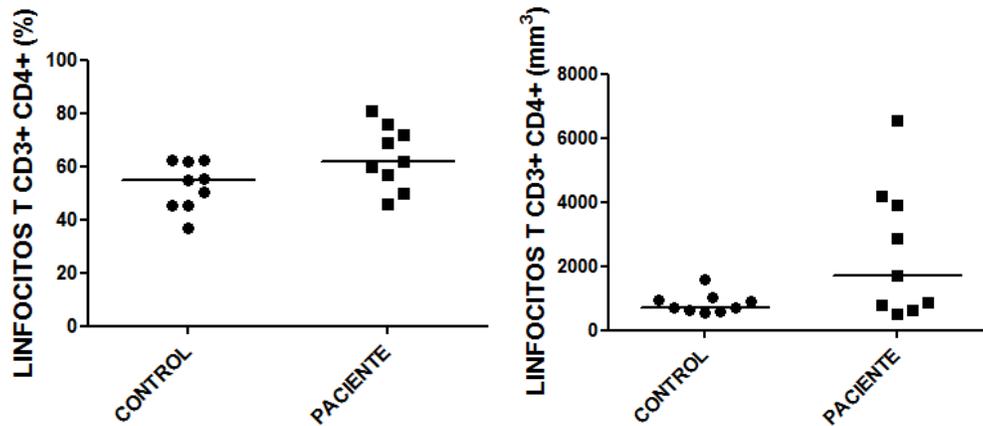
Tabla 34.- Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ CD4+ y CD3+ CD8+.

| <b>Testigo<br/>SHIGM</b> | <b>Linfocitos T<br/>CD3+/CD4+ (%)</b> | <b>Linfocitos T<br/>CD3+/CD4+ (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Linfocitos T<br/>CD3+/CD8+ (%)</b> | <b>Linfocitos T<br/>CD3+/CD8+ (mm<sup>3</sup>)</b> |
|--------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|--|
| 1                        | 62.2                                  | 707  | 29.2                                  | 332  |
| 2                        | 54.8                                  | 960  | 41.8                                  | 732  |
| 3                        | 45.2                                  | 1027   | 40.5                                  | 920  |
| 4                        | 62.2                                  | 707  | 29.2                                  | 332  |
| 5                        | 45.5                                  | 635  | 46.8                                  | 653  |
| 6                        | 36.6                                  | 564  | 60                                    | 924  |
| 7                        | 50.1                                  | 909  | 34.6                                  | 628  |
| 8                        | 62                                    | 606  | 20                                    | 196  |
| 9                        | 55.3                                  | 1585   | 34.4                                  | 986  |

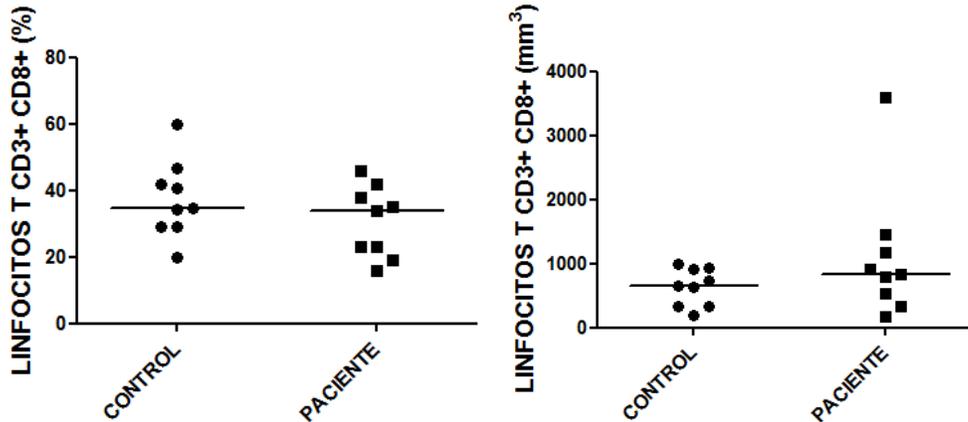
Tabla 35.- Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ CD4+ y CD3+ CD8+.

| <b>Paciente<br/>SHIGM</b> | <b>Linfocitos T<br/>CD3+/CD4+ (%)</b> | <b>Linfocitos T<br/>CD3+/CD4+ (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Linfocitos T<br/>CD3+/CD8+ (%)</b> | <b>Linfocitos T<br/>CD3+/CD8+ (mm<sup>3</sup>)</b> |
|---------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|--|
| 1                         | 81                                    | 4184   | 16                                    | 827  |
| 2                         | 46                                    | 796  | 46                                    | 796  |
| 3                         | 62                                    | 6543   | 34                                    | 3588   |
| 4                         | 76                                    | 3903   | 23                                    | 1181   |
| 5                         | 57                                    | 884  | 35                                    | 543  |
| 6                         | 69                                    | 607  | 19                                    | 167  |
| 7                         | 60                                    | 518  | 38                                    | 328  |
| 8                         | 72                                    | 2863   | 23                                    | 914  |
| 9                         | 50                                    | 1723   | 42                                    | 1448   |

En las Figuras 36 y 37, se observa el análisis estadístico de las subpoblación de linfocitos T CD3+ CD4+ y CD3+ CD8+, respectivamente, tanto para testigos sanos como para los pacientes.



**Figura 36.- Análisis estadístico de linfocitos T CD3+ CD4+ en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ CD4+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 37.- Análisis estadístico de linfocitos T CD3+ CD8+ en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ CD8+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente.

En las Figuras 36 y 37 observamos que no existe diferencia significativa a nivel de valores porcentuales ni absolutos para ninguna de las subpoblaciones de linfocitos T, entre testigos sanos y pacientes.

### Subpoblaciones de linfocitos B

Para la determinación de las subpoblaciones de linfocitos B, se realizó una tinción triple, de la siguiente manera: las células B (CD19+) de memoria, se evidencian mediante una tinción con el anticuerpo anti-CD27PE/anti-CD19 APC/anti-IgD FITC. En el caso de los plasmablastos y de las células transicionales, la tinción consistió de los anticuerpos anti-CD24 PE/anti-CD38 APC/anti-CD19 FITC. Una vez realizadas las tinciones, la primera

selección ocurre a partir de la población CD19+; posteriormente se muestran las proporciones de las células B de memoria, transicionales y plasmablastos.

Para determinar la proporción de células B de memoria, se analizó la expresión de CD27. La proporción de plasmablastos se determina por la expresión de CD24 y CD38 alto y la de células B transicionales, por la expresión de CD24 alto y CD38 alto.

En las Tablas 36, 37 y 38 se muestran los valores porcentuales y absolutos de células B de memoria con y sin cambio de isotipo y los linfocitos B naive en testigos y pacientes, así como sus valores de referencia, respectivamente. En las Tablas 39, 40 y 41, aparecen los valores porcentuales y absolutos de células transicionales y plasmablastos en testigos sanos, pacientes y valores de referencia, respectivamente.

Tabla 36- Valores porcentuales y absolutos de células B de memoria y naive en testigos sanos.

| Testigo SHIGM | Células B naive (%) | Células B naive (mm <sup>3</sup> ) | Células B de memoria sin cambio de isotipo (%) | Células B de memoria sin cambio de isotipo (mm <sup>3</sup> ) | Células B de memoria con cambio de isotipo (%) | Células B de memoria con cambio de isotipo (mm <sup>3</sup> ) | Células B de memoria total (%) | Células B de memoria total (mm <sup>3</sup> ) |
|---------------|---------------------|------------------------------------|--|---|--|---|--------------------------------|---|
| 1             | 73                  | 508                                | 6  | 40  | 12   | 86  | 18                             | 125   |
| 2             | 87                  | 605                                | 6  | 42  | 5  | 35  | 10                             | 70  |
| 3             | 72                  | 498                                | 16   | 111   | 10   | 70  | 24                             | 166   |
| 4             | 73                  | 508                                | 6  | 40  | 12   | 86  | 18                             | 125   |
| 5             | 73                  | 167                                | 7  | 16  | 14   | 32  | 21                             | 48  |
| 6             | 62                  | 334                                | 11   | 59  | 19   | 102   | 28                             | 151   |
| 7             | 88                  | 1233                               | 6  | 74  | 3  | 42  | 9                              | 116   |
| 8             | 73                  | 508                                | 6  | 40  | 12   | 86  | 18                             | 125   |
| 9             | 78                  | 555                                | 9  | 64  | 9  | 64  | 14                             | 100   |

Tabla 37.- Valores porcentuales y absolutos de células B de memoria y naive en pacientes de SHIGM.

| Paciente SHIGM | Células B naive (%) | Células B naive (mm <sup>3</sup> ) | Células B de memoria sin cambio de isotipo (%) | Células B de memoria sin cambio de isotipo (mm <sup>3</sup> ) | Células B de memoria con cambio de isotipo (%) | Células B de memoria con cambio de isotipo (mm <sup>3</sup> ) | Células B de memoria total (%) | Células B de memoria total (mm <sup>3</sup> ) |
|----------------|---------------------|------------------------------------|--|---|--|---|--------------------------------|---|
| 1              | 93                  | 4804                               | 4  | 206   | 0.15   | 8   | 4                              | 206   |
| 2              | 83                  | 374                                | 4  | 18  | 1  | 5   | 5                              | 23  |
| 3              | 93                  | 2093                               | 5  | 113   | 0.1  | 2   | 5                              | 113   |
| 4              | 94                  | 2302                               | 2  | 56  | 0.2  | 5   | 2                              | 61  |
| 5              | 97                  | 1763                               | 2  | 36  | 0  | 0   | 2                              | 36  |
| 6              | 83                  | 290                                | 3  | 10  | 1  | 3   | 5                              | 17  |
| 7              | 97                  | 435                                | 2  | 9   | 0  | 0   | 2                              | 9   |
| 8              | 93                  | 885                                | 4  | 38  | 0.4  | 4   | 4                              | 38  |
| 9              | 97                  | 1180                               | 2  | 24  | 0  | 0   | 2                              | 24  |

Tabla 38.- Valores de referencia para las células B de memoria y naive.

| Edad        | Células B naive (%) | Células B naive (mm <sup>3</sup> ) | Células B de memoria sin cambio de isotipo (%) | Células B de memoria sin cambio de isotipo (mm <sup>3</sup> ) | Células B de memoria con cambio de isotipo (%) | Células B de memoria con cambio de isotipo (mm <sup>3</sup> ) | Células B de memoria total (%) | Células B de memoria total (mm <sup>3</sup> ) |
|-------------|---------------------|------------------------------------|--|---|--|---|--------------------------------|---|
| 5-9 meses   | 85.5-93.4           | 600-2590                           | 2.8-7.4  | 20-140  | 1.6-7  | 10-100  | 5.3-11.5                       | 50-270  |
| 9-15 meses  | 76.5-94.7           | 360-2800                           | 3-10.7   | 30-170  | 1.4-11.9                                       | 30-180  | 4.1-20.6                       | 40-190  |
| 15-24 meses | 68.1-89.3           | 490-1560                           | 4.1-13.9                                       | 20-180  | 3.9-13.6                                       | 20-220  | 9.5-26.5                       | 50-330  |
| 2-5 años    | 54-88.4             | 280-1330                           | 2.7-19.8                                       | 20-100  | 4.7-21.2                                       | 40-140  | 7.8-37.1                       | 50-390  |

Tabla 39.- Valores porcentuales y absolutos de células transicionales y plasmablastos en testigos sanos.

| Testigo SHIGM | Transicionales (%) | Transicionales (mm <sup>3</sup> ) | Plasmablastos (%) | Plasmablastos (mm <sup>3</sup> ) |
|---------------|--------------------|-----------------------------------|-------------------|----------------------------------|
| 1             | 12                 | 84                                | 0.4               | 3                                |
| 2             | 6                  | 42                                | 0.3               | 2                                |
| 3             | 7                  | 48                                | 0.9               | 6                                |
| 4             | 12                 | 84                                | 0.4               | 3                                |
| 5             | 9                  | 21                                | 0.6               | 1                                |
| 6             | 8                  | 43                                | 1.5               | 8                                |
| 7             | 6                  | 84                                | 0.7               | 9                                |
| 8             | 12                 | 84                                | 0.4               | 3                                |
| 9             | 13                 | 93                                | 0.6               | 4                                |

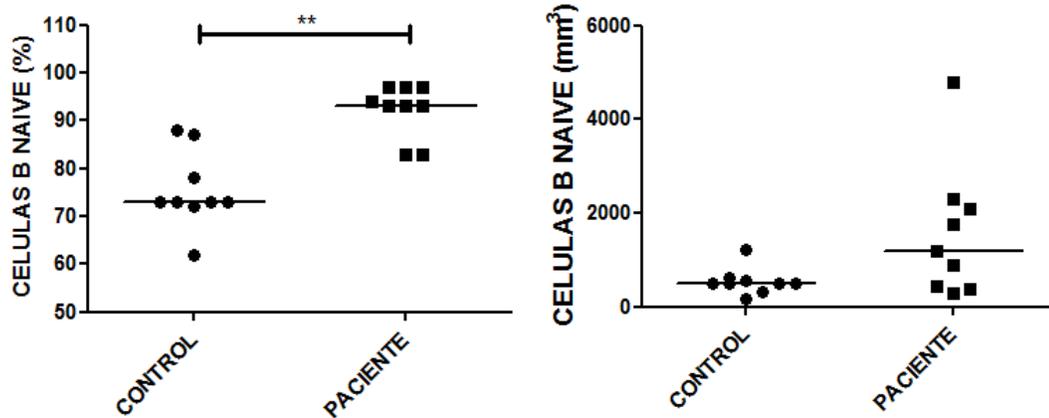
Tabla 40.- Valores porcentuales y absolutos de células transicionales y plasmablastos en pacientes con SHIGM.

