



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**ANÁLISIS FENOTÍPICO Y MOLECULAR DE PACIENTES MEXICANOS
CON SÍNDROME DE HIPER-IGM**

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

PRESENTA

CHRISTIAN ALEMÁN LÓPEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO**

VOCAL: **Profesor: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ**

SECRETARIO: **Profesora: LAURA BERRÓN RUÍZ**

1er. SUPLENTE: **Profesor: GIBRAN PÉREZ MONTESINOS**

2º SUPLENTE: **Profesor: GUSTAVO OLVERA GARCÍA**

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

ASESOR DEL TEMA:

LAURA BERRÓN RUÍZ

SUSTENTANTE (S):

CHRISTIAN ALEMÁN LÓPEZ

ÍNDICE GENERAL

	Página
Lista de abreviaturas	1
Índice de figuras	4
Índice de tablas	8
Resumen	11
Abstract	12
I. Introducción	13
Inmunodeficiencias primarias	13
Clasificación de las inmunodeficiencias primarias (PIDs)	14
Síndrome de Hiper IgM (SHIGM)	16
Síndrome Híper IgM Ligado al Cromosoma X (Tipo 1)	17
CD40 Ligando	19
Desarrollo de las células B	21
Cambio de isotipo e hipermutación somática	21
Citometría de flujo	23
Técnicas de biología molecular	25
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	25
Clonación de DNA utilizando plásmidos como vectores	27
Transformación	29
II. Justificación	29
III. Hipótesis	30
IV. Objetivo general	30
V. Objetivos particulares	30
VI. Material y métodos	31

Tipo de investigación	31
Criterios de inclusión	31
Criterios de exclusión	32
Criterios de eliminación	32
Obtención de muestras	32
Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC'S)	32
Tinciones celulares para citometría de flujo	33
Poblaciones linfocitarias y subpoblaciones de células T	33
Subpoblaciones de células B	33
Expresión de CD40 LIGANDO	33
Técnicas de biología molecular	34
Extracción de DNA genómico	34
Amplificación del gen CD40L por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa	36
Clonación de productos de PCR	37
Selección de colonias positivas	38
Purificación del plásmido	39
Reacción de secuenciación y purificación	39
Secuenciación y análisis	40

VII. Resultados	41
Características clínicas y valores de inmunoglobulinas de los pacientes	41
Poblaciones leucocitarias	43
Poblaciones de células T, B y NK	47
Subpoblaciones de células T	51
Subpoblaciones de células B	57
Expresión de CD40L	64
Caracterización de mutaciones en el gen de CD40L por técnicas de biología molecular	69
Amplificación del gen CD40L por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	69
Clonación, ligación y transformación del gen CD40L	71
Secuenciación y análisis	73
VIII. Discusión	75
IX. Conclusiones	84
X. Perspectivas	86
XI. Bibliografía	87
XII. Apéndice	92
Preparación de reactivos	92

LISTA DE ABREVIATURAS

AICDA	Del inglés: Activation-induced cytidine deaminase
AID	Del inglés: Activation-induced cytidine deaminase
CD40L	CD40 ligando
CVID	Immunodeficiencia Común Variable (del inglés: Common Variable Immunodeficiency)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESID	Del inglés: European Society for Immunodeficiencies
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos (del inglés: Granulocyte colony-stimulating factor)
Ig	Inmunoglobulina
IKKG	Del inglés: Inhibitor of nuclear factor-kappa-B kinase subunit gamma.
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IVIG	Inmunoglobulina intravenosa (del inglés: Intravenous Immunoglobulin)
LB	Luria Bertani

NEMO	Modulador esencial de NF- κ B (del inglés: NF-kappa-B essential modulator)
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica (del inglés: Pheripheral Blood Mononuclear Cell)
PBS	Del inglés: Phosphate-buffered saline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: Polimerase Chain Reaction)
PID	Inmunodeficiencia Primaria (del inglés: Primary Immunodeficiency)
PMA	Del inglés: Phorbol 12-myristato 13-acetato
SFB	Suero fetal bovino
SHIGM	Síndrome de Hiper-IgM
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TBE	Tris-Ácido Bórico-EDTA (del inglés: Tris-Borate-EDTA buffer)
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés: Tumoral Necrosis Factor)
TNFH	Homología al factor de necrosis tumoral (del inglés: Tumoral Necrosis Factor Homology)
UACM	Universidad Autónoma de la Ciudad de México
UNG	Del inglés: Uracil DNA glycosylase

VIH Virus de Inmunodeficiencia Humana

XLA Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X

NDICE DE FIGURAS		Página
Figura 1	Principales grupos de inmunodeficiencias primarias, de acuerdo al registro de la Sociedad de Inmunodeficiencias	15
Figura 2	Número de pacientes mexicanos con inmunodeficiencias primarias	15
Figura 3	Distribución de mutaciones a lo largo del gen de CD40L en pacientes con SHIGM	20
Figura 4	Distribución de los tipos de mutaciones en el gen de CD40L identificados en pacientes con SHIGM	20
Figura 5	Moléculas afectadas en las células B de pacientes con SHIGM	22
Figura 6	Esquema de las partes que conforman un citómetro de flujo	25
Figura 7	Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	26
Figura 8	Mapa del vector de clonación pJET 1.2	28
Figura 9	Condiciones del PCR para CD40L	36
Figura 10	Condiciones de PCR para la selección de colonias	39
Figura 11	Condiciones de PCR para la reacción de secuenciación	40
Figura 12	Porcentaje de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica en control sano y paciente	43
Figura 13	Análisis estadístico de los leucocitos totales en controles sanos y pacientes	45
Figura 14	Análisis estadístico de los linfocitos totales en controles sanos y pacientes	45

Figura 15	Análisis estadístico de los neutrófilos en controles sanos y pacientes	46
Figura 16	Análisis estadístico de los monocitos en controles sanos y pacientes	46
Figura 17	Porcentaje de las poblaciones de las células T, B y NK en control sano y paciente	47
Figura 18	Análisis estadístico de las células T CD3+ en controles sanos y pacientes	50
Figura 19	Análisis estadístico de las células B CD19+ en controles sanos y pacientes	50
Figura 20	Análisis estadístico de las células NK CD16+56+ en controles sanos y pacientes	51
Figura 21	Porcentaje de células T CD4+ y T CD8+ en una muestra de control sano y paciente	52
Figura 22	Porcentaje de las células T CD4+ RA+ (naïve) y T CD4+ RO+ (memoria) en una muestra de control sano y paciente	52
Figura 23	Análisis estadístico de las células T CD4+ en controles sanos y pacientes	55
Figura 24	Análisis estadístico de las células T CD8+ en controles sanos y pacientes	55
Figura 25	Análisis estadístico de las células T CD4+ CD45RO+ en controles sanos y pacientes	56
Figura 26	Análisis estadístico de las células T CD4+ CD45RA+ en controles sanos y pacientes	56

Figura 27	Porcentaje de subpoblaciones de células B CD19+: células naïve, células de memoria sin cambio y con cambio de isotipo en una muestra de control sano y paciente	57
Figura 28	Porcentaje de subpoblaciones de células B CD19+: células transicionales y plasmablastos en una muestra de control sano y paciente	58
Figura 29	Análisis estadístico de las células B Naïve en controles sanos y pacientes	61
Figura 30	Análisis estadístico de las células B sin cambio de isotipo en controles sanos y pacientes	61
Figura 31	Análisis estadístico de las células B con cambio de isotipo en controles sanos y pacientes	62
Figura 32	Análisis estadístico de las células B de memoria total en controles sanos y pacientes	62
Figura 33	Análisis estadístico de las células B transicionales en controles sanos y pacientes	63
Figura 34	Análisis estadístico de los plasmablastos en controles sanos y pacientes	63
Figura 35	Análisis de la expresión de CD69 y CD40L en control sano	65
Figura 36	Análisis de la expresión de CD69 y CD40L en paciente	66
Figura 37	Análisis estadístico de la expresión de CD69 en controles sanos y pacientes	68
Figura 38	Análisis estadístico de la expresión de CD40L en controles sanos y pacientes	68

Figura 39	Amplificación del exón 1 y 2 del gen de CD40L	69
Figura 40	Amplificación del exón 4 del gen CD40L	70
Figura 41	Amplificación del exón 5 del gen de CD40L	70
Figura 42	Amplificación del exón 3 del gen de CD40L	71
Figura 43	PCR de colonia del exón 1 del gen CD40L	72
Figura 44	Análisis de las secuenciación del exón 5 del paciente 3	73
Figura 45	Análisis de las secuenciación del exón 5 del paciente 6	74

ÍNDICE DE TABLAS		Página
Tabla 1	Clasificación de los Síndromes de Hiper IgM	17
Tabla 2	Reactivos utilizados en el PCR de CD40L	35
Tabla 3	Iniciadores empleados para amplificar los exones de CD40L a partir de DNA genómico	36
Tabla 4	Reactivos utilizados en la clonación de los productos de PCR	37
Tabla 5	Reactivos utilizados en la ligación del plásmido	37
Tabla 6	Reactivos utilizados en el PCR de colonia	38
Tabla 7	Iniciadores del pJET1.2 empleados en el PCR de colonias	39
Tabla 8	Reactivos utilizados en la reacción de secuenciación	40
Tabla 9	Valores de las inmunoglobulinas séricas y características clínicas de los seis pacientes	41
Tabla 10	Valores de referencia de las inmunoglobulinas séricas en población pediátrica	42
Tabla 11	Resumen de las características clínicas de los seis pacientes	42
Tabla 12	Porcentajes y números absolutos de los leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos en los controles sanos	44
Tabla 13	Porcentajes y números absolutos de los leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos en los seis pacientes	44
Tabla 14	Valores de referencia en valores porcentuales y absolutos de neutrófilos, linfocitos y monocitos	44

Tabla 15	Porcentajes y números absolutos de las células T CD3+ y las células B CD19+ en los controles sanos	48
Tabla 16	Porcentajes y números absolutos de las células T CD3+ y las células B CD19+ en los seis pacientes	48
Tabla 17	Valores de referencia en valores porcentuales y absolutos de las células T CD3+ y las células B CD19+	48
Tabla 18	Porcentajes y números absolutos de las células NK CD16+56+ en los controles sanos	49
Tabla 19	Porcentajes y números absolutos de las células NK CD16+56+ en los seis pacientes	49
Tabla 20	Valores de referencia en valores porcentuales y absolutos de las células NK CD16+56+	49
Tabla 21	Porcentajes y números absolutos de las células T CD4+ y T CD8+ en los controles sanos	53
Tabla 22	Porcentajes y números absolutos de las células T CD4+ y T CD8+ en los seis pacientes	53
Tabla 23	Valores de referencia en valores porcentuales y absolutos de las células T CD4+ y T CD8+	53
Tabla 24	Porcentajes y números absolutos de las células T CD4+ CD45RO+ y T CD4+ CD45RA+ en los controles sanos	54
Tabla 25	Porcentajes y números absolutos de las células T CD4+ CD45RO+ y T CD4+ CD45RA+ en los seis pacientes	54
Tabla 26	Valores de referencia en valores porcentuales y números absolutos de las células T CD4+ CD45RO+ y T CD4+ CD45RA+	54

Tabla 27	Porcentaje y números absolutos de las células B naïve, células B de memoria con cambio y sin cambio de isotipo, y células B de memoria total en los testigos	58
Tabla 28	Porcentaje y números absolutos de las células B naïve, células B de memoria con cambio y sin cambio de isotipo, y células B de memoria total en los seis pacientes	59
Tabla 29	Valores de referencia en valores porcentuales y números absolutos de los linfocitos B naïve, células B de memoria con cambio y sin cambio de isotipo, y células B de memoria total	59
Tabla 30	Porcentajes y números absolutos de las células B transicionales y plasmablastos en los testigos	59
Tabla 31	Porcentajes y números absolutos de las células B transicionales y plasmablastos en los seis pacientes	60
Tabla 32	Valores de referencia de las células B transicionales y plasmablastos	60
Tabla 33	Porcentajes y valores de intensidad media de fluorescencia de células CD69 y CD40L sin activar y activadas de los testigos	67
Tabla 34	Porcentajes y valores de intensidad media de fluorescencia de células CD69 y CD40L sin activar y activadas de los seis pacientes	67

RESUMEN

Entre los grupos de inmunodeficiencias primarias (PID's por sus siglas en inglés), las inmunodeficiencias humorales son las más comúnmente reportadas en todo el mundo. Entre estas enfermedades se encuentra el Síndrome Hiper-IgM, el cual es un grupo heterogéneo de trastornos caracterizado por valores séricos normales o elevados de IgM y bajos niveles de IgG, IgA e IgE. Actualmente se conocen 6 subclasificaciones de este síndrome, sin embargo, el tipo I es el más estudiado debido a que afecta a más del 60% de pacientes y suele originarse debido a una mutación en el gen que codifica para el ligando de CD40 (CD154) y se hereda de un modo ligado al cromosoma X.