| Paciente SHIGM | Transicionales (%) | Transicionales (mm <sup>3</sup> ) | Plasmablastos (%) | Plasmablastos (mm <sup>3</sup> ) |
|----------------|--------------------|-----------------------------------|-------------------|----------------------------------|
| 1              | 14                 | 723                               | 0                 | 0                                |
| 2              | 6                  | 27                                | 0                 | 0                                |
| 3              | 1                  | 23                                | 0.1               | 2                                |
| 4              | 0                  | 0                                 | 0                 | 0                                |
| 5              | 9                  | 164                               | 1                 | 25                               |
| 6              | 0                  | 0                                 | 0                 | 0                                |
| 7              | 0                  | 0                                 | 0                 | 0                                |
| 8              | 16                 | 152                               | 2                 | 19                               |
| 9              | 27                 | 329                               | 1                 | 12                               |

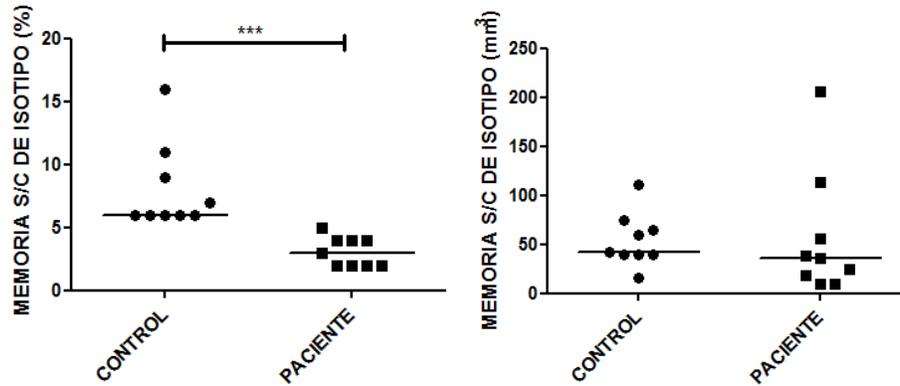
Tabla 41.- Valores de referencia para células transicionales y plasmablastos.

| Edad        | Transicionales (%) | Transicionales (mm <sup>3</sup> ) | Plasmablastos (%) | Plasmablastos (mm <sup>3</sup> ) |
|-------------|--------------------|-----------------------------------|-------------------|----------------------------------|
| 5-9 meses   | 7.2-19.7           | 100-300                           | 0.2-4.0           | 0.0-60                           |
| 9-15 meses  | 3.6-12.7           | 20-210                            | 0.4-5.5           | 0.0-30                           |
| 15-24 meses | 3.3-16.5           | 30-200                            | 0.5-3.0           | 10-40                            |
| 2-5 años    | 3.1-12.3           | 20-200                            | 0.6-4.0           | 10-50                            |

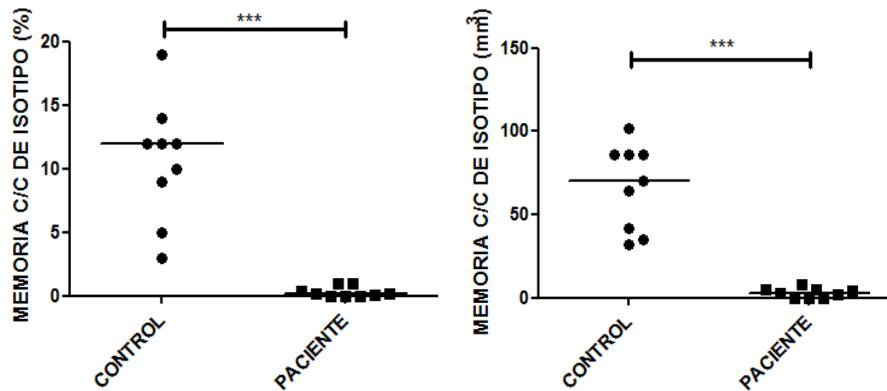
En las Figuras 38, 39, 40, 41, 42 y 43 se encuentran los análisis estadísticos de las subpoblaciones de células B, así como de las células transicionales y plasmablastos.



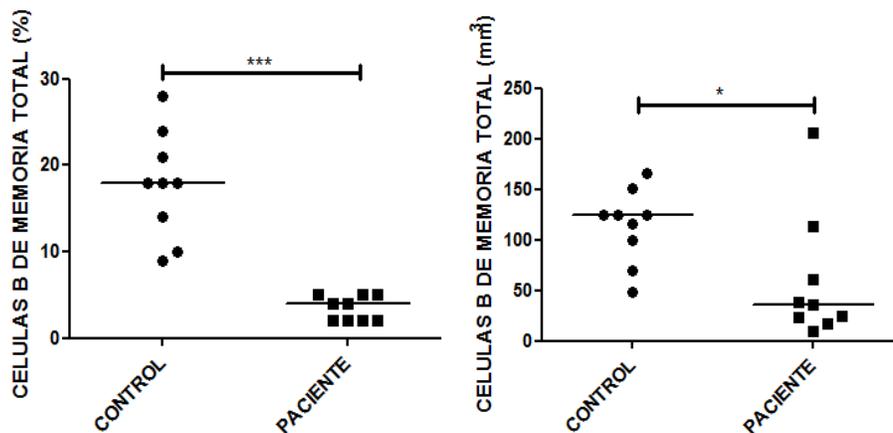
**Figura 38.- Análisis estadístico de células B naive en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de células B naive en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 39.- Análisis estadístico de células B de memoria sin cambio de isotipo, en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de células B de memoria sin cambio de isotipo, en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .

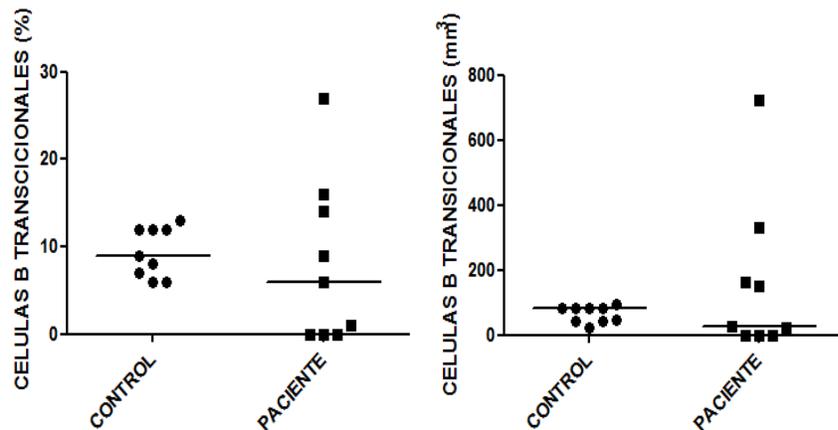


**Figura 40.- Análisis estadístico de células B de memoria con cambio de isotipo, en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de células B de memoria con cambio de isotipo, en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .

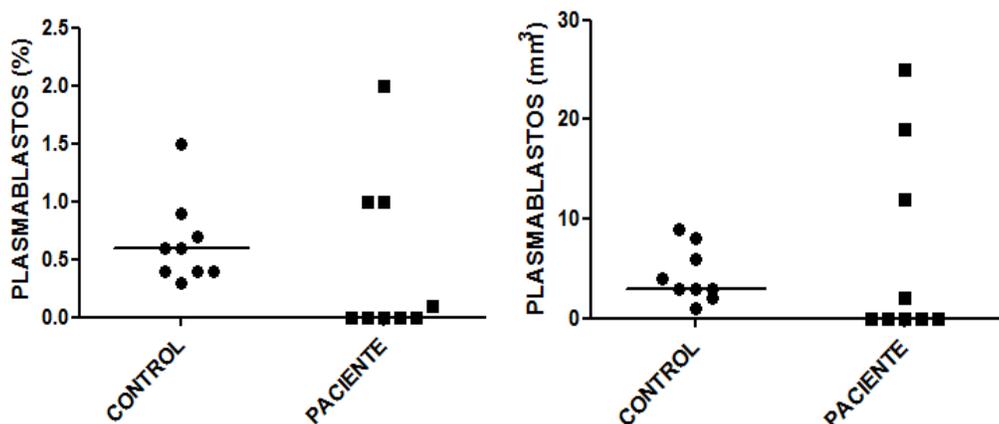


**Figura 41.- Análisis estadístico de células B de memoria total en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de células B de memoria total en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .

En las figuras anteriores observamos que sí existe una diferencia muy significativa a nivel de valores porcentuales dentro de la población de células naive, con una  $p= 0.0014$ ; una diferencia altamente significativa, en valores porcentuales, de las células B de memoria sin cambio de isotipo, con una  $p= 0.0004$ ; diferencia altamente significativa, tanto en valores porcentuales como absolutos, de células B de memoria con cambio de isotipo, con  $p= 0.0004$  en ambos casos; y una diferencia altamente significativa a nivel porcentual para las células B de memoria total con una  $p= 0.0004$ , mientras que para los valores absolutos, la diferencia es significativa con una  $p= 0.0169$ .



**Figura 42.- Análisis estadístico de células transicionales en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de células transicionales en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente.



**Figura 43- Análisis estadístico de plasmablastos en controles sanos y pacientes con SHIGM.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de plasmablastos en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente.

En las Figuras 42 y 43 observamos que para las poblaciones de células transicionales y plasmablastos, no existe diferencia significativa, a nivel de valores porcentuales ni a nivel de valores absolutos.

### Caracterización de mutaciones en el gen CD40L por técnicas de biología molecular Amplificación del gen CD40L por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para el grupo de estudio de pacientes con SHIGM, se contaba con información previa adicional a los datos clínicos presentados con anterioridad. La información consiste en la localización y secuencia sugerida de las mutaciones de cada paciente, efectuada mediante la técnica de secuenciación masiva. Dicho proceso fue efectuado antes del estudio que se reporta en esta tesis. El propósito de estudio es efectuar la corroboración de las mutaciones sugeridas con anterioridad.

La Tabla 42 muestra los datos mencionados para cada uno de los pacientes de estudio de SHIGM:

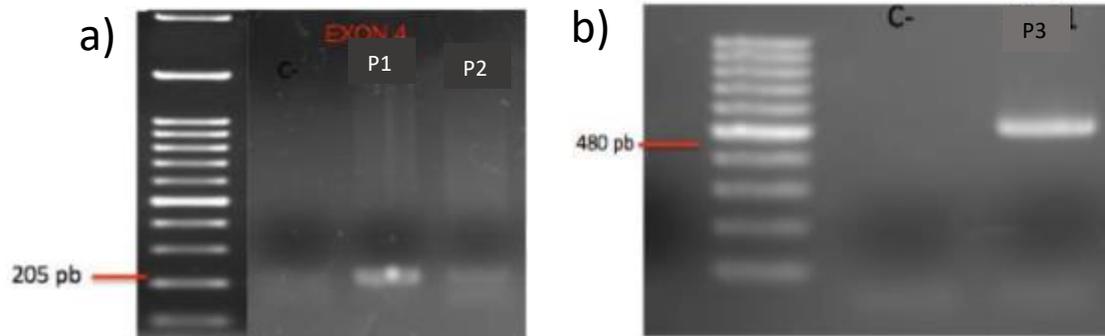
Tabla 42.- Detalles de secuenciación masiva de los pacientes de estudio en SHIGM.

| Paciente | No. De cambios | Detalles                     | Posición  | Cambio | Secuencia  | Consecuencia   |
|----------|----------------|------------------------------|-----------|--------|--|--|
| 1        | 3              | 1.- 13 pb antes del exón 5   | 136659026 | T>C    | cacaaacttcccttccttctaacag(empieza exón 5) tgttacagtggg | CUU por CUC (leucina por leucina) sinónima   |
|          |                | 2.- Exón 4                   | 136656577 | C>A    | cctcaaattgggcacatg                                     | GCG por GAG (alanina por ac. glutámico) grupo hidrófobo por grupo con carga negativa |
|          |                | 3.- Exón 1                   | 136648396 | T>C    | atagaaggtggaca   | UUG por CUG (leucina por leucina) sinónima   |
| 2        | 3              | 1.- 13 pb antes del exón 5   | 136659026 | T>C    | cacaaacttcccttccttctaacag(empieza exón 5) tgttacagtggg | CUU por CUC (leucina por leucina) sinónima   |
|          |                | 2.- Exón 4                   | 136656377 | C>A    | cctcaaattgggcacatg                                     | GCG por GAG (alanina por ac. glutámico) gpo hidrófobo por gpo con carga negativa     |
|          |                | 3.- Exón 1                   | 136648396 | T>C    | atagaaggtggaca   | UUG por CUG (leucina por leucina) sinónima   |
| 4        | 2              | 1.- Exón 1                   | 136648396 | T>C    | atagaaggtggaca   | UUG por CUG (leucina por leucina) sinónima   |
|          |                | 2.- Exón 5                   | 136659294 | C>T    | caacaatccattcacttg                                     | UCC por UUC (fenilalanina por serina) polar no cargado por hidrófobo                 |
| 5        | 1              | 1.- Entre exón 2 y exón 3    | 136650573 |        |  |  |
| 6        | 4              | 1.- Exón 1                   | 136648396 | T>C    | atagaaggtggaca   | UUG por CUG (leucina por leucina) sinónima   |
|          |                | 2.- 3 pb después del exón 4  | 136656421 | A>T    | acatca(acaba exón 4)ggtaagtca                          | AAG por UAG (lisina por STOP) STOP prematuro   |
|          |                | 3.- 12 pb antes del exón 5   | 136659226 | T>C    | ccttcttctaaca(empieza exón 5)tgttacag                  | UUC por CUC (fenilalanina por leucina) ambos del grupo de hidrófobos                 |
|          |                | 4.- Entre el exón 2 y exón 3 | 136650573 |        |  |  |
| 7        | 1              | 1.- Exón 1                   | 136648396 | T>C    | atagaaggtggaca   | UUG por CUG (leucina por leucina) sinónima   |
| 8        | 2              | 1.- Entre exón 4 y exón 5    | 136656539 | A>G    |  |  |
|          |                | 2.- antes del exón 5         | 136659038 | G>A    | ttgtaavag(empieza exón 5)tgttaca                       | CAG por CAA (glutamina por glutamina) sinónima                                       |
| 9        | 1              | 1.- Exón 5                   | 136659398 | G>C    | cagctcttgcttactcaaa                                    | GGC por CGC (glicina por arginina) aa especial por un gpo cargado positivamente      |

La Tabla 42 no contiene información de secuenciación masiva para el paciente número 3 (P3/SHIGM) ya que dicho paciente fue seleccionado gracias a antecedentes familiares que sugerían la mutación localizada dentro del exón 4 del gen CD40L. El análisis previo de este paciente fue realizado por la Dra. Gabriela López Herrera (López-Herrera G. Immunol Res 2015).

Se logró efectuar la caracterización de mutaciones en 3 pacientes a partir de muestras de DNA genómico. Se utilizaron iniciadores de sentido y antisentido específicos para cada uno

de los 5 exones que componen al gen (ver metodología). Tras la amplificación, se realizó un corrimiento electroforético que arrojó los siguientes resultados:

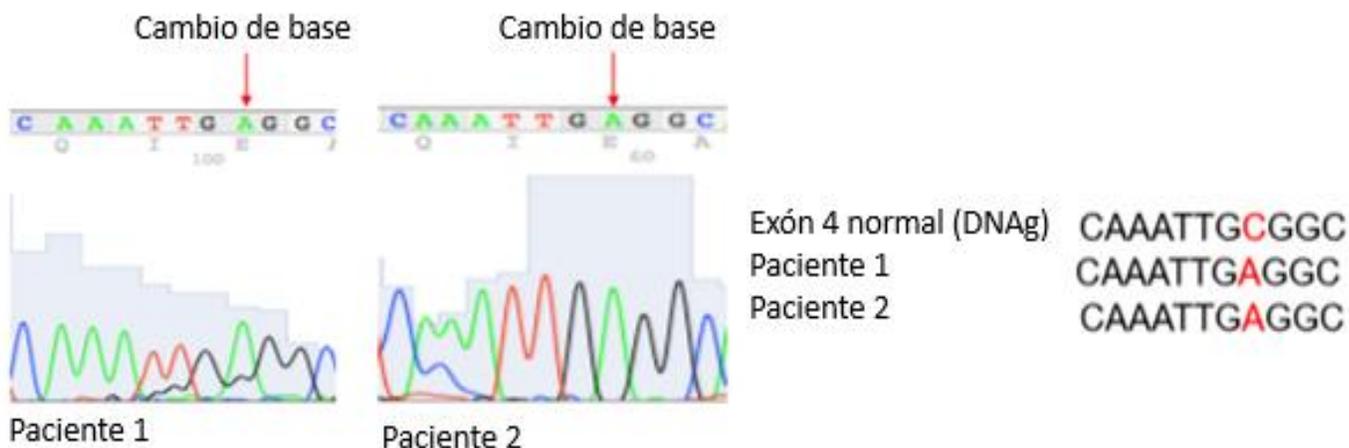


**Figura 44.- Amplificación del gen CD40L mediante PCR.** En la figura a) se observa el gel de electroforesis que revela el resultado de la amplificación para el exón 4; dicho exón fue analizado para los pacientes 1 y 2 puesto que es la localización presuntiva de la mutación reportada. En la figura b) se muestra el resultado de la amplificación del exón 3 del gen CD40L; exón amplificado para el paciente 3, analizado previamente por la Dra. Gabriela López Herrera (López-Herrera G. Immunol Res 2015).

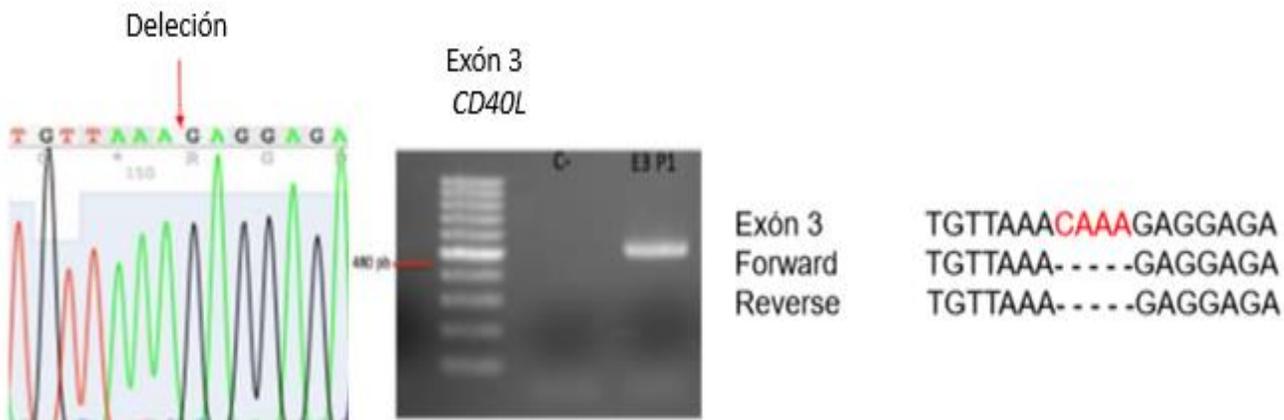
La elección de los exones a amplificar para cada paciente, se realizó tomando en cuenta los datos de secuenciación masiva (Pacientes 1 y 2) y el análisis familiar previo (paciente 3). Los pacientes 1, 2 y 3 fueron quienes mejores resultados de amplificación arrojaron, por lo que se decidió continuar la metodología únicamente utilizando sus muestras.

### **Secuenciación y análisis**

El análisis de secuenciación de *CD40L* de los pacientes 1 y 2, corroboró la mutación previamente localizada; una mutación puntual de una citosina a una adenina en la posición 368 (c.368C>A), lo que provocó un cambio de aminoácido, de alanina a ácido glutámico en la posición 123 (p.A123E), es decir, de un aminoácido hidrofóbico no polar, a un aminoácido polar con carga negativa. Debido a que ambos pacientes son familiares, se logró reconocer la misma mutación en la misma posición para los dos; con el mismo efecto a nivel de producto proteico. Esta mutación ya fue reportada (DiSantos JP, de Saint Basile G, 1993). Para el paciente 3 cuyos antecedentes familiares (madre y hermano) ya habían sido analizados por el trabajo previamente citado, se corroboró que presenta la misma mutación reportada, en la misma posición y con los mismos efectos a nivel de producto proteico. Una deleción de 4 pares de bases, de la posición 359 a la 362 (c.359\_362delCAAA), lo que provocó un codón de paro prematuro en el aminoácido 126 (p.N101\*126). Esta mutación fue reportada por primera vez en el hermano del paciente.



**Figura 45.- Análisis de la secuenciación del exón 4 en pacientes 1 y 2 de SHIGM.** Se observan los electroferogramas correspondientes a la sección del exón 4 de *CD40L*. Las secuencias que se observan a la derecha muestran el cambio de base nitrogenada que para ambos pacientes se había determinado anteriormente mediante secuenciación masiva.



**Figura 46.- Análisis de la secuenciación del exón 3 en paciente 3 de SHIGM.** Se observa el electroferograma correspondientes a la sección del exón 3 de *CD40L*. Las secuencias que se observan a la derecha muestran la región del gen que sufrió la delección (tanto en secuencia sentido como antisentido), siendo las mismas mutaciones que se reportaron para los familiares del paciente en el estudio anteriormente mencionado.

## **Características clínicas, de fenotipo y genotipo de los pacientes con Déficit de Adhesión Leucocitaria (LAD)**

La población de estudio consta de un total de 6 pacientes con diagnóstico clínico de LAD. Las edades de los pacientes oscilan entre los 1 y 8 meses de edad, son 5 femeninos y 1 masculino. El modo de herencia de esta inmunodeficiencia es Autosómica Recesiva.

Los síntomas observados con mayor frecuencia dentro de la valoración clínica de los pacientes, fueron: leucocitosis (100%), neumonías (33%), sepsis (33%); infecciones necrosantes de los tejidos blandos (100%) y retraso en la separación del ombligo (100%). La edad promedio de los pacientes es de 3 meses; los valores inmunoglobulinas séricas no están afectadas (datos no se muestran).

### **Poblaciones leucocitarias**

Se determinó la proporción de poblaciones leucocitarias a partir de sangre periférica para pacientes y testigos sanos (ambos grupos con una n=6) mediante la misma técnica de tinción utilizada para las poblaciones leucocitarias en pacientes con SCID y SHIGM. El número absoluto de cada población leucocitaria fue determinado mediante la misma fórmula empleada para los dos grupos de pacientes anteriores.

Las Tablas 43 y 44 contienen la información acerca de los porcentajes y valores absolutos de poblaciones leucocitarias en testigos y pacientes de LAD-I. Los valores de referencia porcentuales y absolutos para cada población, son los mismos que se reportan en la Tabla 16:

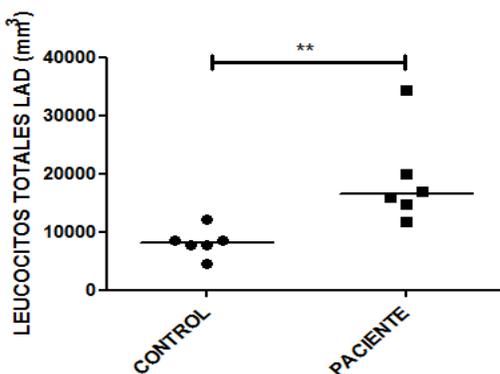
Tabla 43.- Valores porcentuales y absolutos de poblaciones leucocitarias en testigos sanos para LAD-1.

| <b>Testigo LAD</b> | <b>Leucocitos totales (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Neutrófilos (%)</b> | <b>Neutrófilos (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Linfocitos (%)</b> | <b>Linfocitos (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Monocitos (%)</b> | <b>Monocitos (mm<sup>3</sup>)</b> |
|--------------------|--|------------------------|-------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 1                  | 8600                                       | 55                     | 4730                                | 21                    | 1860                               | 6                    | 516                               |
| 2                  | 7800                                       | 69.6                   | 5429                                | 25.3                  | 1973                               | 4                    | 312                               |
| 3                  | 12200                                      | 44                     | 5368                                | 43                    | 5246                               | 10                   | 1220                              |
| 4                  | 8600                                       | 55                     | 4730                                | 21                    | 1860                               | 6                    | 516                               |
| 5                  | 7800                                       | 50                     | 3900                                | 38                    | 2964                               | 9                    | 702                               |
| 6                  | 4600                                       | 53.3                   | 2452                                | 34.2                  | 1573                               | 9.6                  | 442                               |

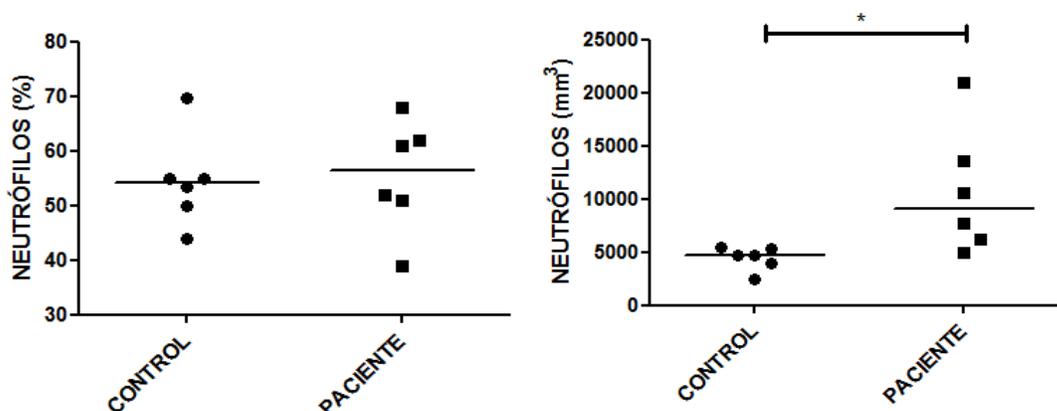
Tabla 44.- Valores porcentuales y absolutos de poblaciones leucocitarias en pacientes de LAD-1.

| Paciente LAD | Leucocitos totales (mm <sup>3</sup> ) | Neutrófilos (%) | Neutrófilos (mm <sup>3</sup> ) | Linfocitos (%) | Linfocitos (mm <sup>3</sup> ) | Monocitos (%) | Monocitos (mm <sup>3</sup> ) |
|--------------|---------------------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------|-------------------------------|---------------|------------------------------|
| 1            | 16000                                 | 39              | 6240                           | 48             | 7689                          | 11            | 1760                         |
| 2            | 14750                                 | 52              | 7670                           | 37             | 54458                         | 5             | 738                          |
| 3            | 11775                                 | 51              | 5005                           | 30             | 3533                          | 14            | 1649                         |
| 4            | 34400                                 | 61              | 20984                          | 17             | 5848                          | 13            | 4472                         |
| 5            | 20000                                 | 68              | 13600                          | 21             | 4200                          | 7             | 1400                         |
| 6            | 17000                                 | 62              | 10540                          | 20             | 3400                          | 5             | 850                          |