El ligando de CD40 se expresa en células T cooperadores activadas e interactúa con CD40, el cual se encuentra constitutivamente en la superficie de las células B. La unión de CD40 con su ligando (CD154) es de suma importancia ya que promueve la inducción del cambio de isotipo, la hipermutación somática y la generación de células plasmáticas de larga vida. Los pacientes con deficiencia en la proteína CD40L, son susceptibles a adquirir infecciones respiratorias y a infecciones por patógenos oportunistas, por lo cual es de suma importancia realizar pruebas que apoyen el diagnóstico clínico para ofrecer un adecuado tratamiento al paciente. En el presente trabajo de investigación estudiamos a seis pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de Hiper-IgM Tipo 1 a los cuales se les realizó la fenotipificación de las poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias, así como el análisis de la expresión de la proteína CD40L. De los resultados obtenidos destaca la ausencia total de células B de memoria con cambio de isotipo y una disminución en la expresión de la proteína CD40L de todos los pacientes (n=6) comparados con los testigos (n=6). Posteriormente se realizaron estudios moleculares en cuatro de los anteriores pacientes y se encontraron 2 mutaciones puntuales en el paciente 3 y en el 6 situadas en el dominio de TNFH: p. G257S (mutación no reportada en la literatura) y p. S222F (mutación ya reportada en la literatura), por lo que se puede concluir que solamente estos dos pacientes tienen el Síndrome de Hiper-IgM Tipo 1 ya que se encontró el defecto molecular en el gen de CD40L.

ABSTRACT

Among the groups of primary immunodeficiencies (PIDs for its acronym in English), humoral immunodeficiencies are the most commonly reported worldwide. Among these diseases is Hyper-IgM syndrome, which is a heterogeneous group of disorders characterized by normal or elevated serum levels of IgM and low levels of IgG, IgA and IgE. Six subclassifications of this syndrome are currently known, however, type 1 is the most studied because it affects more than 60% of patients and is originated due to a mutation in the gene encoding CD40 ligand (CD154) and its inherited in an X-linked mode.

The ligand of CD40 is expressed on activated helper T cells and interacts with CD40, which is constitutively expressed on the surface of B cells. The binding of CD40 and its ligand (CD154) is very important because it promotes the class switch recombination, somatic hypermutation and generation of long life plasmatic cells. Patients with CD40L deficiency, are susceptible to respiratory infections and opportunistic infections, so it is very important to perform tests to support the clinical diagnosis to provide proper treatment to the patient.

In this research we studied six patients with clinical diagnosis of Hyper-IgM syndrome Type 1 to whom were performed the phenotyping of lymphocyte populations and B and T cells subsets, as well as the analysis of CD40L protein expression. From the results obtained we highlighted the total absence of switched memory B lymphocytes and decreased expression of CD40L protein in all the patients (n=6) compared with the controls (n=6). Finally, molecular studies were performed in four of the previous patients and two point mutations were found in patient 3 and 6 both located in the TNFH domain: p. G257S (mutation not reported in the literature) and p. S222F (mutation already reported in the literature), so we can conclude that only these two patients have the Hyper-IgM syndrome Type 1 because we found the molecular defect in the CD40L gene.

I. INTRODUCCIÓN

Inmunodeficiencias Primarias

La integridad del sistema inmunitario es esencial para la defensa contra los microorganismos patógenos y, por tanto, para la supervivencia de todos los individuos. Los defectos de uno o más componentes del sistema inmunitario pueden llevar a trastornos graves y a menudo mortales, que se llaman en conjunto enfermedades por inmunodeficiencias (1). Estas enfermedades se clasifican en dos grupos:

- Inmunodeficiencias congénitas o primarias: se producen por mutaciones en cualquiera de un gran número de genes que participan o controlan las respuestas inmunitarias. Las manifestaciones clínicas de inmunodeficiencias primarias son muy variables; por lo general incluyen infecciones recurrentes y a menudo abrumadoras en niños de muy corta edad (2).
- Inmunodeficiencias adquiridas o secundarias: no son hereditarias, sino que se adquieren como consecuencia de otras enfermedades como por ejemplo: cáncer diseminado, la infección de células del sistema inmunitario sobre todo por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que es el microorganismo etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (1). También pueden ser consecutivas a factores ambientales como la inanición, o consecuencia adversa del tratamiento con fármacos inmunosupresores.

Clasificación de las inmunodeficiencias primarias (PIDs)

Las PIDs son un grupo heterogéneo de desórdenes que afectan distintos componentes del sistema inmune innato y adquirido (3).

Las PIDs aparecen en edades pediátricas, especialmente antes de los primeros cinco años de vida. Con respecto a su distribución por sexo casi todos los registros demuestran un predominio masculino (60-80%) (4, 5).

La clasificación de las PIDs se realiza con base en el componente del sistema inmunológico que se encuentra afectado, por tal motivo se puede hablar de inmunodeficiencias humorales, inmunodeficiencias celulares e inmunodeficiencias que afectan componentes de la respuesta inmune innata. Tomando como base los criterios anteriores, las PIDs se clasifican en ocho grupos principalmente de la siguiente manera (3):

- 1) Inmunodeficiencias combinadas de células B y T.
- 2) Inmunodeficiencias con alteraciones en la síntesis de anticuerpos (células B).
- 3) Síndromes acompañados de una inmunodeficiencia.
- 4) Enfermedades con afectación en la regulación inmunológica.
- 5) Defectos congénitos en el número y/o función de los fagocitos.
- 6) Defectos en la respuesta inmune innata
- 7) Desórdenes auto-inflamatorios
- 8) Deficiencias del complemento

Las inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos o inmunodeficiencias humorales son las más frecuentes, representan alrededor del 56% del total de las PID según los datos obtenidos del registro de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias Primarias (ESID) (**figura 1**) y se caracterizan por la ausencia de todas las clases de anticuerpos o la disminución selectiva de una clase o subclase de anticuerpo.

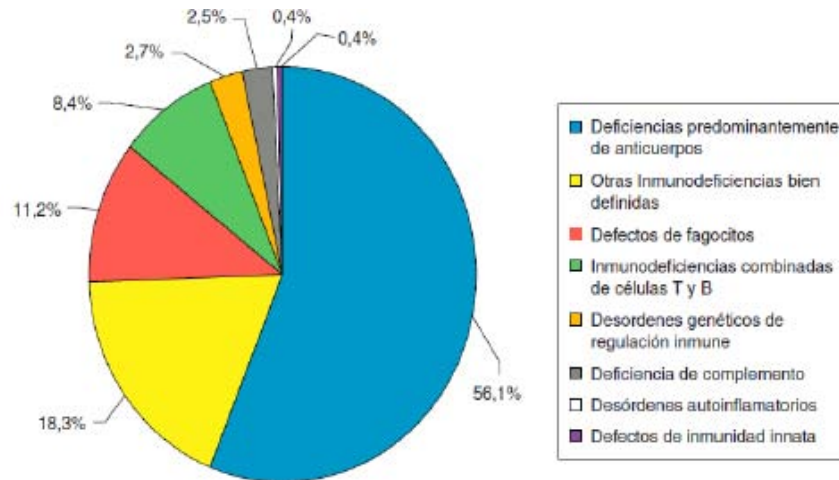


Figura 1. Principales grupos de inmunodeficiencias primarias, de acuerdo al registro de la Sociedad de Inmunodeficiencias. Fuente: www.esid.org

Con base en datos estadísticos tomados del Instituto Nacional de Pediatría del año 2004 (donde se incluyen a pacientes de diversos lugares de la república mexicana cuyos casos llegaron al Departamento de Inmunodeficiencias Primarias), las PID con defectos en la producción de anticuerpos también son las que se presentan con mayor frecuencia dentro de la población infantil mexicana, siendo la Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA) y la Inmunodeficiencia Común Variable (CVID) las que se presentan en mayor frecuencia, mientras que los síndromes de Hiper-IgM se encuentran en la quinta posición (**Figura 2**).

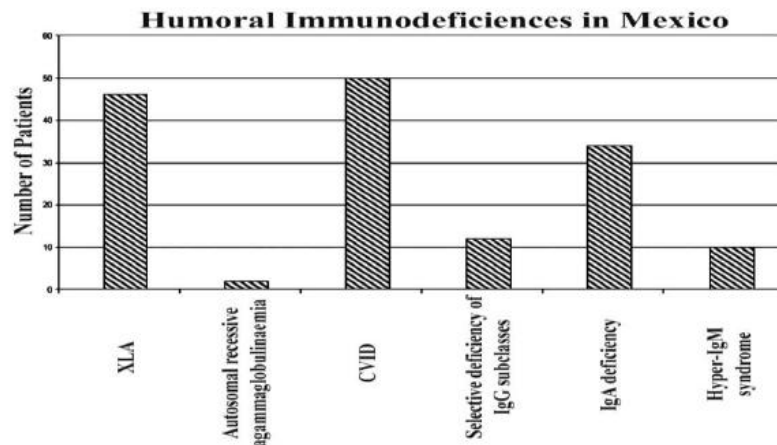


Figura 2. Número de pacientes mexicanos con inmunodeficiencias primarias. Datos tomados del reporte del Instituto de Pediatría del año 2004.

Síndrome de Hiper IgM (SHIGM)

El SHIGM es un grupo heterogéneo de trastornos de inmunodeficiencias primarias que se caracteriza por presentar valores séricos normales o elevados de la inmunoglobulina IgM y bajos niveles de las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgE (6). Este síndrome, originalmente llamado disagammaglobulinemia, fue descrito por primera vez en 1961 en un chico de 15 años con neumonía, meningitis y linfadenopatías recurrentes (7), y en 2 hermanos de sexo masculino con un historial de infecciones bacterianas recurrentes (8).

Los pacientes afectados son susceptibles a infecciones recurrentes de las vías respiratorias, infecciones oportunistas, neutropenia (en forma cíclica o crónica), enfermedades autoinmunes y cáncer particularmente del hígado, páncreas o del tracto biliar (9).

El defecto en el SHIGM resulta en un fallo en el cambio de isotipo de las células B de IgM/IgD a IgG, IgA o IgE, el cual requiere ayuda contacto-dependiente de las células T (10). Este defecto inmunológico ocasiona que las células B sean incapaces de proliferar y formar centros germinales en órganos linfoides así como llevar a cabo el cambio de isotipo in vivo (11).

Los SHIGM presentan una heterogeneidad genética debido a los diferentes tipos de herencia que los pueden originar (ligado al cromosoma X, autosómica recesiva y autosómica dominante) (5); por otro lado este tipo de inmunodeficiencia primaria puede ser causada por defectos en la vía de señalización CD40L-CD40, la cual es esencial en la activación de las células B o por defectos en enzimas que participan en los procesos de cambio de isotipo y de hipermutación somática (12). Actualmente se han identificado seis tipos diferentes de este síndrome donde se afectan diferentes moléculas implicadas en la vía de señalización de las células B (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de los Síndromes de Hiper IgM

Tipo	Gen mutado	Proteína afectada	Herencia	Microorganismos
HIGM 1	CD40L	CD40L (CD154)	LX	Infecciones bacterianas recurrentes por oportunistas, principalmente: <i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i>
HIGM 2	AICDA	AID	AR	Infecciones bacterianas recurrentes
HIGM 3	CD40	CD40	AR	
HIGM 2	AICDA	AID	AR	
HIGM 4	--	--	AR	
HIGM 5	UNG	UNG	AR	
HIGM 6	IKKG (NEMO)	NEMO	LX	Infecciones bacterianas, Micobacterias

Síndrome Híper IgM Ligado al Cromosoma X (Tipo 1)

Se hereda típicamente como un rasgo genético ligado al cromosoma X y es el más común ya que representa del 65 al 70% de los pacientes con SHIGM (5). Suele originarse debido a una mutación en el gen que codifica para el ligando de CD40 (CD154). Estos pacientes son susceptibles a sufrir infecciones bacterianas, así como un aumento en el desarrollo de infecciones oportunistas (se ha reportado que son propensos a infecciones principalmente por *Pneumocystis (carinii) jirovecii* el cual afecta entre un 20% a un 40% de los pacientes y *Cryptosporidium parvum*, el cual afecta al 30 % de los casos donde se presenta diarrea crónica (13) y el cual también está involucrado en la colangitis esclerosante, la cual es una severa manifestación de SHIGM Tipo 1 (14)).