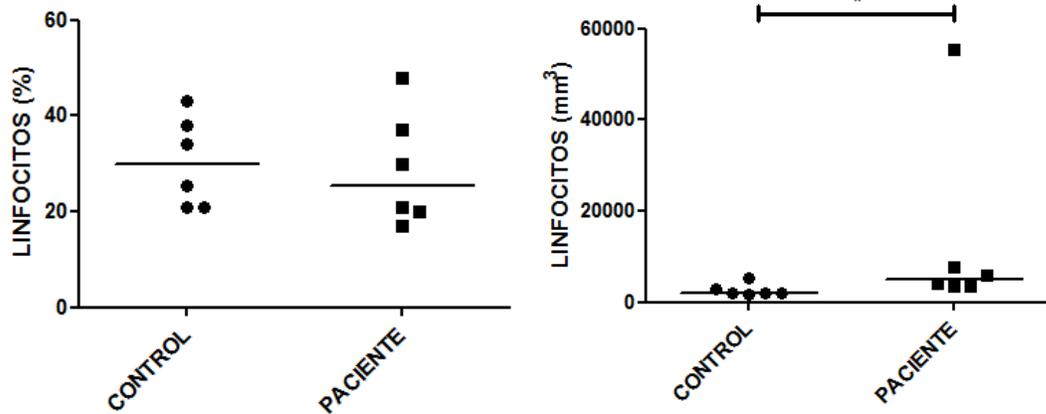
Las Figuras 47, 48, 49 y 50 se muestran los análisis estadísticos de los valores porcentuales y absolutos para las poblaciones leucocitarias, comparando testigos y pacientes de LAD-1:



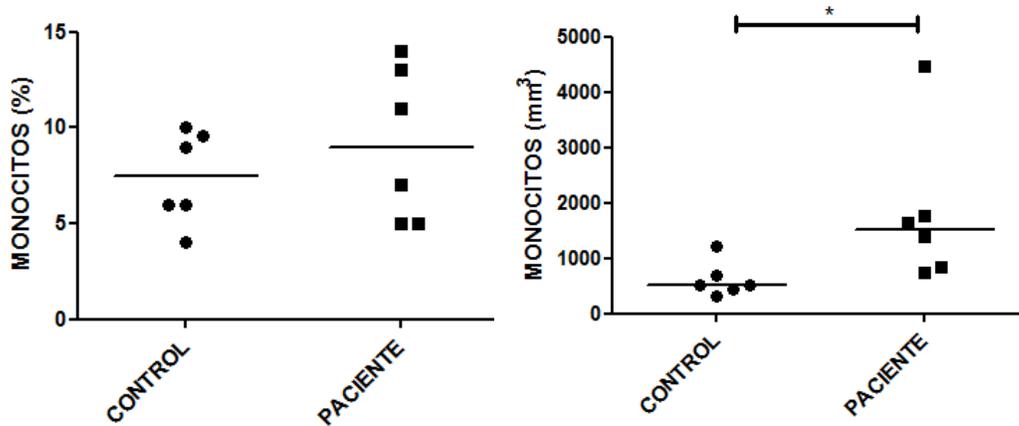
**Figura 47.- Análisis estadístico de los leucocitos totales en controles sanos y pacientes con LAD.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de leucocitos totales en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 48.- Análisis estadístico de neutrófilos en controles sanos y pacientes con LAD.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de neutrófilos en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 49.- Análisis estadístico de linfocitos en controles sanos y pacientes con LAD.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 50.- Análisis estadístico de monocitos en controles sanos y pacientes con LAD.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de monocitos en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .

En las figuras 47, 48, 49 y 50, observamos que existe una diferencia muy significativa con respecto a los valores totales de leucocitos totales, con un valor de  $p = 0.0080$ ; diferencia significativa en valores absolutos de neutrófilos, con un valor de  $p = 0.0129$ ; diferencia significativa en valores absolutos de linfocitos y valores absolutos de monocitos, con valores de  $p = 0.0200$  y  $p = 0.0129$ , respectivamente.

## Poblaciones de linfocitos T, B y células NK

Mediante las mismas técnicas de tinción para citometría de flujo, y los mismos criterios de selección para la elección de poblaciones celulares ya descritas, se determinaron los valores porcentuales y absolutos de las subpoblaciones de linfocitos T en pacientes con LAD-1.

Las Tablas 45 y 46 muestran los valores porcentuales y absolutos de las subpoblaciones de células T en testigos sanos y pacientes respectivamente; para ambas, se consideran normales los valores de referencia de la Tabla 25:

Tabla 45.- Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T y B en testigos sanos.

| <b>Testigo<br/>LAD</b> | <b>Linfocitos T<br/>CD3+ (%)</b> | <b>Linfocitos T<br/>CD3+ (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Linfocitos B<br/>CD19+ (%)</b> | <b>Linfocitos B<br/>CD19 (mm<sup>3</sup>)</b> |
|------------------------|----------------------------------|---|-----------------------------------|---|
| 1                      | 55                               | 1137  | 8                                 | 165   |
| 2                      | 71.4                             | 1751  | 11.7                              | 287   |
| 3                      | 59.1                             | 2273  | 23.9                              | 1115  |
| 4                      | 55                               | 1137  | 8                                 | 165   |
| 5                      | 65.5                             | 1394  | 5                                 | 120   |
| 6                      | 64                               | 1540  | 7.8                               | 188   |

Tabla 46.- Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T y B en pacientes de LAD-1.

| <b>Paciente<br/>LAD</b> | <b>Linfocitos T<br/>CD3+ (%)</b> | <b>Linfocitos T<br/>CD3+ (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Linfocitos B<br/>CD19+ (%)</b> | <b>Linfocitos B<br/>CD19+ (mm<sup>3</sup>)</b> |
|-------------------------|----------------------------------|---|-----------------------------------|--|
| 1                       | 71                               | 5453  | 17                                | 1306   |
| 2                       | 66                               | 3602  | 19                                | 1037   |
| 3                       | 49                               | 1735  | 35                                | 1237   |
| 4                       | 57                               | 3333  | 2                                 | 117  |
| 5                       | 46                               | 2116  | nsd                               | nsd  |
| 6                       | 73                               | 2482  | 12                                | 408  |

Las Tablas 47 y 48 muestran valores porcentuales y absolutos de las poblaciones de células NK en testigos y pacientes, respectivamente, considerándose para ambas los valores de referencia de la Tabla 22:

Tabla 47.- Valores porcentuales y absolutos de células NK en testigos sanos.

| Testigo<br>LAD | Células NK<br>CD16+/56+ (%) | Células NK<br>CD16+/56+ (mm <sup>3</sup> ) |
|----------------|-----------------------------|--|
| 1              | 20                          | 450  |
| 2              | 15.8                        | 388  |
| 3              | 16                          | 615  |
| 4              | 17.2                        | 420  |
| 5              | 22.2                        | 473  |
| 6              | 18                          | 433  |

Tabla 48.- Valores porcentuales y absolutos de células NK en pacientes de LAD-1.

| Paciente<br>LAD | Células NK<br>CD16+56+ (%) | Células NK<br>CD16+56+ (%) |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|
| 1               | 4                          | 307                        |
| 2               | 8                          | 437                        |
| 3               | 5                          | 177                        |
| 4               | 33                         | 1930                       |
| 5               | 11                         | 462                        |
| 6               | 14                         | 476                        |

En las figuras 51, 52 y 53, se observan los análisis estadísticos para las poblaciones de linfocitos T, B y células NK:

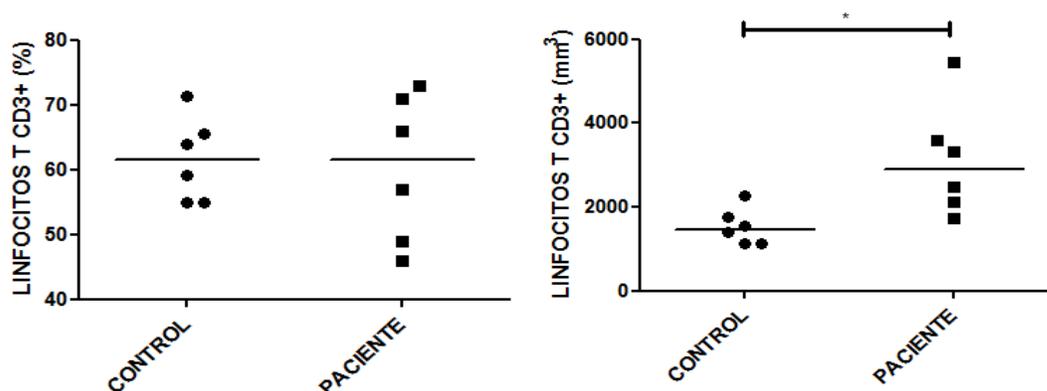
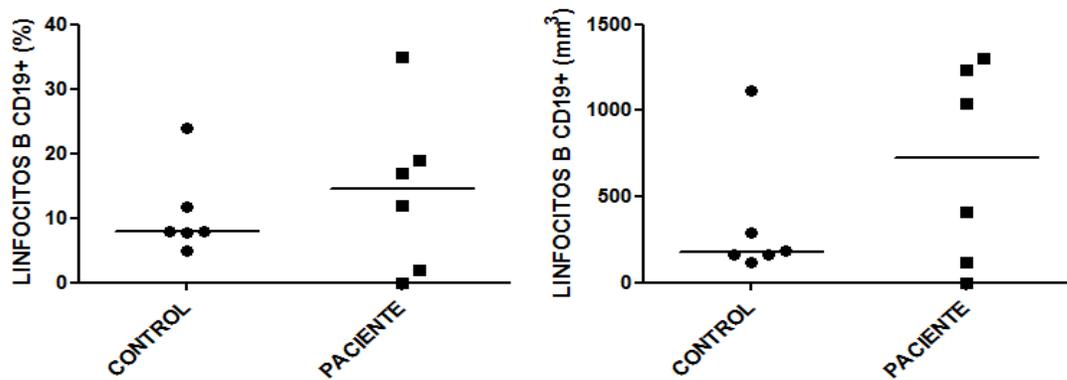
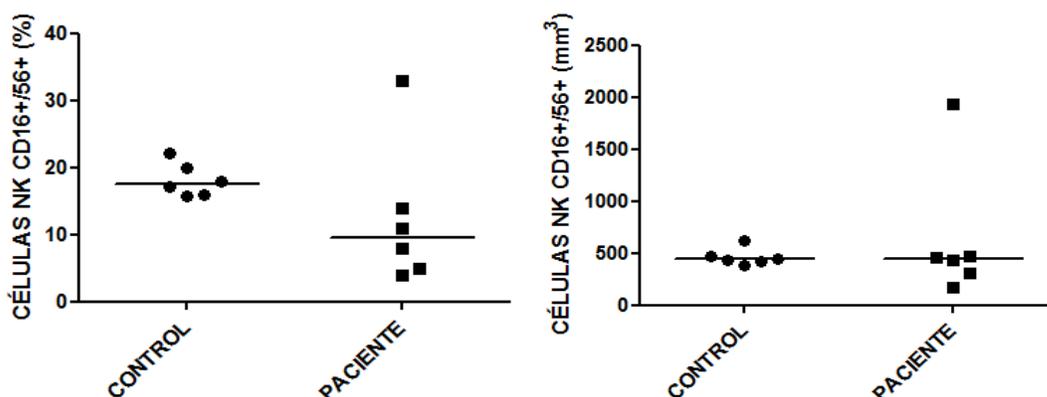


Figura 51.- Análisis estadístico de linfocitos T CD3+ en controles sanos y pacientes con LAD. Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 52.- Análisis estadístico de linfocitos B CD19+ en controles sanos y pacientes con LAD.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos B CD19+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 53.- Análisis estadístico de células NK CD16+56+ en controles sanos y pacientes con LAD.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de células NK CD16+56+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente.

Se observa una diferencia significativa en los valores absolutos de linfocitos T CD3+, con un valor de  $p = 0.0200$ . Las poblaciones de linfocitos B y células NK, no muestran ninguna diferencia significativa a nivel de valores porcentuales ni absolutos.

### Subpoblaciones de linfocitos T

Mediante las mismas técnicas de tinción para citometría de flujo, y los mismos criterios de selección para la elección de poblaciones celulares ya descritas, se determinaron los valores porcentuales y absolutos de las subpoblaciones de linfocitos T para los pacientes de LAD-1.

Las Tablas 49 y 50 muestran los valores porcentuales y absolutos de las subpoblaciones de células T en testigos sanos y pacientes respectivamente; para ambas, se consideran normales los valores de referencia de la Tabla 25:

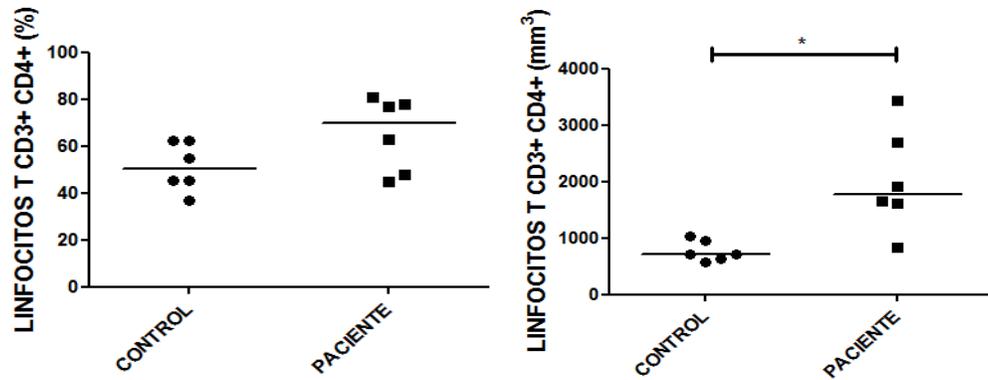
Tabla 49- Valores porcentuales y absolutos de las subpoblaciones de linfocitos T en testigos sanos.

| <b>Testigo</b> | <b>Linfocitos T</b>  | <b>Linfocitos T</b>               | <b>Linfocitos T</b>  | <b>Linfocitos T</b>               |
|----------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| <b>LAD</b>     | <b>CD3+/CD4+ (%)</b> | <b>CD3+/CD4+ (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>CD3+/CD8+ (%)</b> | <b>CD3+/CD8+ (mm<sup>3</sup>)</b> |
| 1              | 62.2                 | 707                               | 29.2                 | 332                               |
| 2              | 54.8                 | 960                               | 41.8                 | 732                               |
| 3              | 45.2                 | 1027                              | 40.5                 | 920                               |
| 4              | 62.2                 | 707                               | 29.2                 | 332                               |
| 5              | 45.5                 | 635                               | 46.8                 | 653                               |
| 6              | 36.6                 | 564                               | 60                   | 924                               |