Las enfermedades de hígado se presentan con frecuencia en estos pacientes y parecen aumentar conforme la edad (9). Se ha reportado una susceptibilidad inusual a padecer cáncer de hígado y del tracto biliar (9). También se ha observado que sus tejidos linfoides tienen desorganización en la arquitectura folicular, principalmente una pérdida de los centros germinales en nódulos linfáticos (12). La susceptibilidad a infecciones oportunistas indica un defecto asociado a inmunidad celular, la cual puede ser tratada con un trasplante de médula ósea (15). Los pacientes que sufren de la deficiencia de CD40L manifiestan los síntomas de una PID a una edad muy temprana, y son más propensos a desarrollar infecciones severas en comparación con otros tipos del SHIGM incluso aunque estén recibiendo terapia con IVIG (13).

Otras características clínicas que se han reportado incluyen cuadros de neutropenia (esporádica, cíclica o permanente), manifestaciones de autoinmunidad (citopenias hemáticas o artritis), y mayor predisposición a las neoplasias de estirpe linfoide (linfomas y leucemias) (16).

Las células B son intrínsecamente normales, lo cual se ha demostrado in vitro, al observar en ellas una recombinación somática posterior a una activación con CD40L soluble y citocinas apropiadas, a diferencia de los pacientes que presentan una deficiencia de la proteína CD40 (12).

El tratamiento para este síndrome se basa en la administración de gammaglobulina intravenosa y el uso de antibióticos profilácticos, aunque se ha observado que el pronóstico a largo plazo aún con estos tratamientos es malo ya que se ha reportado que solamente el 20% de los pacientes logran llegar a una edad adulta (edad máxima reportada: 25 años) (13), por lo que se ha planteado como tratamiento alternativo el trasplante alogénico de médula ósea ya que puede corregir el defecto molecular, logrando la reconstitución del sistema inmunológico y previniendo las manifestaciones tardías de la enfermedad (17).

CD40 Ligando

El CD40L es una glicoproteína que se expresa en la superficie de las células T CD4+ activadas y en menor proporción en las células T CD8+, mastocitos, basófilos, y plaquetas. Se une al receptor CD40 el cual se expresa constitutivamente en la superficie de las células B, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células epiteliales (10), generando una cascada de eventos intracelulares que son de suma importancia para las células B ya que permiten su proliferación, cambio de isotipo de cadena pesada de inmunoglobulinas y formación de centros germinales en el folículo linfático (10).

CD40L actúa como factor de crecimiento, inducción y activación de las células T; se expresa en membrana como homotrímero y está compuesto por 261 aminoácidos y cuatro dominios funcionales: una región citoplasmática corta (22 aminoácidos), una transmembranal (24 aminoácidos) y una gran porción extracelular (215 aminoácidos) la cual está constituida por: único dominio extracelular corto (ECU) y el dominio con homología a la familia de proteínas TNF (TNFH) (18). La región extracelular es importante para las interacciones homotípicas (ya que el CD40L forma homotrímeros) y para interacciones heterotípicas (interacción con CD40) (19). CD40L pertenece a la superfamilia de las proteínas TNF y se codifica en el cromosoma Xq26.3 en 5 exones (10).

Se han descrito mutaciones en toda la molécula CD40L sin correlación genotipo-fenotipo aparente. En la porción más extracelular se encuentra la zona con homología a la familia de proteínas TNF que interacciona con el receptor CD40. Esta zona es codificada por parte del exón 4 y todo el exón 5 y concentra la proporción más alta de mutaciones (65%) (**Figura 3 y 4**). Se han caracterizado todo tipo de mutaciones en el gen de CD40L entre las que podemos mencionar: mutaciones puntuales, inserciones, eliminaciones y aquellas que afectan sitios del "splicing". Algunas de estas mutaciones previenen la unión CD40L-CD40, mientras

que otros afectan el plegamiento del monómero de CD40L o la formación del trímero (10).

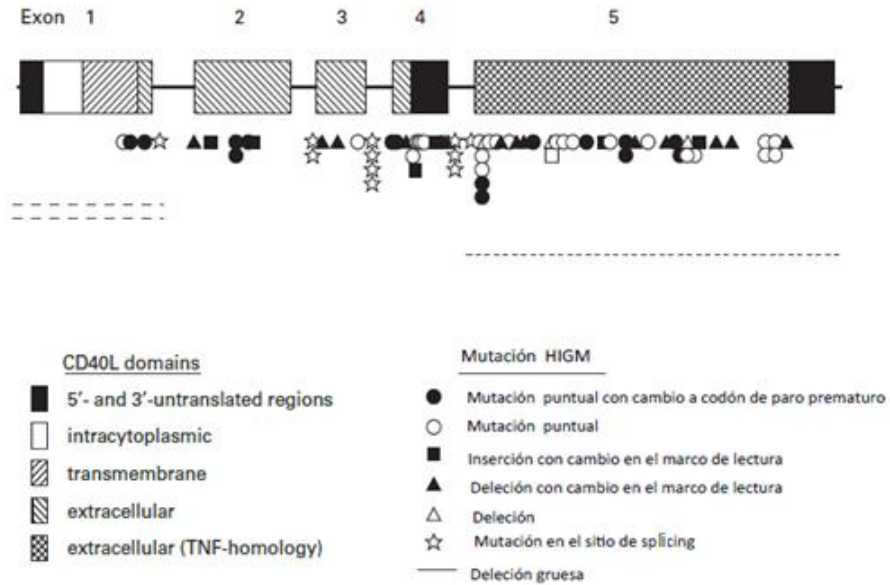


Figura 3. Distribución de mutaciones a lo largo del gen de CD40L en pacientes con SHIGM. Los tipos de mutaciones son identificados con diferentes símbolos (16).

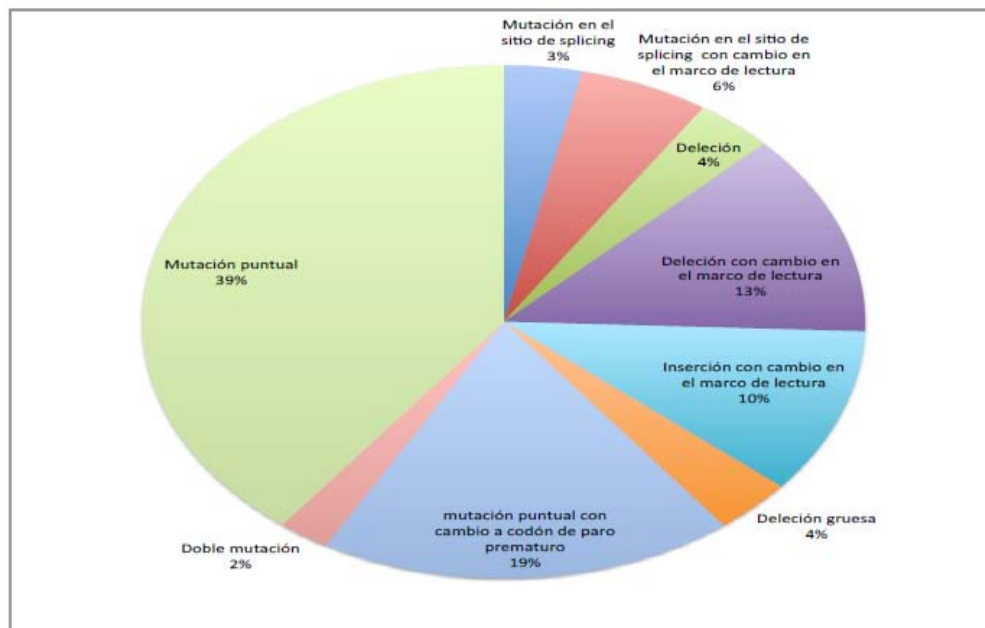


Figura 4. Distribución de los tipos de mutaciones en el gen de CD40L identificados en pacientes con SHIGM. Fuente: <http://www.bioinf.uta.ft>.

Desarrollo de las células B

Para poder entender los defectos funcionales de la proteína CD40L es importante conocer la diferenciación de las células B y la importancia de la función de las células T en los folículos primarios para que se pueda producir la reacción del centro germinal y con esto la hipermutación somática y el cambio de isotipo, estos eventos son críticos para que la célula B se diferencien en célula B de memoria o célula plasmática que secrete anticuerpos de diferente isotipo.

Cambio de isotipo e hipermutación somática

El repertorio primario de anticuerpos es generado durante la maduración de las células B en la médula ósea y da lugar a la producción de anticuerpos IgM e IgD de baja avidéz, esto ocurre de una manera independiente de antígeno. Cuando las células maduras IgM⁺ IgD⁺ emigran de la médula ósea (o hígado fetal) y se encuentran con un antígeno específicamente reconocido por su receptor de linfocito B (BCR), proliferan y dan lugar a una formación linfoide peculiar: los centros germinales. En este sitio, las células B se someten a dos eventos importantes de maduración: el cambio de isotipo y la hipermutación somática. Estos dos procesos ocurren a través de una cooperación estrecha entre las células T y B e implica a CD40L, una molécula que se expresa transitoriamente en células T cooperadoras activadas y CD40, el cual se expresa constitutivamente en las células B (20). La interacción de CD40L/CD40 se requiere para la proliferación de las células B, la formación de centros germinales, el cambio de isotipo y la hipermutación somática (20).

El repertorio secundario de anticuerpos es generado en los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y amígdalas) y es dependiente de antígeno y de células T. La primera modificación a la respuesta primaria del anticuerpo IgM involucra al cambio de isotipo. En este proceso, la región constante (C) de la cadena pesada es remplazada por una región C alternativa que conduce a un

aumento en la diversidad funcional del repertorio de inmunoglobulinas (2). Una segunda alteración de las células B dependientes de antígeno involucra la introducción de una alta tasa de mutaciones puntuales en las regiones variables (V) de los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, lo que resulta en una expansión del repertorio de anticuerpos al permitir la selección dependiente de antígeno de anticuerpos de alta afinidad (21). Tanto el cambio de isotipo como la hipermutación somática requieren de la transcripción a través de las regiones S (del inglés: switch) y V (del inglés: variable) de los exones V(D)J y de la edición del DNA, lo que requiere de dos enzimas cruciales expresadas en los centros germinales de los linfocitos B: AID y UNG.

Los defectos en cualquiera de estos eventos (el cambio de isotipo y la hipermutación somática) resultan en una deficiencia de anticuerpos. En la **figura 5** se muestran las moléculas afectadas de las células B en los pacientes con SHIGM.

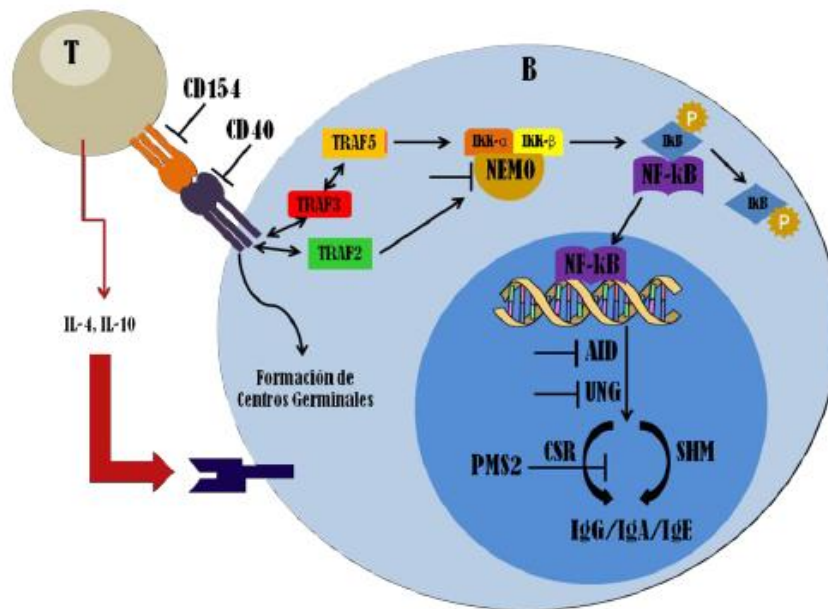


Figura 5. Moléculas afectadas en las células B de pacientes con SHIGM (6).

Citometría de flujo

Para el estudio del SHIGM como en otras PIDs, es necesario analizar las poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias y la expresión y /o función de las moléculas involucradas en estas PIDs. Por esta razón la citometría de flujo nos ofrece una alternativa para este tipo de análisis fenotípico; ya que es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso (22). Mientras esto sucede, se puede hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. La ventaja analítica de la citometría de flujo tiene como base la habilidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen. El análisis multiparamétrico hace posible evaluar poblaciones celulares particulares dentro de una mezcla compleja, ya que aprovecha propiedades intrínsecas de la célula como la dispersión de la luz y características controladas como la fluorescencia (22).

El funcionamiento del citómetro es relativamente sencillo y se describe a continuación: una suspensión celular se inyecta al flujo laminar donde las células pasan una después de la otra a través de un capilar y llegan hasta un rayo láser. Cuando este rayo incide en una célula, la luz de excitación sale hacia delante y hacia los lados de la célula y esto genera información. La luz dispersada hacia delante provee información sobre el tamaño de la célula (parámetro denominado Forward Scatter). La luz dispersada hacia los lados provee información sobre la granularidad y morfología celular (parámetro denominado Side Scatter). Si la célula va marcada con un fluoróforo, la luz fluorescente se procesa, a través del fotomultiplicador en el sistema procesador de datos y los resultados son analizados por el software del citómetro (22).

El citómetro de flujo tiene los siguientes componentes (**Figura 6**):

- Sistema de flujo: posee un capilar a través del cual se hace pasar un líquido isotónico, con una velocidad y presión constantes; estas características son necesarias para la formación de un flujo laminar (sin turbulencia); al mismo tiempo, por el centro del capilar se hace pasar la suspensión celular (23).
- Sistema óptico: la fluorescencia y la luz dispersada se producen cuando una célula contenida en el líquido inyectada pasa por el rayo enfocado de un láser. La luz dispersada hacia el frente es colectada por un detector que capta la luz difractada entre 1 y 10° arriba o abajo del punto de incidencia del láser. La luz dispersada lateralmente y la fluorescencia son colectadas por un lente que está a 90° del eje de incidencia del láser. Esta luz lateral y la fluorescencia son divididas por un beamsplitter para separar entre la luz difractada y la fluorescencia. La fluorescencia es a su vez dividida por un espejo dicróico que permite distinguir entre diferentes longitudes de onda. Cada detector de fluorescencia tiene otros filtros ópticos para excluir la luz láser dispersada y para dejar pasar luz con la longitud de onda deseada para ese detector (23).
- Sistema electrónico: involucrado en la amplificación de las señales que salen de los detectores tanto de fluorescencia como de luz dispersa y con el procesamiento de datos para su evaluación. El citómetro de flujo va acompañado por una computadora que adquiere los datos proporcionados por el sistema eléctrico y hace una representación gráfica (23).

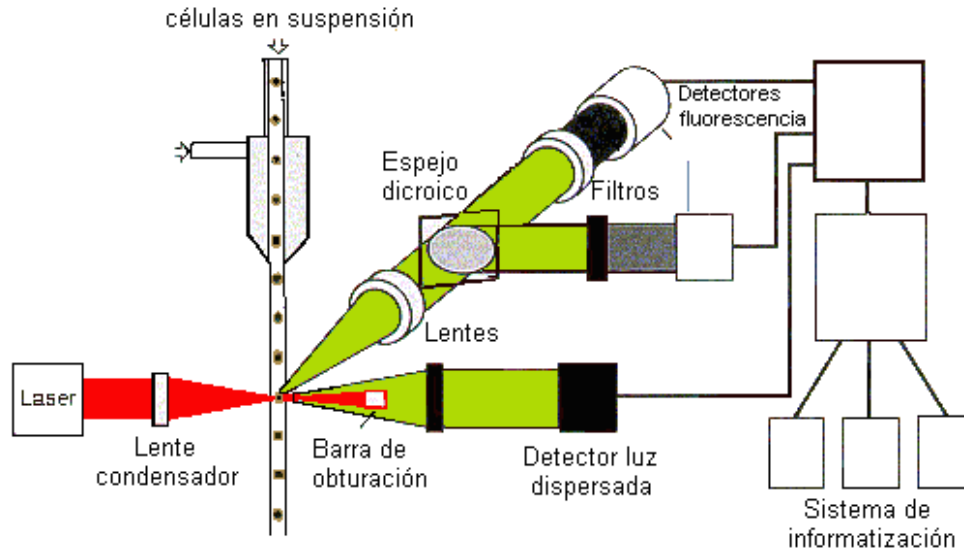


Figura 6. Esquema de las partes que conforman un citómetro de flujo.

Fuente: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EEEFuFVpEViYvxbfZt.php>.

Técnicas de biología molecular

Como ya se ha mencionado, los defectos moleculares en el gen de CD40L llevan a un fenotipo clínico de SHIGM, por esta razón después del análisis fenotípico tanto de las poblaciones y subpoblaciones leucocitarias, así como del análisis de la expresión de la proteína CD40L, es muy importante realizar el estudio molecular de dicho gen para detectar que realmente existe un daño en dicho gen y con esto poder emitir el diagnóstico definitivo de SHIGM Tipo 1, por lo cual es pertinente hablar de las técnicas que se utilizan para el diagnóstico molecular.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las copias de secuencias específicas de DNA son necesarias para muchas técnicas moleculares (28); la amplificación de DNA por PCR corresponde a una reacción enzimática ejecutada por alguna DNA polimerasa; esta clase de enzimas cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el 3'-OH en el extremo creciente de la cadena de DNA a elongar (el iniciador o primer) y el grupo 5'-PO₄ del desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) entrante (24).

La amplificación del DNA se logra mediante ciclos repetidos de PCR, cada uno de los cuales presenta tres etapas (**figura 7**):

1. Desnaturalización del molde de DNA: el DNA diana se calienta para separar las cadenas y se añade la DNA polimerasa y un gran exceso de dos oligonucleótidos cebadores, uno complementario de la cadena diana y el otro de la cadena complementaria.
2. Alineamiento de los iniciadores al molde: a medida que va disminuyendo la temperatura de la mezcla, los cebadores en exceso respecto al molde de DNA aseguran que la mayoría de cadenas de molde se aparean con un cebador y no entre sí.
3. Extensión (elongación) de los iniciadores por la DNA polimerasa: la DNA polimerasa extiende los cebadores usando el DNA original como molde.

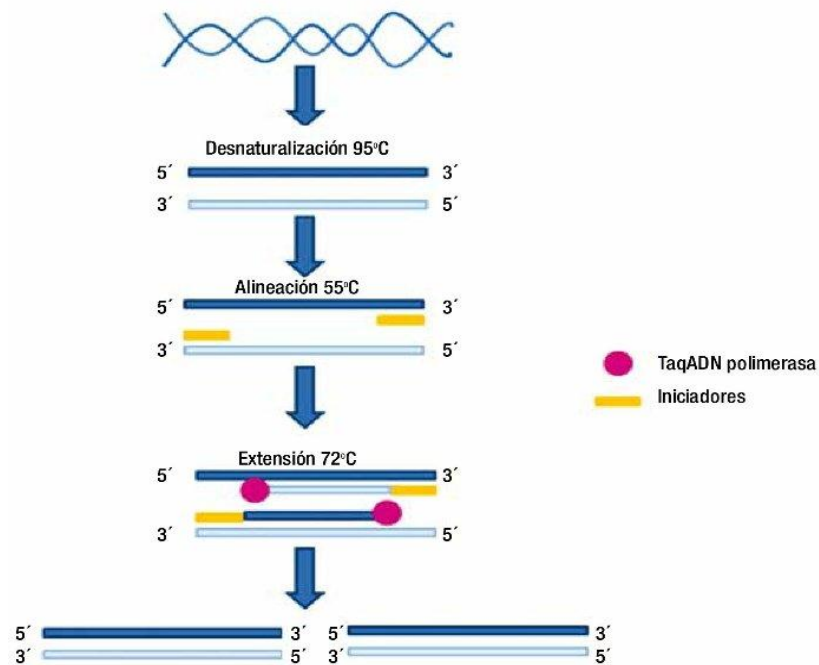


Figura 7. Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Fuente:

http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=94694&id_seccion=2291&id_ejemplar=9257&id_revista=139

La reacción de amplificación contempla la participación de dos iniciadores (primers o cebadores) que se hibridan (se unen por complementaridad de bases) a cadenas opuestas del segmento “blanco”; cada iniciador se orienta de forma tal que la elongación se lleva a cabo a través de la zona delimitada entre ambos iniciadores y hasta la región homóloga al otro iniciador (25).

La potencia de la PCR radica en que los productos de una extensión del cebador actúan como moldes para el ciclo siguiente, de modo que cada ciclo duplica la cantidad de DNA original.

Clonación de DNA con utilizando plásmidos como vectores

Los trabajos pioneros de Paul Berg, Herbert Boyer y Stanley Cohen a principios de los años setenta dieron lugar al desarrollo de la tecnología de DNA recombinante con la cual se pueden crear en el laboratorio nuevas combinaciones de genes no relacionados. Estas nuevas combinaciones se pueden clonar (amplificar muchas veces) mediante su inserción en células adecuadas donde serán replicadas por la maquinaria de síntesis de DNA del hospedador (26).

Para que esto se lleve a cabo, un fragmento de interés de DNA se inserta a un sitio específico de un DNA vector (vector de clonación) el cual permite introducir en una célula hospedera el fragmento de DNA que se quiere clonar y propicia su replicación. Como vector de clonación se utilizan con mayor frecuencia los plásmidos, los cuales son moléculas circulares de DNA bicatenario y se encuentran separados del DNA cromosómico de una célula (25).

Un plásmido debe poseer al menos tres características para ser utilizado como vector de clonación (como ejemplo el p.JET 1.2 que se muestra en la **figura 8** y se utilizó en el presente trabajo [ver metodología]):

- 1) Tener su propio origen de replicación y, por lo tanto, la capacidad de replicación autónoma e independiente del genoma del hospedero.

- 2) Tener un sitio de clonación múltiple que permite la apertura del DNA con enzimas de restricción (enzimas que cortan secuencias internas de DNA de manera específica).
- 3) Poseer marcadores genéticos seleccionables que permitan aislar a las células hospederas que contengan el vector (generalmente tienen marcadores de resistencia a un antibiótico).

Los tamaños de los plásmidos van desde unos pocos miles de bases hasta más de 100 kilobases (kb). Al igual que el DNA cromosómico de la célula huésped, el DNA del plásmido se duplica antes de cada división celular. Durante la división celular, se espera que por lo menos una copia del plásmido se agregue a cada célula hija, lo cual asegura la continuidad de la propagación del plásmido en generaciones sucesivas de la célula huésped (25).

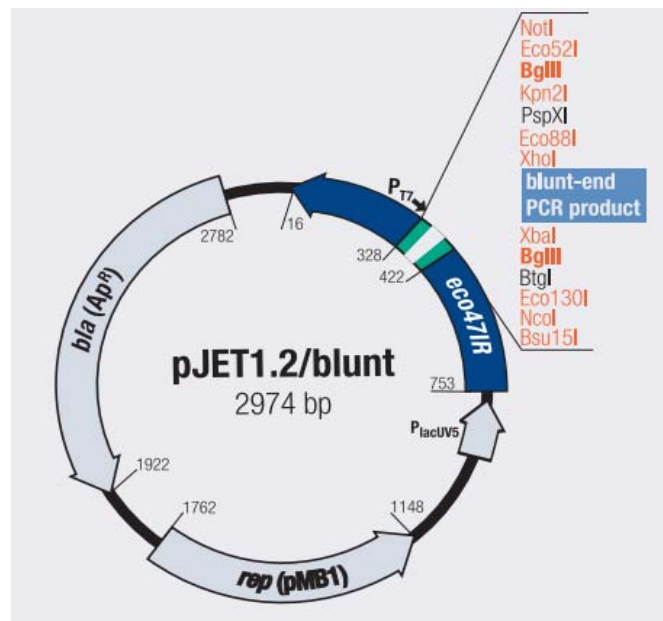


Figura 8. Mapa del vector de clonación pJET 1.2. Su origen de replicación se encuentra en la posición 1162 ± 1 pb, el sitio de clonación múltiple en la posición 422-328 pb y contiene un gen de β -lactamasa que le confiere resistencia a la ampicilina en la posición 2782-1922 pb. Fuente: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>.