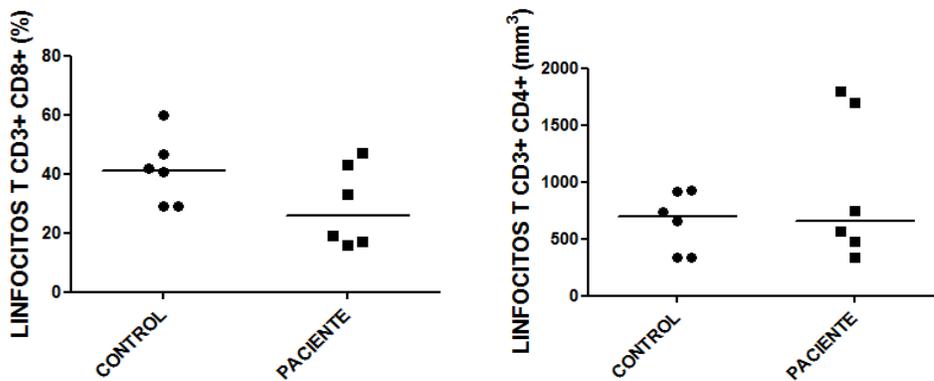
Tabla 50.- Valores porcentuales y absolutos de las subpoblaciones de linfocitos T para pacientes de LAD-1.

| <b>Paciente</b> | <b>Células T CD3+</b> | <b>Células T CD3+</b>        | <b>Células T CD3+</b> | <b>Células T CD3+</b>        |
|-----------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| <b>LAD</b>      | <b>CD4+ (%)</b>       | <b>CD4+ (mm<sup>3</sup>)</b> | <b>CD8+ (%)</b>       | <b>CD8+ (mm<sup>3</sup>)</b> |
| 1               | 63                    | 3435                         | 33                    | 1799                         |
| 2               | 45                    | 1621                         | 47                    | 1693                         |
| 3               | 48                    | 831                          | 43                    | 744                          |
| 4               | 81                    | 2700                         | 17                    | 567                          |
| 5               | 78                    | 1650                         | 16                    | 338                          |
| 6               | 77                    | 1911                         | 19                    | 472                          |

En las figuras 54 y 55 se muestran los análisis estadísticos para las subpoblaciones de linfocitos T:



**Figura 54.- Análisis estadístico de linfocitos T CD3+ CD4+ en controles sanos y pacientes con LAD.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ CD4+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 55.- Análisis estadístico de linfocitos T CD3+ CD8+ en controles sanos y pacientes con LAD.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD3+ CD8+ en controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .

Se observa una diferencia significativa en valores absolutos para la población de linfocitos T CD3+ CD4+, con un valor de  $p = 0.0129$ ; mientras que no se observa ninguna diferencia significativa para los valores porcentuales ni absolutos de la población de linfocitos T CD3+ CD8+.

### Determinación de la expresión de CD18 y CD11b

Para realizar la determinación de estas moléculas de superficie, se realizó una tinción triple, que constó de los siguientes anticuerpos monoclonales: Anti-CD18/PerCP, Anti-CD11b/FITC y Anti-CD14/APC. El análisis de resultados se muestra en la Figura 56:

Determinación de la expresión de CD18 , CD11b

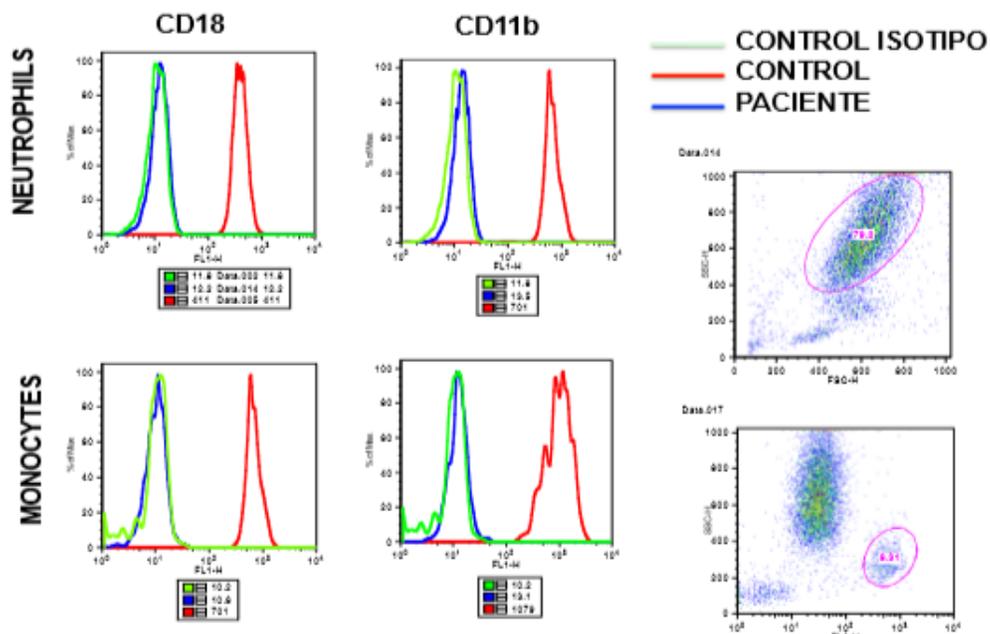


Figura 56.- Análisis de citometría de flujo para la determinación de CD18 y CD11b.

En las Tablas 51 y 52, se muestran los resultados de la determinación de CD18 y CD11b Obtenidas en unidades de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF):

Tabla 51.- Valores de Intensidad Media de Fluorescencia para la determinación de las moléculas CD18 y CD11b en testigos sanos.

| No. Testigo | CD18 en Neutrófilos IMF | CD11b en Neutrófilos IMF | CD18 en Monocitos IMF | CD11b en Monocitos IMF |
|-------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1           | 1525                    | 142                      | 1260                  | 177                    |
| 2           | 924                     | NSD                      | 240                   | NSD                    |
| 3           | 507                     | 141                      | 540                   | 334                    |
| 4           | NSD                     | NSD                      | 1290                  | 154                    |
| 5           | 1447                    | NSD                      | 2299                  | NSD                    |
| 6           | 870                     | 900                      | 115                   | 1309                   |

Tabla 52.- Valores de Intensidad Media de Fluorescencia para la determinación de las moléculas CD18 y CD11b en pacientes de LAD-1.

| No. Paciente | CD18 en Neutrófilos IMF | CD11b en Neutrófilos IMF | CD18 en Monocitos IMF | CD11b en Monocitos IMF |
|--------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1            | 404                     | 28                       | 857                   | 114                    |
| 2            | 671                     | NSD                      | 178                   | NSD                    |
| 3            | 381                     | 151                      | 544                   | 117                    |
| 4            | NSD                     | NSD                      | 1064                  | 102                    |
| 5            | 160                     | NSD                      | 424                   | NSD                    |
| 6            | 4                       | 35                       | 3                     | 43                     |

En las Figuras 57 y 58 se observan los análisis estadísticos de la determinación de CD18 y CD11b:

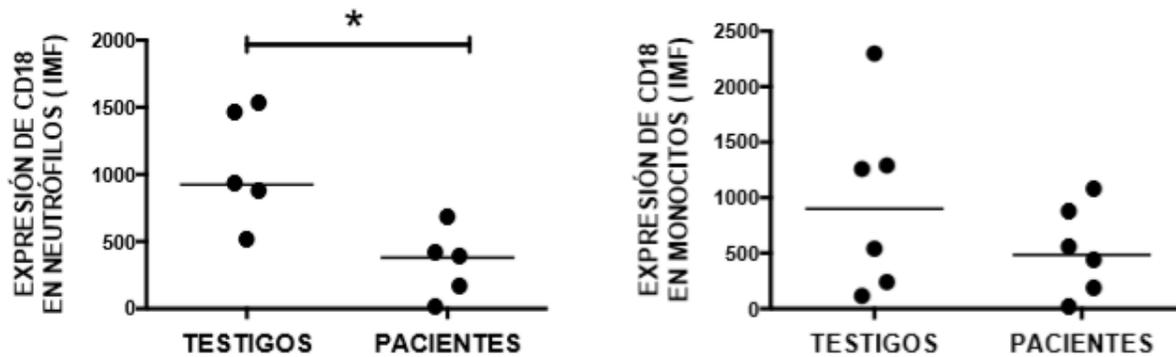
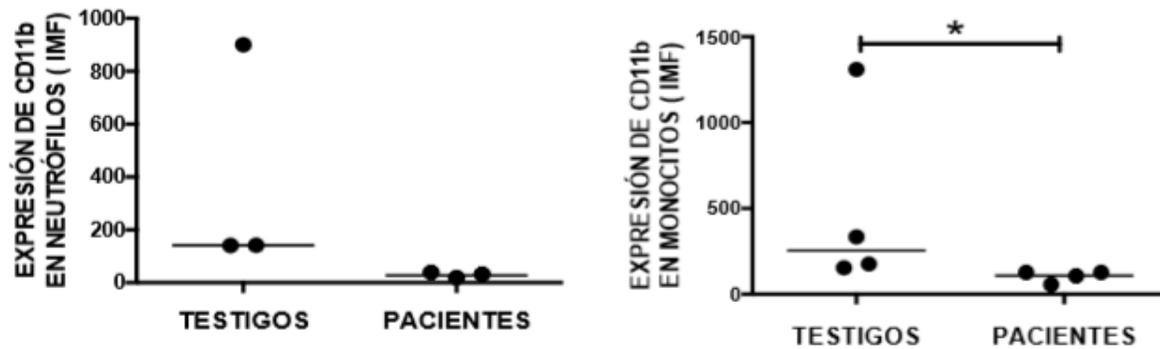


Figura 57.- Análisis estadístico de la determinación de CD18 en monocitos de controles sanos y pacientes con LAD. Análisis en valores porcentuales y absolutos de la determinación de CD18 en monocitos de controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .



**Figura 58.- Análisis estadístico de la determinación de CD11b en monocitos de controles sanos y pacientes con LAD.** Análisis en valores porcentuales y absolutos de la determinación de CD11b en monocitos de controles sanos y pacientes mediante la prueba U-Mann Whitney. La línea negra representa la mediana correspondiente. (\*) Diferencia significativa,  $p < 0.05$ ; (\*\*) muy significativa,  $p < 0.01$ ; y (\*\*\*) altamente significativa,  $p < 0.001$ .

En las Figuras 57 y 58, observamos que existe una diferencia significativa para los valores porcentuales de la determinación de CD18, con un valor de  $p = 0.0159$ ; no se encuentra diferencia para los valores absolutos. También se encontró una diferencia significativa para los valores absolutos de la determinación de CD11b, con un valor de  $p = 0.0286$ .

## 8. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron las características clínicas, moleculares y manifestaciones inmunológicas correspondientes a 3 diferentes inmunodeficiencias primarias: la Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID) con un grupo de estudio de 9 pacientes; Síndrome de Híper IgM (SHIGM), con un grupo de estudio de 9 pacientes; y Déficit de Adhesión Leucocitaria tipo I (LAD-I), con un grupo de estudio de 6 pacientes. El diagnóstico clínico de las inmunodeficiencias SCID y SHIGM, se basa principalmente en la historia clínica de los pacientes, de los que se subrayan las infecciones recurrentes en las vías respiratorias. Para la inmunodeficiencia LAD, los datos clínicos que conducen al diagnóstico, son principalmente leucocitosis y retraso en la separación del cordón umbilical (bibliografía).

### **Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID)**

Las manifestaciones clínicas de mayor frecuencia en el grupo de estudio, fueron: neumonía (67%), gastroenteritis (33%) y sepsis (33%); otras manifestaciones clínicas como candidiasis, bronquitis, infección por CMV y EBV, se presentan con un porcentaje de 11.11%. Se sabe que, la única esperanza en contra de la agresiva gama de manifestaciones (y de la letalidad

a edades tempranas) de esta IDP, está en la realización del diagnóstico antes de la aparición de infecciones graves, así como también en la terapia de reconstitución inmunológica mediante el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas; o inclusive, terapia génica (47, 48).

La media de edad se encuentra en los 4 meses, lo que indica que a muy temprana edad, los pacientes de SCID desarrollan las graves manifestaciones clínicas que la caracterizan. El SCID se define como una inmunodeficiencia primaria caracterizada por un bajo nivel o ausencia de linfocitos T funcionales, que puede acompañarse de poblaciones disminuidas de linfocitos B o células NK. Este conjunto de rasgos fenotípicos, desemboca finalmente en una ausencia de respuesta inmune adaptativa (6, 9).

Se analizaron los porcentajes y valores absolutos de las poblaciones celulares: neutrófilos, monocitos y linfocitos; de éstos últimos se analizaron las poblaciones de linfocitos B y T, así como las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T. De los 9 pacientes que conformaron el grupo de estudio para esta inmunodeficiencia, se observó que únicamente 5 pacientes (pacientes 1, 4, 7, 8 y 9) registraron valores séricos dentro del rango de valores de referencia para los neutrófilos; sólo un paciente (paciente 4) mostró valores de linfocitos dentro del rango de los valores de referencia, mientras que los 8 pacientes restantes registraron valores inferiores a la referencia. En cuanto a los valores de monocitos, únicamente dos pacientes (pacientes 4 y 8) mostraron valores por encima del rango de referencia de dicha población leucocitaria, el resto del grupo de estudio, se mostró dentro del rango.

Para las poblaciones de linfocitos T, se observó que, todos los pacientes de SCID registraron valores por debajo del rango de referencia, sin excepción. De la misma manera, las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ y las células NK, también tienen en todos los casos valores por debajo del rango de referencia, mientras que para la población de linfocitos B, tres de los pacientes (pacientes 2, 5 y 9) mostraron valores séricos dentro del rango de referencia para linfocitos B; el paciente 4, registró un valor superior al rango de referencia y, el resto de pacientes, se encontró con niveles por debajo de la referencia para linfocitos B.