Transformación

Existen varias técnicas para la introducción del vector de clonación en la célula como son la microinyección, la infección de una célula huésped con virus que contenga al vector, la microelectroporación y el choque térmico.

Durante el choque térmico, las bacterias que serán hospederas son pre-tratadas con agentes que ocasionan el aumento en su permeabilidad membranal. Entre estos se encuentran una temperatura elevada y el uso de iones que cambian la carga eléctrica de la membrana (por ejemplo el Ca^{2+}). Las células que han recibido un tratamiento apropiado para llevar a cabo la introducción del material genético se denominan células competentes ³⁰. Una vez que se introduce el material genético a las células competentes, se disminuye la temperatura y se diluye el ión que se utilizó para cambiar la carga de la membrana, con lo que se restaura la permeabilidad membranal. Al colocar a las células en condiciones óptimas de crecimiento se obtienen las células transformantes (25).

II. JUSTIFICACIÓN

En México el diagnóstico de las PIDs es difícil, por lo que se basa casi exclusivamente en el historial clínico del paciente. Debido a esto, la Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría se dedica al estudio fenotípico, funcional y molecular de las PIDs, con el objetivo de comprender mejor las bases moleculares de los procesos inmunitarios, además de proporcionar la información necesaria para apoyar el diagnóstico clínico con lo cual se puede ofrecer un tratamiento más específico a cada paciente y finalmente, dar un consejo genético a las familias afectadas. El SHIGM es una PID que se presenta con infecciones de difícil tratamiento y el pronóstico de vida para los pacientes no es alentador; por lo que desarrollar herramientas para que se pueda tener un diagnóstico preciso, oportuno y en poco tiempo ayudará a mejorar la calidad de vida del paciente, ya que si se identifica la enfermedad en edades

tempranas se podrá realizar un trasplante de médula ósea cuya probabilidad de éxito es mayor, lo cual se verá reflejado en una mejoría de la salud del paciente.

III. HIPÓTESIS

Los pacientes mexicanos diagnosticados con inmunodeficiencia humoral con fenotipo de SHIGM que presenten herencia ligada al cromosoma X mostrarán defecto en la proteína CD40L (CD154), esto debido a una mutación en el gen que codifica para esa proteína.

IV. OBJETIVO GENERAL

Analizar fenotípicamente y molecularmente a pacientes con diagnóstico clínico de SHIGM.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los porcentajes y números absolutos de las poblaciones de leucocitos (CD45+) por citometría de flujo: células B (CD19+), células T (CD3+, CD4+, CD8+), células NK (CD16+56+), monocitos y neutrófilos en pacientes con diagnóstico clínico de SHIGM y testigos sanos a partir de sangre periférica.
- Determinar los porcentajes y números absolutos de las subpoblaciones de células B CD19+ en PBMC's: células de memoria con cambio de isotipo (CD27+, IgD-), células de memoria sin cambio de isotipo (CD27+, IgD+), células naïve (CD27-, IgD+), células transicionales (CD24 alto, CD38 alto) y plasmablastos (CD24-, CD38 alto) en pacientes y testigos sanos.
- Determinar los porcentajes y números absolutos de las sub-poblaciones de las células T CD4+ en sangre periférica: células de memoria (CD45RO+) y células vírgenes (CD45RA+) en pacientes y testigos sanos.

- Determinar la expresión porcentual y en intensidad media de fluorescencia de CD40L (CD154) en células T activadas en pacientes y testigos sanos a partir de PBMC's.
- Determinar la presencia de mutaciones en el gen de CD40L utilizando el DNA genómico de los pacientes con diagnóstico clínico de SHIGM.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de investigación

Estudio transversal, prospectivo, descriptivo de pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de SHIGM.

Criterios de inclusión

- Los pacientes que se incluyeron en este estudio fueron varones con diagnóstico clínico de SHIGM según los criterios establecidos para el diagnóstico de inmunodeficiencias primarias (27). Dichos pacientes provinieron de la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México, del Servicio de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica del Hospital Civil de Guadalajara, Jalisco y del Departamento de Alergias del Hospital Universitario en Monterrey, Nuevo León.
- Los padres y/o tutores que aceptaron mediante la firma de consentimiento informado la participación de sus hijos en el estudio.

Criterios de exclusión

- Pacientes que reciban fármacos inmunosupresores.
- Aquellos pacientes en los que se detecten causas secundarias de hipogammaglobulinemia.

Criterios de eliminación

- Pacientes en quienes no se puedan obtener las muestras necesarias para realizar el estudio o que decidan retirarse del estudio.

Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de 12 mL de sangre periférica de los pacientes y controles sanos utilizando el sistema BD Vacutainer® en tubos con EDTA. De estas muestras se utilizó 1 mL para el análisis de poblaciones celulares, 3 mL para la obtención de DNA genómico y 8 mL para la obtención de PBMC's.

Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC'S)

La purificación de PBMC's se hizo a partir de sangre total la cual se separó por un gradiente de densidad y centrifugación utilizando Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich). Se recuperaron las PMBC's y se lavaron por duplicado con PBS estéril 1x (ver apéndice). El conteo celular se realizó utilizando una cámara de Neubauer, donde se colocó una mezcla de las PMBC's (5 µL) y azul de tripano (45 µL) (SIGMA). El número total de células se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{No. células totales} = \frac{\text{Campo 1} + \text{Campo 2} + \text{Campo 3} + \text{Campo 4}}{4} * \text{factor dilución} * 10000$$

Tinciones celulares para citometría de flujo

A las células de 6 pacientes y 6 controles sanos se les realizaron las siguientes tinciones y posteriormente se analizaron en un citómetro de flujo ARIAS 1:

- **Poblaciones linfocitarias y subpoblaciones de células T**

Se obtuvo una muestra de sangre total de los pacientes y testigos sanos para realizar la tipificación por citometría de flujo. Se realizaron diferentes tinciones para las cuales se emplearon 15 μ L de sangre periférica y los siguientes paneles de anticuerpos monoclonales: anti-CD45 FITC/anti-CD14 PE (BD); anti-CD3 FITC/anti-CD19 PE/anti-CD45 PerCP (BD); anti-CD4 FITC/anti-CD8 PE/anti-CD3 PerCP(BD); anti-CD3 FITC/anti-CD16+56 PE/anti-CD45 PerCP (BD); control de isotipo anti-CD45 PerCP/ γ 1 FITC/ γ 1 PE (BD) y antiCD45RA FITC/antiCD45RO PE/antiCD3 PerCP/antiCD4 APC (BD). Posteriormente las muestras fueron incubadas 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después se adicionaron 500 μ L de solución de lisis FACS (BD) para lisar los eritrocitos, se incubaron por 10 minutos más en oscuridad y a continuación se lavaron con 500 μ L de PBS 1x por duplicado. Finalmente las células se fijaron con 200 μ L de PBS conteniendo 1% de formaldehído y se analizaron en el citómetro de flujo.

- **Subpoblaciones de células B**

Las subpoblaciones de células B se determinaron a partir de una muestra de PBMC's a una densidad de 1×10^6 tanto para los pacientes como para los testigos. Las tinciones se llevaron a cabo con las siguientes mezclas de anticuerpos monoclonales: anti-CD27 PE/ anti-CD19 APC/anti-IgD FITC (BD); anti-CD24 PE/anti-CD38 APC/anti-CD19 FITC (BD). Posteriormente fueron incubadas 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Las muestras se lavaron con 500

μL de PBS 1x y se fijaron con 200 μL de PBS conteniendo 1% de formaldehído. Finalmente se analizaron en el citómetro de flujo.

- **Expresión de CD40 Ligando**

La expresión de CD154 se evaluó en células T activadas en presencia de estímulo y sin estímulo y se utilizó como muestra PBMC's tanto de testigo como paciente a una densidad de 2×10^6 células. Como estímulo se utilizaron 10 ng/mL de forbol 12-miristrato 13-acetato (PMA, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MO) y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ionomicina (Sigma, St Louis MO). Posteriormente las muestras se incubaron por 12 horas a 37°C, 10% CO_2 en medio RPMI 1640 (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MO) suplementado con 10% SFB (PAA; Australia), 1mM L-glutamina, penicilina en 100 unidades/mL y estreptomina a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (GIBCO).

Después de la incubación se realizó una tinción con la siguiente mezcla de anticuerpos: anti-CD3 PerCP (BD), anti-CD154 PE (BD) y anti-CD69 FITC (BD) y se procedió a incubarla 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Las muestras se lavaron con 500 μL de PBS 1x y se fijaron con 200 μL de PBS conteniendo 1% de formaldehído. Finalmente se analizaron en el citómetro de flujo.

Técnicas de biología molecular

- **Extracción de DNA genómico**

Se adicionó un buffer de lisis de eritrocitos (ver apéndice) a la muestra de sangre total en una proporción 1:3, se incubó 10 minutos a 4°C y posteriormente se centrifugó. Se volvió a adicionar la misma cantidad de buffer de lisis de eritrocitos, se incubó 10 minutos más y se centrifugó a las mismas condiciones. Posteriormente se resuspendió el pellet en buffer de lisis de leucocitos (Leukocyte lysis, Promega) y se

agregó solución precipitadora de proteínas (Protein precipitation solution, Promega). Se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a otro tubo donde se le adicionó el mismo volumen de isopropanol (2-propanol for molecular biology, SIGMA). Se mezcló lentamente por inversión hasta que apareció la hebra y se centrifugó a velocidad máxima por 10 minutos temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados con 1 mL de etanol al 75% (Ethanol for molecular biology, Sigma-Aldrich) y después de dejar secar por completo se resuspendió con solución rehidratadora para DNA (DNA rehydration solution, Promega) y se cuantificó la concentración de DNA genómico utilizando el equipo Epoch (Bio Tek).

- **Amplificación de CD40L por PCR**

Para realizar la amplificación del gen CD40L a partir de DNA genómico se utilizaron iniciadores para cada uno de los exones que componen al gen (**tabla 3**). Las condiciones de todas las reacciones de PCR realizadas se muestran en la **tabla 2**:

Tabla 2. Reactivos utilizados en el PCR de CD40L

Reactivo	Volumen
Buffer 10x	2.5 μ L
MgCl ₂	1.5 μ L
dNTPs	0.5 μ L
Iniciador sentido 25 μ M	0.15 μ L
Iniciador antisentido 25 μ M	0.15 μ L
Taq DNA Polimerasa	0.125 μ L
DNA genómico	1 μ L
Agua estéril	6.6 μ L

Nota: volumen final 12.5 μ L

Tabla 3. Iniciadores empleados para amplificar los exones de CD40L a partir de DNA genómico

DNA Genómico	Iniciador Sentido (5' – 3')	Iniciador antisentido (5' – 3')	Fragmento (pb)	Ref.
E1-CD40L	CTCATGCTGCCT CTGCCAC	CCTATGAATTAGTAAG GACCC	285	(28)
E2-CD40L	CATTAGCTGTAT TCTCCTTCC	GACACTTTTACCAGTA ATTAAGC	221	(28)
E3-CD40L	TTTACTTCCAGA TTCTCCCCTG	TCGGCATTAAAGGAA CACATCC	447	(28)*
E4-CD40L	TGTAGAACTGGA CCAGATAG	GGTAACATGACTTCG GCATC	205	(28)
E5-CD40L	CTCTGCTTCACC TCACCAC	TTATGAAGACTCCCA GCGTC	478	(28)

*Se modificó del mencionado en el artículo.

Las condiciones de amplificación del PCR se ilustran en la **figura 9**:

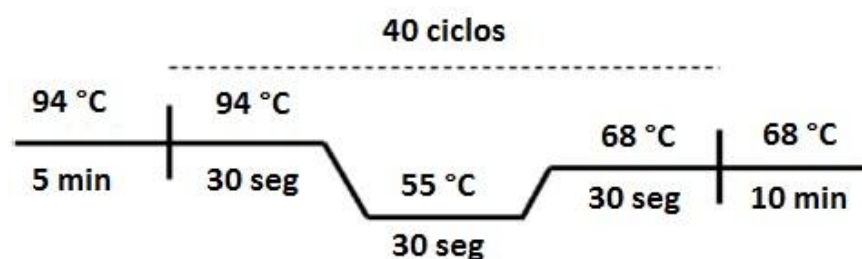


Figura 9. Condiciones del PCR para CD40L.

Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa

Una vez realizadas las diferentes reacciones de PCR, se determinó la longitud de los amplificadores utilizando 5 µL de cada muestra y agarosa al 2% preparada con TBE 1x (ver apéndice). La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 minutos en una cámara. Posteriormente los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio con una concentración de 0.5 µg/mL (SIGMA). Finalmente se visualizaron los productos amplificados en un transluminador de luz ultravioleta (Molecular Image Chemi Doc™ XRST, BIO RAD). El tamaño de los amplificadores se determinó con el uso de un marcador de peso molecular para DNA (Mass Rule DNA Ladder, Thermo Scientific).

Clonación de productos de PCR

Los productos de las reacciones de PCR se ligaron con el vector pJET 1.2, de acuerdo al protocolo descrito para el CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific):

Se adicionaron diversos reactivos para cada producto de PCR como se indica en la **tabla 4**:

Tabla 4. Reactivos utilizados en la clonación de los productos de PCR

Reactivo	Volumen
Buffer 2x	5 μ L
Producto PCR	1 μ L
Agua libre de nucleasas	2.5 μ L
DNA blunting enzyme	0.5 μ L

Nota: volumen final 9 μ L

Se realizó una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente y después se incubó a 70°C por 5 min.

Posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos (**tabla 5**):

Tabla 5. Reactivos utilizados en la ligación del plásmido

Reactivo	Volumen
pJET 1.2/blunt vector (50 ng/ μ L)	0.5 μ L
T4 DNA ligasa	0.5 μ L

Nota: volumen final 10 μ L.

Se incubaron por 30 minutos a 22°C y se utilizaron células competentes de *Escherichia coli* TOP10 para realizar la transformación con el producto de ligación. Después se incubaron 30 minutos en hielo y se realizó un choque térmico a 42°C por un minuto. Se adicionaron 250 µL medio líquido LB y se dejaron incubar por una hora a 37°C; por último se plaquearon en un agar LB y se dejaron incubar 12 horas a 37°C.

Selección de colonias positivas

Se seleccionaron un promedio de 18 colonias y todas se resembraron en una placa de medio LB con ampicilina previamente marcada e identificada con cuadrantes, paso siguiente, cada colonia se resuspendió en 6 µL de agua inyectable y se realizó una reacción de PCR bajo las condiciones que se muestran en la **tabla 6** y **figura 10**, utilizando como iniciadores el pJET1.2 sentido y antisentido (**tabla 7**):

Tabla 6. Reactivos utilizados en el PCR de colonia

Reactivo	Volumen
Buffer 10x	1 µL
MgCl ₂	0.6 µL
dNTPs	0.2 µL
Iniciador sentido pJET (25 M)	0.16 µL
Iniciador antisentido pJET (25 M)	0.16 µL
Taq polimerasa	0.05 µL
H ₂ O	1.83 µL

Nota: volumen final 10 µL

Tabla 7. Iniciadores del pJET1.2 empleados en el PCR de colonias

Iniciador Sentido (5' – 3')	Iniciador antisentido (5' – 3')
CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

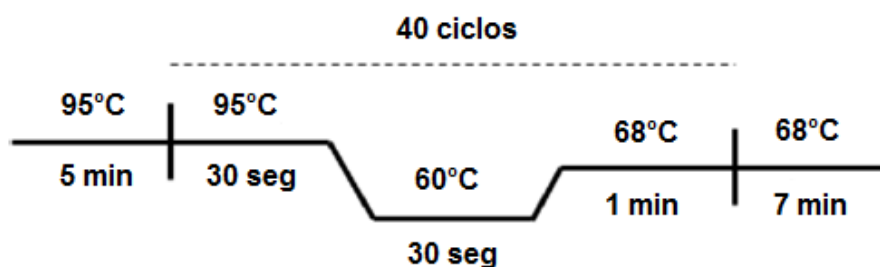


Figura 10. Condiciones de PCR para la selección de colonias.

Purificación del plásmido

Las colonias seleccionadas se resembraron en 5 mL de medio LB con ampicilina y se dejaron incubar 12 horas a 37°C con agitación constante. La purificación del plásmido se realizó siguiendo el protocolo establecido para el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

Reacción de secuenciación y purificación

A cada muestra de plásmido purificado se le adicionaron 2.7 µL de la siguiente mezcla de reacción (**tabla 8**) utilizando los iniciadores el pJET1.2 sentido y antisentido y utilizando las condiciones de reacción de PCR que se muestran en la **figura 11**:

Tabla 8. Reactivos utilizados en la reacción de secuenciación

Reactivo	Volumen
Buffer 5x	1 μ L
Big Dye v.3.1	0.6 μ L
Iniciador sentido/antisentido pJET (25 M)	0.16 μ L
H2O	1.83 μ L
Muestra	6.41 μ L

Nota: volumen final 10 μ L

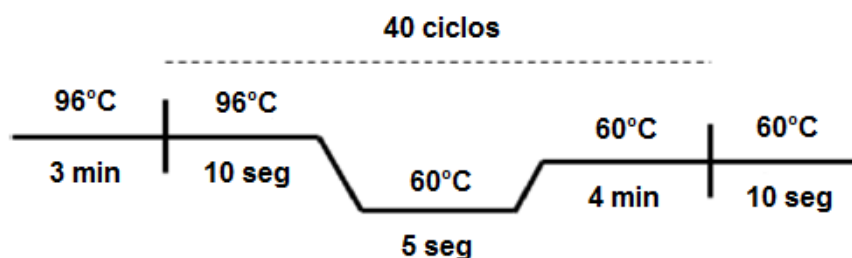


Figura 11. Condiciones de PCR para la reacción de secuenciación.

Posteriormente se realizó la purificación de cada muestra siguiendo el protocolo del kit X-Terminator v3.1.

Secuenciación y análisis

La secuenciación de las muestras se realizó en el Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), en un secuenciador capilar ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) de 4 capilares teniendo como muestras a los plásmidos purificados y empleando los iniciadores pJET 1.2 sentido y antisentido. Los resultados de las secuencias se analizaron empleando el programa 4 Peak y dichas secuencias se compararon con las reportadas en la página de Ensembl. Los números de acceso para CD154: ENSG00000102245 (Ensembl) y NP_000065.1 (NCBI).

VII. RESULTADOS

Características clínicas y valores de inmunoglobulinas de los pacientes

Nuestra población de estudio contó con un total de 6 pacientes masculinos con diagnóstico clínico de SHIGM cuyas edades varían entre 8 meses y 4 años.

Los síntomas más comunes fueron: infección de vías respiratorias (100%), neumonía (82%) y diarrea crónica (50%) como se muestra en la **tabla 9**. Los microorganismos reportados en estos pacientes como causantes de las infecciones fueron: *Candida albicans*, *Cryptosporidium parvum*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* y virus como el del *Parvovirus*, *Enterovirus*, *Rhinovirus*.

La edad promedio de los pacientes fue de 2 años y los valores basales promedio de las inmunoglobulinas séricas fueron de 81 mg/dL para la IgM, 20 mg/dL para la IgA y 298 mg/dL para la IgG (tabla 9).

Tabla 9. Valores de las inmunoglobulinas séricas y características clínicas de los seis pacientes

NO. PACIENTE	EDAD	GENERO	IgM (mg/dL)	IgA (mg/dL)	IgG (mg/dL)	IgE (UI/mL)	INFECCIONES DE VIAS RESPIRATORIAS	NEUMONÍA	DIARREA CRÓNICA	GASTROENTERITIS	SEPSIS	ANEMIA	MENONGITIS POR TB
1	4 AÑOS	M	52.0	<23.6	162.0	No detectable	+	-	-	-	-	-	+
2	1 AÑO	M	29.3	<6.3	816.0	<1.0	+	+	-	-	-	-	-
3	2 AÑOS	M	261.7	53.9	379.0	2.6	+	+	+	+	+	-	-
4	1 AÑO	M	69.0	27.0	364.0	*	+	+	-	+	+	+	-
5	8 MESES	M	39.0	1.0	11.0	0.96	+	+	+	-	-	-	-
6	1 AÑO	M	35.2	<5.9	55.4	No detectable	+	+	+	-	-	-	-

*No se posee el dato.

Tabla 10. Valores de referencia de las inmunoglobulinas séricas en población pediátrica (29).

EDAD	IgM (mg/dL)	IgA (mg/dL)	IgG (mg/dL)	IgE (UI/mL)
7-9 MESES	32-119	10.8-89	208-867	1.4-52.3
1 AÑO	40-161	13-104	331-1164	0.4-351.6
2 AÑOS	45-159	13-121	402-1008	0.4-351.6
4-5 AÑOS	40-186	24-152	444-1186	0.4-351.6

Tabla 11. Resumen de las características clínicas de los seis pacientes

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES (n=6)	
Promedio de edad (años)	2
Infección de las vías respiratorias	6 (100%)
Neumonía	5 (83%)
Diarrea crónica	3 (50%)
Sepsis	2 (33%)
Gastroenteritis	2 (33%)
Anemia	1 (17%)
Meningitis por TB	1 (17%)
Promedio IgM basal (mg/dL)	81
Promedio IgA basal (mg/dL)	20
Promedio IgG basal (mg/dL)	298

Poblaciones leucocitarias

Se determinó la proporción de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica, tanto en los pacientes (n=6) como en testigos sanos (n=6), empleando una doble tinción con anti-CD45 FITC y anti-CD14 PE, como se muestra en la **figura 12**.

Con base en los resultados obtenidos en la **figura 12** y con el dato de la cantidad de leucocitos por mm³ en sangre obtenido en cámara de Neubauer, se pudo calcular el número absoluto de cada una de las poblaciones leucocitarias de sangre periférica (**tabla 12**) por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{No. de linfocitos, monocitos o polimorfonucleares} = \frac{(\text{Número de leucocitos mm}^3) * (\text{Porcentaje de linfocitos, monocitos o polimorfonucleares})}{100}$$

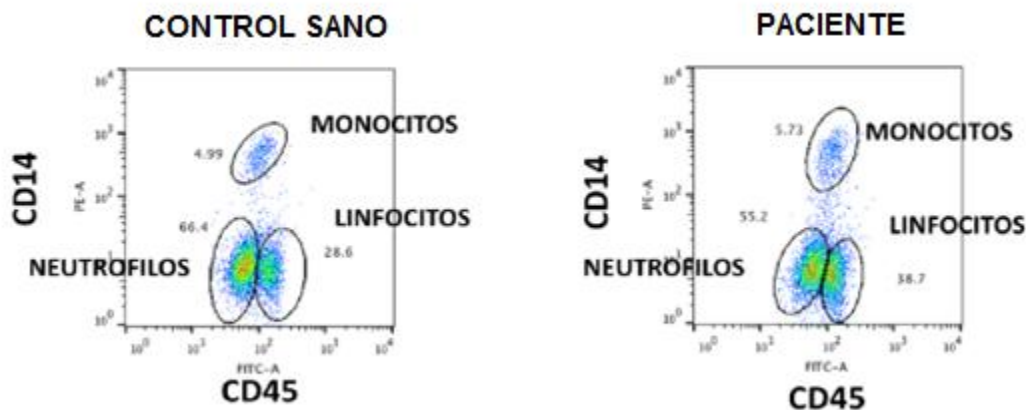


Figura 12. Porcentaje de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica en control sano y paciente. La mezcla de anticuerpos empleada fue anti-CD45FITC y anti-CD14PE. Se muestran las gráficas de dot plot CD45 FITC vs CD14PE.