Con esta información, y tras el análisis estadístico, se observaron diferencias significativas para las poblaciones leucocitarias siguientes: linfocitos (a nivel porcentual y absoluto), con valores de  $p= 0.0054$  y  $p= 0.0028$  respectivamente; porcentaje de neutrófilos, con un valor de  $p= 0.0422$ ; porcentaje y valores absolutos de linfocitos T, con valores de  $p= 0.0002$  y  $p<0.0001$  respectivamente; porcentaje de linfocitos B con un valor de  $p= 0.0003$ ; valores

absolutos de células NK, con un valor de  $p= 0.0040$ ; porcentaje y valor absoluto de linfocitos T CD3+ CD4+, con valores de  $p= 0.0078$  y  $p<0.0001$  respectivamente; y valores absolutos de linfocitos T CD3+ CD8+, con un valor de  $p<0.0001$ .

Las observaciones fenotípicas anteriormente descritas, son altamente relacionables con el tipo de SCID de interés para el estudio realizado, es decir, SCID ligado al X asociado con una deficiencia en la cadena  $\gamma c$  del receptor de IL-2. Dicha relación se basa en la observación de poblaciones disminuidas de linfocitos T circulantes en todos los pacientes, que además también muestran, en todos los casos, una disminución de las células NK en circulación. Así mismo, 5 de los 9 pacientes del grupo de estudio, también mostraron disminución en los valores de linfocitos B en circulación. La información con la que se ha contrastado, sugiere que no siempre existe una disminución de células B y NK para este tipo específico de SCID, sin embargo, la disminución de células NK es mucho más frecuente en los pacientes confirmados (47).

Fue incluso antes de la caracterización genética de esta patología que se reconoció que alrededor del 50% de los casos de SCID en varones corresponden a mutaciones en este gen, con consecuencias tales como la alteración de la vía de señalización de las interleucinas, principalmente causado por la falta del estímulo proveniente de la IL-7 en el desarrollo de precursores de linfocitos T desde el timo (48). Adicionalmente, la baja población de células NK también encuentra su explicación por alteraciones en la vía de señalización de IL-15, necesario para su desarrollo (48). Como se mencionó ya en la introducción de este trabajo, la cadena gamma común se denomina de esta forma debido a que es compartida por varios receptores, y dentro de cada uno de ellos, se asocia a cadenas específicas para cada señalización, mejorando su afinidad y, en consecuencia, la señalización necesaria para cada estirpe celular.

En cuanto a lo observado para las subpoblaciones de linfocitos T, se debe tomar en cuenta que no sólo una alteración en la unión de ciertas citocinas es la consecuencia de la mutación en el gen IL2RG; esta mutación también puede derivar en alteraciones de la interacción intracelular con la cinasa de *Janus 3* (JAK3), que, además de contribuir al fenotipo característico (T-B+NK-), también se engloba dentro de la serie de alteraciones del eje IL-7R/ $\gamma c$ /JAK3, en donde el desarrollo de los linfocitos T en pacientes, se detiene en el estadio doble negativo (CD4-CD8-) del linfocito, el cual corresponde a la etapa previa al rearreglo del

gen del TCR. Por esta razón, se observa también un fenotipo de expresión baja en las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ (48, 49).

En cuanto a las mutaciones propuestas mediante la técnica de secuenciación masiva, que fueron proporcionadas previo a la realización del presente trabajo, y que fueron corroboradas para dos de los pacientes que conformaban el grupo de estudio, se encontró, para el primero de ellos (P1), la mutación sugerida por secuenciación masiva correspondiente a una delección de timina en la posición 1015 del DNA codificante, proveniente del exón 7 (c.T1015d). Dicha información, al compararse contra la base de datos que proporciona Ensembl gene (<https://www.ensembl.org/>), deriva en un cambio de aminoácido de serina a arginina en la posición 308 a nivel de proteína (p.S308R). Dicho cambio tiene su traducción, dentro de las características químicas de cada aminoácido, a la sustitución de un aminoácido polar sin carga a un aminoácido polar con carga negativa. Dicho cambio puede conducir a alteraciones en la conformación final de la cadena gamma común, sin embargo, se precisan de estudios donde se observe la expresión de la cadena en este paciente para hablar del efecto fenotípico consecuencia de la mutación ya mencionada.

Para el paciente 2 (P2), la mutación sugerida en la información previa, se localizaba también dentro del exón 7, pero en una posición distinta a la anterior. Se corroboró dicha mutación, hallándose una transición de citosina por guanina en la posición 957 del DNA codificante (c.C957G). Tras una comparación similar con la base de datos utilizada para la mutación del paciente 1, se identificó un cambio de arginina por glicina en la posición 289 a nivel de proteína (p.R289G), lo que se traduce al cambio de un aminoácido polar con carga positiva a un aminoácido polar sin carga. De la misma manera que en el caso anterior, se precisa de un estudio de expresión de la cadena gamma común para conocer los efectos de esta mutación en el fenotipo del paciente.

A lo largo de la historia de esta patología, y, a partir del diagnóstico molecular asociado al gen IL2RG, se han descrito más de 300 mutaciones que derivan en esta condición. Se sabe que la mayoría de estas mutaciones, corresponden a cambios muy pequeños dentro de la secuencia original, es decir, que corresponden a cambios en uno o muy pocos nucleótidos, dentro de los 8 exones de que consta dicho gen. En términos generales, los cambios presentes en la secuencia original provocan la expresión de una proteína no funcional o, en el peor de los escenarios, a una completa ausencia de la expresión de la cadena  $\gamma$ c (25). Recordemos que la cadena  $\gamma$ c, forma parte de una familia de receptores triméricos, cuya

afinidad de unión con el sustrato está en función de las cadenas presentes al momento de la asociación. La cadena  $\gamma$ c, es parte indispensable para que los receptores de múltiples citocinas, presenten una afinidad de media a alta, con lo que es más prolongado el tiempo de unión a sustrato y la disociación de esta unión es más complicada; este conjunto de factores es esencial para la posterior cadena de señalización necesaria para cada una de las estirpes celulares que dependen de esta vía.

Siendo considerada la técnica estándar para la validación de resultados mediante la secuenciación masiva, la secuenciación Sanger, constituye un pilar del diagnóstico molecular de múltiples patologías; para fines de este estudio, el diagnóstico molecular de SCID en pacientes pediátricos.

### **Síndrome de Híper IgM ligado al X (SHIGM)**

Con un grupo de estudio de 9 pacientes también, las manifestaciones clínicas de mayor frecuencia para esta IDP fueron: infecciones de vías respiratorias (100%), neumonía (70%), sepsis (30%) y diarrea crónica (23%). La edad promedio de los pacientes es de 4 años, lo que nos permite observar que, a pesar de desarrollar los cuadros clínicos a temprana edad, los pacientes de SHIGM tienen una esperanza de vida superior a la de los pacientes de SCID, IDP de mayor agresividad.

Definida como una IDP cuya característica principal es la de mostrar valores séricos normales o elevados de la inmunoglobulina IgM en ausencia o valores muy disminuidos del resto de inmunoglobulinas circulantes, atribuidos a mutaciones en el gen CD40L, codificante para la proteína del mismo nombre, localizada en linfocitos T activados y cuya interacción con su receptor es de vital importancia para la generación de toda la gama de inmunoglobulinas circulantes (50). En los pacientes analizados, se observó que 3 de ellos (pacientes 1, 2 y 4) tienen valores séricos por debajo del rango de referencia para el isotipo IgM. El paciente 3 (P3), cuya muestra completó la metodología, cuenta con valores séricos dentro de los rangos de referencia para los tres isotipos de inmunoglobulinas estudiados, fenotipo que se analizará más adelante. Otros pacientes con valores séricos dentro del rango para esta inmunoglobulina, fueron los pacientes 7 y 8. Los pacientes 5, 6 y 9, registraron valores ligeramente por encima del rango de referencia.

Para la inmunoglobulina IgG, 5 pacientes (pacientes 1, 2, 4, 5 y 6) mostraron valores por debajo del rango de referencia de este isotipo, mientras que los pacientes 3, 7, 8 y 9, registraron valores dentro del rango de referencia. En cuanto al isotipo de IgA, los pacientes

3 y 9, registraron valores dentro del rango de referencia, mientras que el resto de los pacientes del grupo de estudio, registraron valores inferiores al rango. La causa a la que se atribuye el fenotipo característico ya mencionado de esta IDP, es que las células B naive en circulación, expresan inmunoglobulinas de membrana IgM e IgD, pero son incapaces de llevar a cabo el proceso de cambio de isotipo que da origen al resto de inmunoglobulinas (51). Para los resultados obtenidos del estudio de poblaciones leucocitarias, se observó una diferencia significativa en los porcentajes de neutrófilos ( $p=0.0168$ ); porcentajes de linfocitos ( $p= 0.0419$ ); porcentaje de linfocitos B CD19+ ( $p= 0.0008$ ) y porcentaje de células NK ( $p= 0.0171$ ). Los valores disminuidos de las poblaciones celulares mencionadas, son comunes, de acuerdo con lo descrito en estudios ya publicados, cuando los pacientes de SHIGM cursan con un cuadro de neutropenia (52), aunque la etiología es desconocida. Una hipótesis sostiene que probablemente exista una interacción entre la proteína CD40L anormal, con células estromales, lo que podría impactar en la síntesis adecuada de factores de crecimiento de granulocitos (53).

La población de linfocitos T CD3+, no mostró diferencia significativa entre testigos y pacientes, a nivel porcentual ni de valores absolutos, en ninguno de los pacientes del grupo de estudio. De la misma manera, las subpoblaciones de estos linfocitos, tampoco mostraron diferencias significativas en porcentajes ni valores absolutos.

La proteína CD40L, que se encuentra en la superficie de linfocitos T activados, interacciona con su receptor CD40, ubicado en la superficie de células dendríticas, monocitos, neutrófilos y en linfocitos B, con el propósito de inducir la activación de esta última población de linfocitos, y así conducir el cambio de isotipo y la hipermutación somática; dos mecanismos por los cuales, un linfocito B será capaz de producir el resto de inmunoglobulinas de circulación (29).

Los resultados de las subpoblaciones de células B, muestran diferencia significativa en los porcentajes de células B naive ( $p= 0.0014$ ); células B de memoria sin cambio de isotipo ( $p= 0.0004$ ); células B de memoria con cambio de isotipo ( $p= 0.0004$ ) y células b de memoria total ( $p= 0.0004$ ). Los valores absolutos de células B con cambio de isotipo y de las células B de memoria total, también mostraron diferencias significativas, con valores de  $p= 0.0004$  y  $p= 0.0169$ , respectivamente. Las poblaciones de plasmablastos y células transicionales no mostraron ninguna diferencia significativa a nivel porcentual o de valores absolutos, entre testigos sanos y pacientes de SHIGM.

Los resultados anteriores pueden explicarse mediante el conocimiento de que la alteración en la formación de centros germinales ocasionada por defectos en la proteína CD40L, resultan en el deterioro del desarrollo de las células de memoria con cambio de isotipo (54).

La gran mayoría de las fuentes consultadas, correlacionan las observaciones fenotípicas de pacientes con SHIGM a las alteraciones en la proteína CD40L, mediante múltiples mecanismos.

En cuanto a los resultados referentes al análisis molecular del gen CD40L, se corroboraron las mutaciones (mediante análisis de secuenciación) que habían sido sugeridas previamente gracias a la técnica de secuenciación masiva (que, de la misma manera que para los pacientes de SCID, fue proporcionada al servicio de la UIID previo a la realización de este estudio). Las mutaciones en tres pacientes fueron identificadas tras el análisis de secuenciación, los pacientes 1 y 2 (que son familiares) contaban con información de secuenciación que ubicaba a la mutación dentro del exón 4 de *CD40L* para ambos pacientes, es decir, la misma mutación, en la misma posición y con el mismo efecto. El paciente 3, no contaba con la sugerencia de una localización de la mutación, de la misma manera que con los otros pacientes del grupo de estudio, sino que formaba parte de un estudio previamente realizado donde, por antecedentes familiares de su madre y hermano, se presumía que presentaba el mismo cambio en la secuencia del exón 3, con los mismos efectos fenotípicos. Parte del estudio mencionado para este paciente, se explicó ya dentro de la discusión de resultados al decir que este paciente contaba con valores séricos dentro de los rangos de referencia para las tres inmunoglobulinas estudiadas.

Los pacientes 1 y 2, mostraban una mutación puntual de una citosina por una adenina en la posición 368 del DNA codificante (c.368C>A), cuyo efecto a nivel de proteína era el cambio de alanina por ácido glutámico en la posición 123 del producto (p.A123E), que se traduce al cambio de un aminoácido hidrofóbico no polar por un aminoácido polar con carga negativa. Se corroboró, junto con que la misma mutación coincide con ambos pacientes, que es la misma descrita mediante secuenciación masiva. Estudios conjuntos de expresión de CD40L, ayudarían a develar el efecto fenotípico provocado por el mencionado cambio molecular.

Los antecedentes del paciente 3 coincidieron con lo corroborado tras el análisis de secuenciación realizado en este estudio, es decir, se encontró el mismo cambio de secuencia que presentaban la madre y hermano del paciente dentro del exón 3 (53). Dicho cambio corresponde a la delección de cuatro bases nitrogenadas, de la posición 359 a la 362, a nivel

de DNA codificante (c.359\_362delCAA), lo que genera un cambio en el marco de lectura y la aparición de un codón de paro prematuro en el aminoácido 126 (p.N101\*126). La mutación reportada para el paciente 3, tiene la particularidad de que la expresión de la proteína no se ve afectada. Como ya se mencionó, se produce un cambio en el marco de lectura que induce la formación de un codón de paro prematuro en el dominio ECU, lo que, fenotípicamente se refleja como una proteína trunca aunque detectable mediante el uso de diferentes anticuerpos, pero afectada en su funcionalidad, por lo que no puede inducir la proliferación de las células B (50). Estos resultados demuestran la gran importancia de efectuar un diagnóstico molecular completo para desechar o aceptar la hipótesis de una IDP, puesto que sienta el precedente de una observación de fenotipo de expresión normal de inmunoglobulinas aun cuando los valores bajos de IgM, constituyen la principal evidencia que lleva a sospechar de SHIGM (50).

### **Déficit de Adhesión Leucocitaria tipo 1 (LAD-1)**

El grupo de estudio de esta IDP, constó de 6 pacientes, y a diferencia de las dos inmunodeficiencias anteriores, cuenta con 5 pacientes femeninos y 1 paciente masculino. Las manifestaciones clínicas más frecuentes dentro del grupo de estudio fueron: leucocitosis, infecciones necrosantes de tejidos blandos y retraso en la separación del ombligo, todas con 100% de frecuencia, así como neumonía y sepsis, ambas con 33% de frecuencia.

Ninguno de los pacientes supera los 12 meses de edad, por lo que observamos también que las manifestaciones clínicas severa se presentan a edad temprana en los pacientes de esta IDP.

Se define como un grupo de afecciones caracterizado por fallas en los procesos de adhesión de leucocitos al endotelio. En la infancia, comienza a manifestarse en la forma de leucocitosis graves e infecciones recurrentes (34). Se distinguen tres tipos de esta IDP. LAD-1 es un trastorno asociado a mutaciones en el gen ITGB2, codificante para la cadena común  $\beta_2$  de la integrina (conocida también como CD18). Un alto porcentaje de las mutaciones descritas para CD18, se ve reflejado en el dominio extracelular de la proteína (34).

El análisis de poblaciones leucocitarias mostró, como ya fue mencionado, leucocitosis para todos los pacientes del grupo de estudio. Evidentemente, se encontraron diferencias significativas para los leucocitos totales ( $p= 0.0080$ ); valores absolutos de neutrófilos ( $p= 0.0129$ ); valores absolutos de linfocitos ( $p= 0.0200$ ); de monocitos ( $p= 0.0129$ ); linfocitos T

CD3+ ( $p= 0.0200$ ); linfocitos T CD3+ CD4+ ( $p= 0.0129$ ); diferencia significativa en el porcentaje de CD18 ( $p= 0.0159$ ); y en el valor absoluto de CD11b ( $p= 0.0286$ ).

Para los valores de linfocitos, sólo uno de los pacientes (paciente 2) mostró valores por encima del rango de referencia, mientras que los 5 pacientes restantes registraron valores ubicados dentro del rango de referencia.

Caso contrario fue el observado para las poblaciones de neutrófilos, donde únicamente un paciente (paciente 3), registró valores dentro del rango de referencia para dicha población, mientras que el resto del grupo de estudio mostró valores por encima de dicho rango. Dos pacientes mostraron valores dentro del rango de referencia en el análisis de monocitos (pacientes 2 y 6), mientras que los cuatro pacientes restantes registraron valores por encima del rango de referencia.

El paciente 3 fue el único en registrar un valor por debajo del rango de referencia en cuanto a la población de linfocitos T, mientras que los demás pacientes registraron valores dentro del rango. En cuanto a linfocitos B, tres pacientes (1, 2 y 3) registraron valores dentro del rango de referencia, mientras que los otros tres pacientes (4, 5 y 6), registraron valores por debajo de dicho rango.

El paciente 4 fue el único en registrar valores por encima del rango de referencia en cuanto a células NK, mientras que los 5 pacientes restantes registraron valores dentro del rango. En las subpoblaciones de linfocitos T, el paciente 3 registró un valor debajo del rango de referencia en células T CD3+CD4+; el resto de pacientes registró valores dentro del rango de referencia. El paciente 1, mostró valores por encima del rango de referencia para las células T CD3+CD8+, mientras que los pacientes 5 y 6, mostraron valores por debajo del rango; los pacientes 2, 3 y 4, mostraron valores dentro del rango.

En cuanto a la expresión de CD18 y CD11b, es importante para orientar el diagnóstico de una IDP de LAD-1. Hubo dos pacientes con la expresión de CD18 y CD11b casi nula; los otros pacientes tuvieron baja expresión. La mayoría de los pacientes con LAD-1 no expresan CD18, por lo que esta tinción es de gran ayuda al diagnóstico; sin embargo, en los últimos años se ha visto pacientes con LAD y una baja expresión de CD18 y CD11b (37). Por esta razón, lo que siempre es importante el diagnóstico definitivo que nos da la búsqueda de la mutación por las técnicas de biología molecular.

En la mayoría de los casos, análisis de secuenciación para los exones del gen ITGB2, pueden revelar y ayudar en el diagnóstico molecular de esta patología, ya que el diagnóstico

clínico está principalmente basado en las manifestaciones clínicas y la marcada leucocitosis, tal y como se pudo observar en nuestro grupo de estudio.

Debido a múltiples factores que acortaron la disponibilidad de tiempo de trabajo, no se pudo llevar a cabo la sección de la metodología que comprende las técnicas de biología molecular, por lo que los resultados presentes sólo pueden contribuir al diagnóstico clínico mediante la comparación de la manifestación de síntomas y los estudios por citometría de flujo.

## Conclusiones:

- A los pacientes con IDP's del tipo SCID gamma común, SHIGM y LAD; es necesario realizarles el estudio fenotipico de sus poblaciones leucocitarias para orientar el diagnóstico de la Inmunodeficiencia.
- La mayoría de los pacientes con SCID tienen decremento profundo de sus poblaciones de células T, que corrobora con infecciones graves con patógenos oportunistas.
- La mutaciones en los dos pacientes con SCID estuvieron localizadas en el exón 7; el paciente 1 c.T1015d, p.S308R y el paciente 2 c.C957G; estas mutaciones ya están reportadas.
- Los pacientes con SHIGM tienen problemas con la diferenciación de células B de memoria con cambio de isotipo y eso se debe a los defectos de la proteína CD40L, la cual se expresa en células T y esta célula colabora con la célula B para que prolifere y pueda diferenciarse a célula B de memoria y células plasmáticas.
- Se encontraron 2 mutaciones en tres pacientes; dos pacientes estan relacionados y el tercero no. El paciente 1 y 2 tuvieron la mutación c.368C>A, p.A123E ; esta mutación ya está reportada. En el paciente 3 su mutación fue c.359\_362delCAAA; p.N101\*126; la cual fue reportada por primera vez en su hermano.
- Los pacientes con LAD-1 tienen una expresión baja o nula de las proteínas CD18 y CD11b. Esta determinación orienta el diagnóstico, pero para un diagnóstico definitivo es necesario el análisis molecular; con el fin de encontrar la mutación que explique el fenotipo clínico.

## **I. PERSPECTIVAS**

- Realizar estudios de expresión de la cadena gamma común en los pacientes de SCID donde se corroboraron las mutaciones.
- Realizar estudios funcionales en todos los pacientes donde se corroboraron las mutaciones en SCID e SHIGM).
- Completar la metodología con las muestras de los pacientes de LDA.1 para identificar las mutaciones dentro del gen ITGB2.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Hernandez-Martinez C, Espinosa-Rosales F, Espinosa-Padilla SE, Hernandez-Martinez AR, Blancas-Galicia L. [Basics of primary immunodeficiencies]. *Revista alergía Mexico*. 2016;63(2):180-9.
2. McCusker C, Upton J, Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2018;14(Suppl 2):61.
3. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *Journal of clinical immunology*. 2018;38(1):96-128.
4. Abolhassani H, Rezaei N, Mohammadinejad P, Mirminachi B, Hammarstrom L, Aghamohammadi A. Important differences in the diagnostic spectrum of primary immunodeficiency in adults versus children. *Expert review of clinical immunology*. 2015;11(2):289-302.
5. Pandolfi F, Cianci R, Cammarota G, Pagliari D, Landolfi R, Conti P, et al. Recent insights in primary immunodeficiency diseases: the role of T-lymphocytes and innate immunity. *Annals of clinical and laboratory science*. 2010;40(1):3-9.
6. Fischer A. Human primary immunodeficiency diseases. *Immunity*. 2007;27(6):835-45.
7. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S182-94.
8. Costa-Carvalho B, Gonzalez-Serrano M, Espinosa-Padilla S, Segundo G. Latin American challenges with the diagnosis and treatment of primary immunodeficiency diseases. *Expert review of clinical immunology*. 2017;13(5):483-9.
9. Aloj G, Giardino G, Valentino L, Maio F, Gallo V, Esposito T, et al. Severe combined immunodeficiencies: new and old scenarios. *International reviews of immunology*. 2012;31(1):43-65.
10. Pesu M, Candotti F, Husa M, Hofmann SR, Notarangelo LD, O'Shea JJ. Jak3, severe combined immunodeficiency, and a new class of immunosuppressive drugs. *Immunological reviews*. 2005;203:127-42.
11. Sillevs Smitt JH, Wulffraat NM, Kuijpers TW. The skin in primary immunodeficiency disorders. *European journal of dermatology : EJD*. 2005;15(6):425-32.

12. Pike-Overzet K, van der Burg M, Wagemaker G, van Dongen JJ, Staal FJ. New insights and unresolved issues regarding insertional mutagenesis in X-linked SCID gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2007;15(11):1910-6.
13. Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene*. 2000;19(49):5662-79.
14. Kobrynski LJ. Combined immune deficiencies in children. *Journal of infusion nursing : the official publication of the Infusion Nurses Society*. 2006;29(4):206-13.
15. van der Burg M, Gennery AR. Educational paper. The expanding clinical and immunological spectrum of severe combined immunodeficiency. *European journal of pediatrics*. 2011;170(5):561-71.
16. Leonard WJ. The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: defective cytokine receptor signaling. *Annual review of medicine*. 1996;47:229-39.
17. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(7):480-90.
18. Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*. 2010;33(2):153-65.
19. Justiz Vaillant AA, Mohseni M. Severe Combined Immunodeficiency. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2019.
20. Johnston JA, Bacon CM, Riedy MC, O'Shea JJ. Signaling by IL-2 and related cytokines: JAKs, STATs, and relationship to immunodeficiency. *Journal of leukocyte biology*. 1996;60(4):441-52.
21. Voss SD, Hong R, Sondel PM. Severe combined immunodeficiency, interleukin-2 (IL-2), and the IL-2 receptor: experiments of nature continue to point the way. *Blood*. 1994;83(3):626-35.
22. Buckley RH. Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annual review of immunology*. 2004;22:625-55.
23. Gaspar HB, Gilmour KC, Jones AM. Severe combined immunodeficiency--molecular pathogenesis and diagnosis. *Archives of disease in childhood*. 2001;84(2):169-73.
24. Etzioni A, Ochs HD. The hyper IgM syndrome--an evolving story. *Pediatric research*. 2004;56(4):519-25.
25. Notarangelo LD, Hayward AR. X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (XHIM). *Clinical and experimental immunology*. 2000;120(3):399-405.

26. Davies EG, Thrasher AJ. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. *British journal of haematology*. 2010;149(2):167-80.
27. Lopez-Herrera G. [Lymphocytes B and primary immunodeficiencies]. *Revista alergía Mexico*. 2016;63(1):58-70.
28. Cabral-Marques O, Klaver S, Schimke LF, Ascendino EH, Khan TA, Pereira PV, et al. First report of the Hyper-IgM syndrome Registry of the Latin American Society for Immunodeficiencies: novel mutations, unique infections, and outcomes. *Journal of clinical immunology*. 2014;34(2):146-56.
29. Agematsu K, Nagumo H, Shinozaki K, Hokibara S, Yasui K, Terada K, et al. Absence of IgD-CD27(+) memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(4):853-60.
30. Lee WI, Torgerson TR, Schumacher MJ, Yel L, Zhu Q, Ochs HD. Molecular analysis of a large cohort of patients with the hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome. *Blood*. 2005;105(5):1881-90.
31. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *Journal of leukocyte biology*. 2000;67(1):2-17.
32. Qamar N, Fuleihan RL. The hyper IgM syndromes. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2014;46(2):120-30.
33. Notarangelo LD, Lanzi G, Peron S, Durandy A. Defects of class-switch recombination. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(4):855-64.
34. Etzioni A. Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects. *Current opinion in immunology*. 2009;21(5):481-6.
35. Cox DP, Weathers DR. Leukocyte adhesion deficiency type 1: an important consideration in the clinical differential diagnosis of prepubertal periodontitis. A case report and review of the literature. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2008;105(1):86-90.
36. Justiz Vaillant AA, Ahmad F. Leukocyte Adhesion Deficiency. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2019.
37. Yamazaki-Nakashimada M, Maravillas-Montero JL, Berron-Ruiz L, Lopez-Ortega O, Ramirez-Alejo N, Acevedo-Ochoa E, et al. Successful adjunctive immunoglobulin treatment in patients affected by leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1). *Immunologic research*. 2015;61(3):260-8.
38. Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1250:50-5.