A continuación en las **tablas 12, 13 y 14** se muestran los valores porcentuales y absolutos de las poblaciones leucocitarias en controles sanos y pacientes, así como sus valores de referencia:

Tabla 12. Porcentajes y números absolutos de los leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos en los controles sanos

NO. CONTROL SANO	GENERO	LEUCOCITOS TOTALES (mm3)	NEUTROFILOS (%)	NEUTROFILOS (mm3)	LINFOCITOS TOTALES (%)	LINFOCITOS TOTALES (mm3)	MONOCITOS (%)	MONOCITOS (mm3)
1	M	4850	55	2668	33	1601	6	291
2	F	7000	66	5246	29	2408	5	688
3	F	6533	63	4116	21	1372	5	327
4	M	5500	66	4148	23	915	4	488
5	M	8800	73	6424	20	1760	2	176
6	F	7820	47	3675	39	3050	8	626

Tabla 13. Porcentajes y números absolutos de los leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos en los seis pacientes

NO. PACIENTE	LEUCOCITOS TOTALES (mm3)	NEUTROFILOS (%)	NEUTROFILOS (mm3)	LINFOCITOS TOTALES (%)	LINFOCITOS TOTALES (mm3)	MONOCITOS (%)	MONOCITOS (mm3)
1	4500	49	2205	31	1395	14	630
2	7567	14	1059	74	5600	3	227
3	13000	55	7150	39	5070	6	780
4	3900	34	1326	41	1599	17	663
5	15275	46	7027	35	5346	9	1375
6	10000	14	1400	79	7900	5	500

Tabla 14. Valores de referencia en valores porcentuales y absolutos de neutrófilos, linfocitos y monocitos (30)

EDAD	NEUTROFILOS (%)	NEUTROFILOS (mm3)	LINFOCITOS TOTALES (%)	LINFOCITOS TOTALES (mm3)	MONOCITOS (%)	MONOCITOS (mm3)
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 13, 14, 15 y 16 se muestra el análisis estadístico de las poblaciones leucocitarias en controles sanos y pacientes:

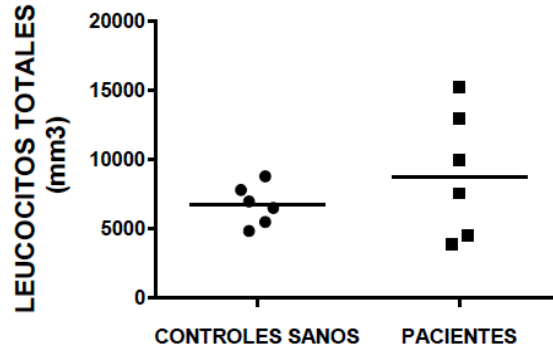


Figura 13. Análisis estadístico de los leucocitos totales en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores absolutos, de los leucocitos totales en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente.

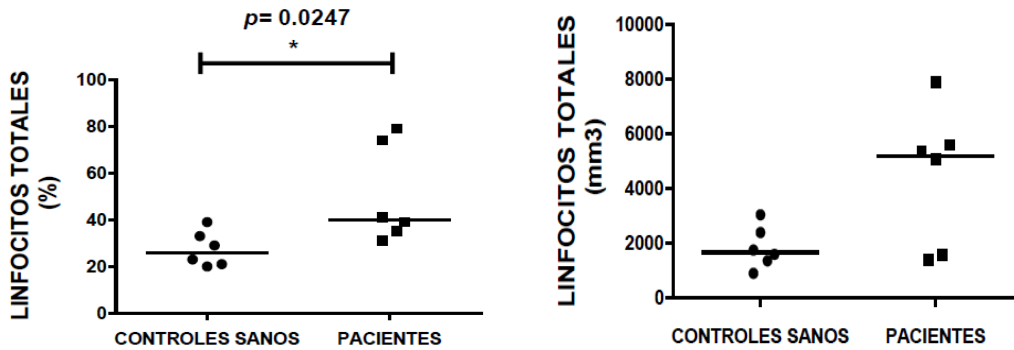


Figura 14. Análisis estadístico de los linfocitos totales en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de los linfocitos totales en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente. (*) Diferencia significativa, $p < 0.05$; (**) muy significativa, $p < 0.01$; y (***) altamente significativa, $p < 0.001$.

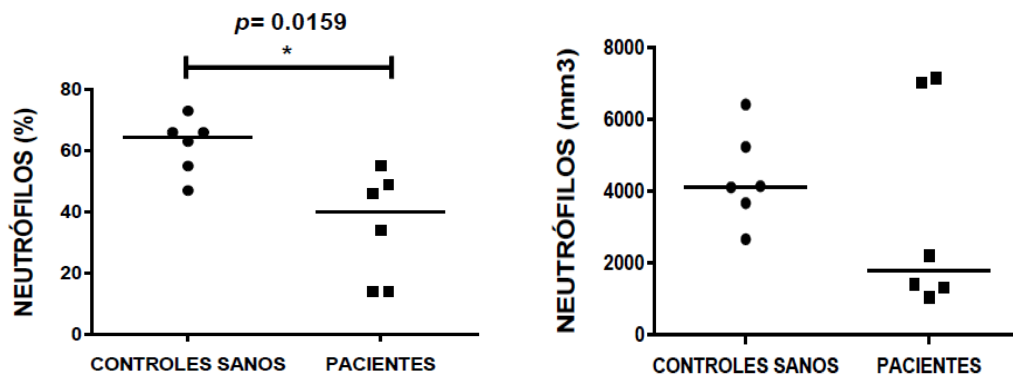


Figura 15. Análisis estadístico de los neutrófilos en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de los neutrófilos en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente. (*) Diferencia significativa, $p < 0.05$; (**) muy significativa, $p < 0.01$; y (***) altamente significativa, $p < 0.001$.

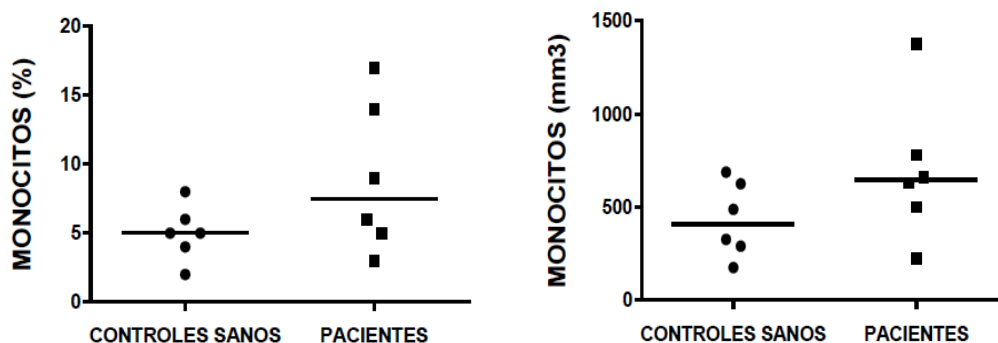


Figura 16. Análisis estadístico de los monocitos en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de los monocitos en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente.

Como se desprende de las figuras anteriores, no existe una diferencia estadísticamente significativa en las poblaciones de leucocitos totales y monocitos, aunque los linfocitos totales y los neutrófilos si muestran una difencia significativa en su porcentaje ($p=0.0247$ y $p=0.0159$ respectivamente).

Poblaciones de células T, B y NK

Se llevaron a cabo tinciones triples como se explica a continuación: para las células T y B se utilizaron los anticuerpos anti-CD3 FITC/anti-CD19 PE/anti-CD45 PerCP y para las células NK se emplearon los anticuerpos anti-CD3 FITC/ anti-CD16+56 PE/anti-CD45 PerCP.

La proporción de las poblaciones de células T, B ó NK se realizó dentro de una región de células CD45+, a partir de la cual se muestra la proporción de las células CD3+, CD19+ y CD16+56+ (figura 17).

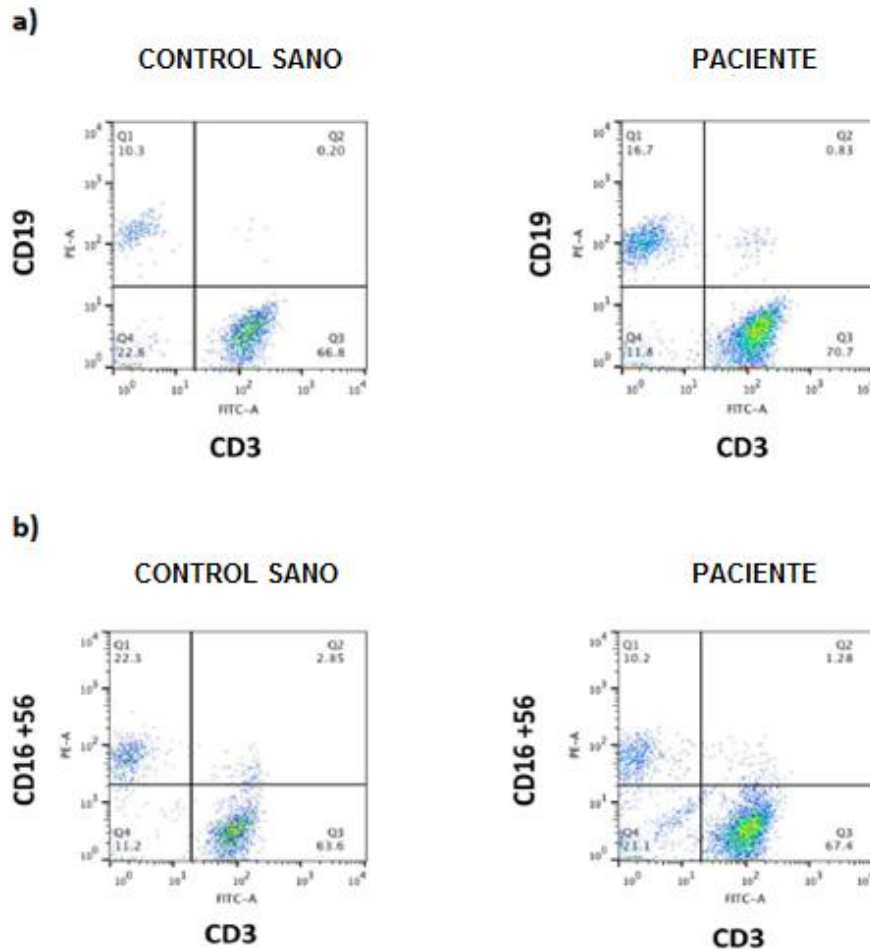


Figura 17. Porcentaje de las poblaciones de células T, B y NK en control sano y paciente. En la figura a) se muestran las poblaciones de células T y B y en la figura b) las células NK tanto en control sano como en paciente. El análisis de cada población se realizó sobre una región de células CD45+, a partir de la cual se muestra la proporción de las células T (CD3+), B (CD19+) y NK (CD16+56+).

A continuación en las **tablas 15, 16, 17, 18, 19 y 20** se muestran los porcentajes y números absolutos de las células T CD3+, B CD19+ y NK CD16+56+ en controles sanos y pacientes, así como sus valores de referencia:

Tabla 15. Porcentajes y números absolutos de las células T CD3+ y las células B CD19+ en los controles sanos

NO. CONTROL SANO	CELULAS T CD3+ (%)	CELULAS T CD3+ (mm3)	CELULAS B CD19+ (%)	CELULAS B CD19+ (mm3)
1	67	1073	10	160
2	70	1685	6	144
3	61	837	33	453
4	81	741	10	92
5	65	1144	11	194
6	64	1952	24	732

Tabla 16. Porcentajes y números absolutos de las células T CD3+ y las células B CD19+ en los seis pacientes

NO. PACIENTE	CELULAS T CD3+ (%)	CELULAS T CD3+ (mm3)	CELULAS B CD19+ (%)	CELULAS B CD19+ (mm3)
1	63	879	25	349
2	71	3976	17	952
3	68	3448	24	1217
4	54	864	28	448
5	29	1550	34	1818
6	65	5135	31	2449

Tabla 17. Valores de referencia en valores porcentuales y absolutos de las células T CD3+ y las células B CD19+ (31)

EDAD	CELULAS T CD3+ (%)	CELULAS T CD3+ (mm3)	CELULAS B CD19+ (%)	CELULAS B CD19+ (mm3)
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

Tabla 18. Porcentajes y números absolutos de las células NK CD16+56+ en los controles sanos

NO. CONTROL SANO	CELULAS NK CD16+56+ (%)	CELULAS NK CD16+56+ (mm3)
1	25	400
2	16	385
3	7	96
4	19	174
5	29	510
6	17	519

Tabla 19. Porcentajes y números absolutos de las células NK CD16+56+ en los seis pacientes

NO. PACIENTE	CELULAS NK CD16+56+ (%)	CELULAS NK CD16+56+ (mm3)
1	12	167
2	11	616
3	4	203
4	19	304
5	28	1497
6	4	316

Tabla 20. Valores de referencia en valores porcentuales y absolutos de las células NK CD16+56+ (31)

EDAD	CELULAS NK CD16+56+ (%)	CELULAS NK CD16+56+ (mm3)
6-12 MESES	3-15	160-950
1-2 AÑOS	3-15	180-920
2-6 AÑOS	4-17	130-720

En las **figuras 18, 19 y 20** se muestran los análisis estadísticos de las células T CD3+, B CD19+ y NK 16+56+ en controles sanos y pacientes:

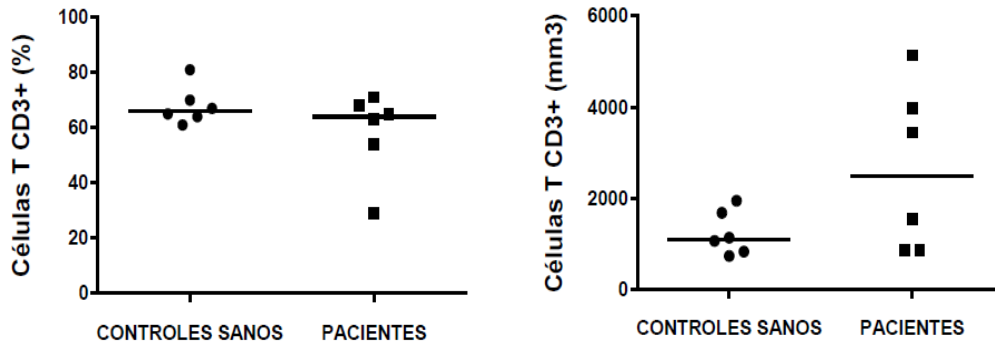


Figura 18. Análisis estadístico de las células T CD3+ en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de las células T CD3+ en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente.