39. Hogg N, Bates PA. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2000;19(3):211-22.
40. Barreiro O, Sanchez-Madrid F. Molecular basis of leukocyte-endothelium interactions during the inflammatory response. *Revista espanola de cardiologia*. 2009;62(5):552-62.
41. Evans EA, Calderwood DA. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science*. 2007;316(5828):1148-53.
42. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*. 1998;279(5349):381-4.
43. Nishida N, Xie C, Shimaoka M, Cheng Y, Walz T, Springer TA. Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity*. 2006;25(4):583-94.
44. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *Journal of immunology*. 1986;137(1):245-54.
45. Geiger B, Bershadsky A. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell*. 2002;110(2):139-42.
46. Schenkel AR, Mamdouh Z, Muller WA. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nature immunology*. 2004;5(4):393-400.
47. Lipstein EA, Vorono S, Browning MF, Green NS, Kemper AR, Knapp AA, et al. Systematic evidence review of newborn screening and treatment of severe combined immunodeficiency. *Pediatrics*. 2010;125(5):e1226-35.
48. O'Shea JJ, Husa M, Li D, Hofmann SR, Watford W, Roberts JL, et al. Jak3 and the pathogenesis of severe combined immunodeficiency. *Molecular immunology*. 2004;41(6-7):727-37.
49. Ochs HD, Notarangelo LD. X-linked immunodeficiencies. *Current allergy and asthma reports*. 2004;4(5):339-48.
50. Ramesh N, Morio T, Fuleihan R, Worm M, Horner A, Tsitsikov E, et al. CD40-CD40 ligand (CD40L) interactions and X-linked hyperIgM syndrome (HIGM1). *Clinical immunology and immunopathology*. 1995;76(3 Pt 2):S208-13.
51. Wang LL, Zhou W, Zhao W, Tian ZQ, Wang WF, Wang XF, et al. Clinical features and genetic analysis of 20 Chinese patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Journal of immunology research*. 2014;2014:683160.

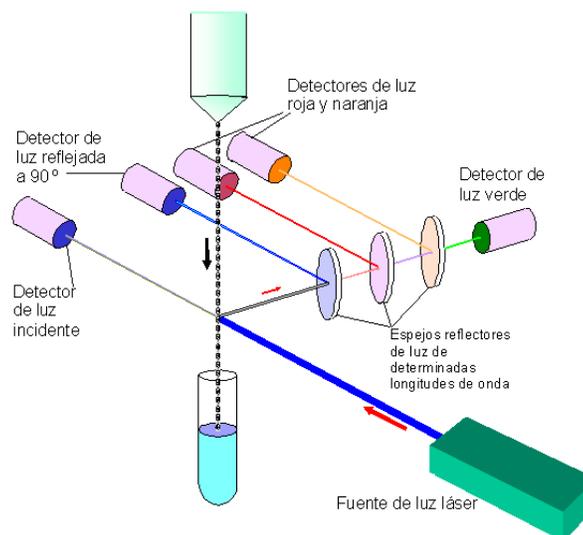
52. Wang WC, Cordoba J, Infante AJ, Conley ME. Successful treatment of neutropenia in the hyper-immunoglobulin M syndrome with granulocyte colony-stimulating factor. *The American journal of pediatric hematology/oncology*. 1994;16(2):160-3.
53. Lopez-Herrera G, Maravillas-Montero JL, Vargas-Hernandez A, Berron-Ruiz L, Ramirez-Sanchez E, Yamazaki-Nakashimada MA, et al. A novel CD40LG deletion causes the hyper-IgM syndrome with normal CD40L expression in a 6-month-old child. *Immunologic research*. 2015;62(1):89-94.

## II. APÉNDICE

### Fundamentos de las técnicas empleadas en la metodología Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico capaz de realizar determinaciones físicas y químicas de partículas en suspensión como células, cromosomas, mitocondrias, núcleos celulares que producen una señal tras su interacción con una fuente emisora de luz y que es registrada por un sistema de detección. Los parámetros celulares que pueden medirse mediante el uso de un citómetro de flujo son el tamaño, la complejidad o forma de las células, así como moléculas de superficie celular que puedan ser sujetas a detección gracias a la unión de anticuerpos marcados con fluorocromos; moléculas que absorben la radiación emitida por la fuente de luz y que producen una señal detectada y registrada para su cuantificación (42).

La citometría de flujo es una técnica que está basada en el paso de células u otras partículas en suspensión que son alineadas y hechas pasar una a la vez frente a un haz luminoso en un punto denominado “punto de interrogación”. Tras el enfrentamiento llevado a cabo en el punto de interrogación, dos tipos de emisiones son reconocidas: la generada por la dispersión de la luz y la generada por la emisión de los fluorocromos. Las señales luminosas son retenidas por filtros que las convierten en impulsos eléctricos y posteriormente amplificadas para ser reconocidos como señales digitales procesadas por un sistema computarizado (42).



Estructura general de un citómetro de flujo.

Un citómetro de flujo consta de componentes como un sistema hidráulico, un sistema óptico y un sistema electrónico.

El sistema hidráulico consiste de un conjunto de controles neumáticos y fluidicos necesarios para establecer un flujo laminar (velocidad y presión constante). Permite el alineamiento de las partículas o células cuyo flujo será roto después, dentro de los separadores celulares, en gotas de un tamaño uniforme para garantizar la separación en células individuales (43).

El sistema óptico se conforma de láseres, filtros, lentes y detectores. Comúnmente la fuente de luz es producida por un láser de gas argón, el cual es refrigerado por aire y produce una luz monocromática de 488 nm. Dicha luz tiene la función de excitar a los fluorocromos y provoca la dispersión de la luz que se traduce en la información de las diferentes características celulares. Un citometro puede contar con 2 o 3 láseres. La fracción del sistema óptico en que quedan agrupados los láseres se conoce como óptica de excitación. La óptica de lectura se compone por los lentes de recolección de luz y el sistema de espejos y filtros para seleccionar las longitudes de onda específicas y guiarlas a los detectores correspondientes (43).

El sistema electrónico es el encargado de recoger y cuantificar los destellos de fluorescencia y dispersión de la luz. Por computadora es que se obtiene la carga electrónica de las gotas que contienen a las células o partículas de interés y que son posteriormente sometidas a deflexión o recolectadas en tubos específicos. La computadora está también encargada del almacenaje de datos de miles de células o eventos por muestra, además de su representación gráfica (43).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Desarrollada en 1985 por el investigador de la Cetus Corporation, Kary Mullis, la Reacción en cadena de la polimerasa o PCR, es una técnica de biología molecular que tiene su fundamento en la replicación del material genético que las células llevan a cabo previo a su división. Mediante el uso de dos oligonucleótidos o primers, diseñados para unirse a las cadenas de DNA en regiones específicas y por complementariedad de bases, los cuales tras su unión son alargados cíclicamente mediante la acción de una DNA polimerasa. La reacción completa se aplica para la síntesis *in vitro* de millones de copias de una región en específico de DNA, ya que la cantidad del material genético de interés aumenta de manera exponencial por cada ciclo (44).

Cada ciclo de una PCR está compuesto por tres etapas correspondientes a tres diferentes temperaturas, temperaturas a las cuales se lleva a cabo un paso distinto de la reacción absoluta. La denominación para cada una de las etapas de los ciclos de la PCR es:

- **Desnaturalización:** en este paso se han de separar las dos cadenas de la muestra de DNA gracias a un aumento de temperatura que puede ir desde los 92 a los 98°C por un tiempo de 30 a 90 segundos.
- **Alineamiento:** en esta etapa, los oligonucleótidos o primers localizan su secuencia complementaria dentro de las cadenas sencillas del DNA que se desnaturalizó en el paso anterior. Existe un primer que reconoce a la cadena en dirección 5'-3' y otro primer que reconoce a la secuencia 3'-5'. Ambos primers, tras su apareamiento, delimitan la región de interés que se pretende amplificar. La temperatura disminuye de 50 a 60°C por un tiempo de 30 a 60 segundos.
- **Extensión:** esta es la etapa donde una DNA polimerasa termoestable extiende la longitud de las secuencias de los primers, originando con esto nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas originales. Se lleva a cabo a una temperatura de entre 70 y 74°C por un tiempo promedio de 30 a 90 segundos.

Cada reacción completa de PCR puede involucrar de 30 a 40 ciclos.

Cuando se realizaban los primeros ensayos de la técnica, era necesario añadir una nueva cantidad de enzima que sustituyera a la anteriormente adicionada, ya que las altas temperaturas la inactivaban tras cada ciclo. Se optó por utilizar la DNA polimerasa del organismo *Thermus aquaticus*, capaz de tolerar e incluso efectuar su actividad a una temperatura óptima de 90°C.

Es una técnica ampliamente empleada debido a su alta especificidad. Únicamente las secuencias de DNA que han sido delimitadas por el apareamiento de los primers es la que se amplifica. Aún si el fragmento delimitado constituye una muy pequeña fracción de la muestra de DNA inicial, este será accesible a amplificación por PCR (44).

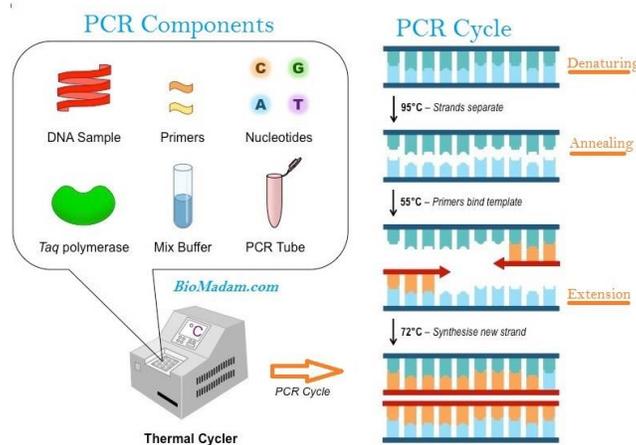


Diagrama de reactivos y etapas de una reacción de PCR.

## Secuenciación de Sanger

Puede comprenderse a la reacción de secuenciación por el método de Sanger como una modificación de la técnica de PCR cuyo propósito es llevar a cabo una polimerización de DNA utilizando dideoxynucleótidos como terminadores de reacción. El uso de esos dideoxynucleótidos marcados con fluoróforos es justamente el punto donde radica la modificación de una PCR normal. Cuando se habla de dideoxynucleótidos (ddNTPs), debe entenderse que se trata de un nucleótido que ha perdido su grupo OH de la posición 3' y que por lo tanto, al ser incorporado para la síntesis de una nueva molécula de DNA o RNA, no proporciona un sitio de anclaje para continuar con la elongación de la cadena (45).

Una vez que se ha amplificado un gen de interés mediante una PCR, y se corrobora que el producto de dicha reacción sea el deseado (esto mediante la comparación del peso molecular del producto contra un marcador de distintos pesos moleculares, realizando una electroforesis en gel de agarosa) el siguiente paso en el análisis de la secuencia amplificada consta de una purificación de producto de PCR y la reacción de secuenciación con método de Sanger.

Tal como si se tratara de una segunda PCR, se requiere la preparación de reacciones, esta vez, una por cada sentido de la secuencia a conocer, es decir, una reacción de secuenciación para el primer de sentido (o forward) y una para el primer de antisentido (o reverse). En esta reacción, en lugar de utilizarse DNA como muestra a amplificar, se utiliza el

producto de PCR confirmado. Se adicionan tanto dNTPs (desoxinucleótidos tri-fosfato usados como bloques de construcción de la nueva hebra) como ddNTPs, esto con la finalidad de obtener múltiples secuencias de distintos tamaños, cuyo extremo final está señalado por el fluoróforo unido al ddNTP.

Una electroforesis capilar será la encargada de analizar estos nuevos fragmentos sintetizados, para posteriormente obtener la representación gráfica de la secuencia en la que cada base nitrogenada proporciona una señal de especificidad. A dicha representación gráfica de la información obtenida al término de la secuenciación, se le denomina “electroferograma”.

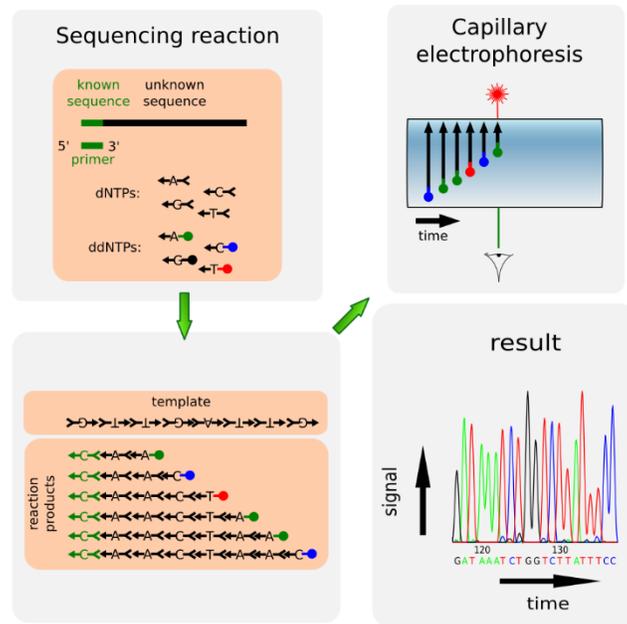


Diagrama general de la secuenciación por método de Sanger.

## Preparación de reactivos

- **PBS 10x**

|   |         |
|---|---------|
| NaCl  | 80 g    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O | 29 g    |
| KCl   | 2 g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 2 g     |
| H <sub>2</sub> O bidestilada cbp                    | 1000 ml |
| pH  | 7.4     |

Filtrado con membrana de 22 µm y diluido a 1x antes de utilizar.

- **Solución fijadora 1%**

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Paraformaldehído 37% | 3.7 mL |
| PBS cbp              | 100 mL |

- **Solución de Turk**

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| Ácido acético glacial            | 3.0 mL  |
| H <sub>2</sub> O bidestilada cbp | 100 mL  |
| Azul de metileno                 | 2 gotas |
| ▪ <b>SFB-PBS</b>                 |         |
| SFB 8%                           | 0.8 mL  |
| <br>                             |         |
| PBS cbp                          | 10 mL   |
| ▪ <b>RPMI suplementado</b>       |         |
| SFB                              | 10 mL   |
| Estreptomicina 1000µg/mL         | 1 mL    |
| Penicilina 1000µg/mL             | 1 mL    |
| Glutamina 2mM                    | 1 mL    |
| Antimicótico                     | 1 mL    |
| Aminoácidos no esenciales        | 1 mL    |
| Piruvato                         | 1 MI    |
| 2-mercaptoetanol                 | 100 µL  |
| RPMI cbp                         | 100 ml  |
| <br>                             |         |
| Agarosa 2%                       |         |
| Tae bromuro de etidio            |         |