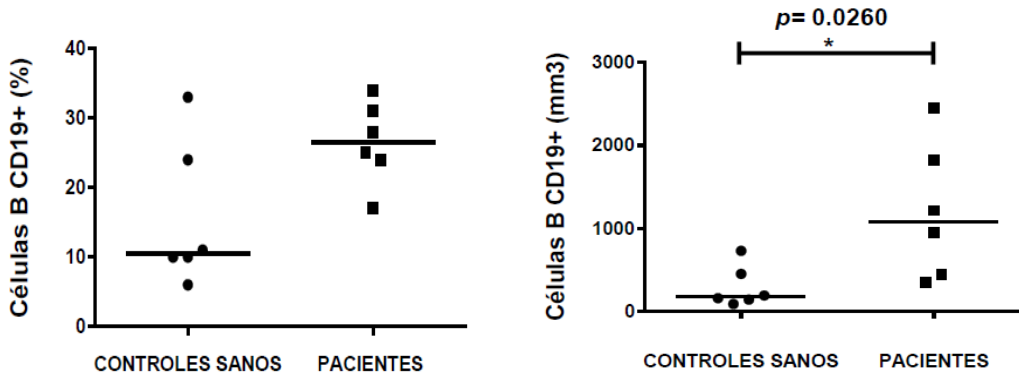


Figura 19. Análisis estadístico de las células B CD19+ en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de las células B CD19+ en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente. (*) Diferencia significativa, $p < 0.05$; (**) muy significativa, $p < 0.01$; y (***) altamente significativa, $p < 0.001$.

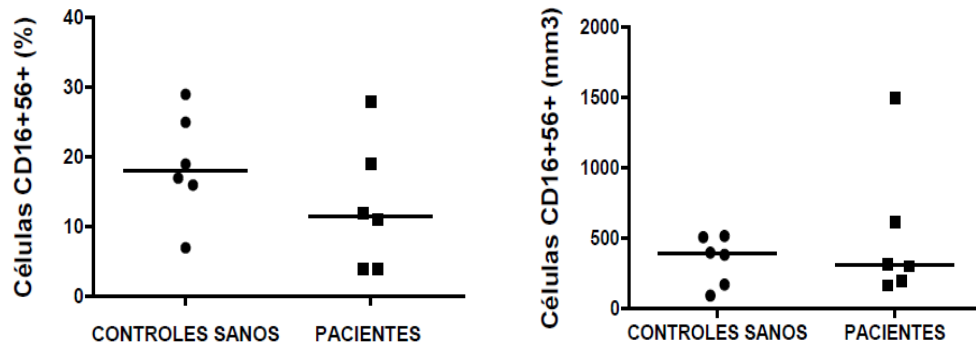


Figura 20. Análisis estadístico de las células NK CD16+56+ en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de las células CD16+56+ en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente.

Como se desprende de las figuras anteriores, se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas en las células T CD3+ y células NK CD16+56+. Solamente las células B CD19+ mostraron una diferencia significativa en los números absolutos ($p=0.0260$).

Subpoblaciones de células T

Para llevar a cabo la determinación de las subpoblaciones de células T, se llevaron a cabo una tinción triple y una cuádruple como se explica a continuación: para las células T CD4+ y CD8+ se utilizaron los anticuerpos anti-CD4 FITC/anti-CD8 PE/anti-CD3 PerCP; para las células T CD4+ CD45RO+ (memoria) y T CD4+ CD45RA+ (naïve) se utilizaron los anticuerpos anti-CD45RA FITC/anti-CD45RO PE/anti-CD3 PerCP/anti-CD4 APC.

En el caso de las proporciones de las células CD4+ y CD8+ se determinaron dentro de una región de células CD3+, a partir de la cual se muestran las proporciones de las células T CD4+ y T CD8+ como se muestra en la **figura 21**. En el caso de las proporciones de las células T CD4+ CD45RO+ y T CD4+ CD45RA+ primero se determinaron dentro de una región de células CD3+ y posteriormente dentro de una región de células T CD4+, a partir de la cual se

muestran las proporciones de las células T CD4+ naïve (CD45RA+) y de memoria (CD45RO+) como se muestra en la **figura 22**.

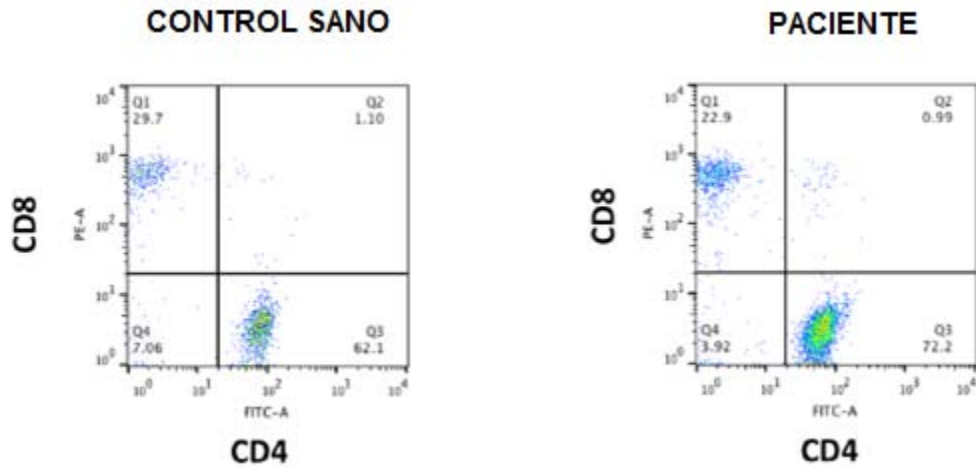


Figura 21. Porcentaje de las células T CD4+ y CD8+ en una muestra de control sano y paciente. Las gráficas que se muestran se realizaron capturando las células dentro de una región CD3+.

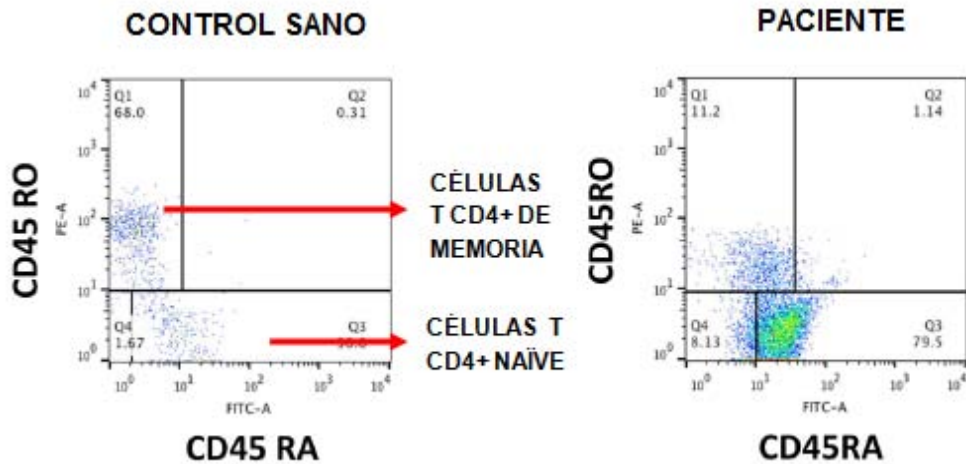


Figura 22. Porcentaje de las células T CD4+ CD45RA+ (naïve) y T CD4+ CD45RO+ (memoria) en una muestra de control sano y paciente. Las gráficas que se muestran se realizaron capturando células dentro de una región CD3+ y posteriormente de una región CD4+.

A continuación en las **tablas 21, 22, 23, 24, 25 y 26** se muestran los valores porcentuales y absolutos de las células T CD4+, T CD8+, T CD4+ CD45RO+ y T CD4+ CD45RA+ en controles sanos y pacientes, así como sus valores de referencia:

Tabla 21. Porcentajes y números absolutos de las células T CD4+ y T CD8+ en controles sanos

NO. CONTROL SANO	CELULAS T CD4+ (%)	CELULAS T CD4+ (mm3)	CELULAS T CD8+ (%)	CELULAS T CD8+ (mm3)
1	62	665	30	322
2	62	1045	29	489
3	62	519	34	285
4	68	504	30	222
5	60	686	34	389
6	53	1035	39	761

Tabla 22. Porcentajes y números absolutos de las células T CD4+ y T CD8+ en pacientes

NO. PACIENTE	CELULAS T CD4+ (%)	CELULAS T CD4+ (mm3)	CELULAS T CD8+ (%)	CELULAS T CD8+ (mm3)
1	69	607	19	167
2	72	2863	23	914
3	50	1723	42	1448
4	60	518	38	328
5	57	884	35	543
6	76	3903	23	1181

Tabla 23. Valores de referencia en valores porcentuales y absolutos de las células T CD4+ y T CD8+ (31)

EDAD	CELULAS TCD4+ (%)	CELULAS TCD4+ (mm3)	CELULAS TCD8+ (%)	CELULAS TCD8+ (mm3)
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

Tabla 24. Porcentajes y números absolutos de las células TCD4+ CD45RO+ y TCD4+ CD45RA+ en controles sanos

NO. CONTROL SANO	CELULAS TCD4+ CD45RO+ MEMORIA (%)	CELULAS TCD4+ CD45RO+ MEMORIA (mm3)	CELULAS TCD4+ CD45RA+ NAIVE (%)	CELULAS TCD4+ CD45RA+ NAIVE (mm3)
1	*	*	*	*
2	*	*	*	*
3	*	*	*	*
4	68	343	30	151
5	69	473	24	165
6	65	673	28	290

*No se posee el dato

Tabla 25. Porcentajes y números absolutos de las células TCD4+ CD45RO+ y TCD4+ CD45RA+ en los seis pacientes

NO. PACIENTE	CELULAS TCD4+ CD45RO+ MEMORIA (%)	CELULAS TCD4+ CD45RO+ MEMORIA (mm3)	CELULAS TCD4+ CD45RA+ NAIVE (%)	CELULAS TCD4+ CD45RA+ NAIVE (mm3)
1	13	79	77	467
2	15	429	85	2434
3	11	190	80	1378
4	5	26	91	472
5	34	301	62	548
6	7	273	92	3591

Tabla 26. Valores de referencia en valores porcentuales y números absolutos de las células TCD4+ CD45RO+ y TCD4+ CD45RA+ (31)

EDAD	CELULAS TCD4+ CD45RO+ MEMORIA (%)	CELULAS TCD4+ CD45RO+ MEMORIA (mm3)	CELULAS TCD4+ CD45RA+ NAIVE (%)	CELULAS TCD4+ CD45RA+ NAIVE (mm3)
6-12 MESES	5-18	160-800	64-93	1100-3700
1-2 AÑOS	7-20	210-850	63-91	1000-2900
2-6 AÑOS	9-26	220-660	53-86	430-1500

En las **figuras 23, 24, 25 y 26** se muestran el análisis estadístico de las células T CD4+, T CD8+, T CD4+ CD45RO+ y T CD4+ CD45RA+ en controles sanos y pacientes:

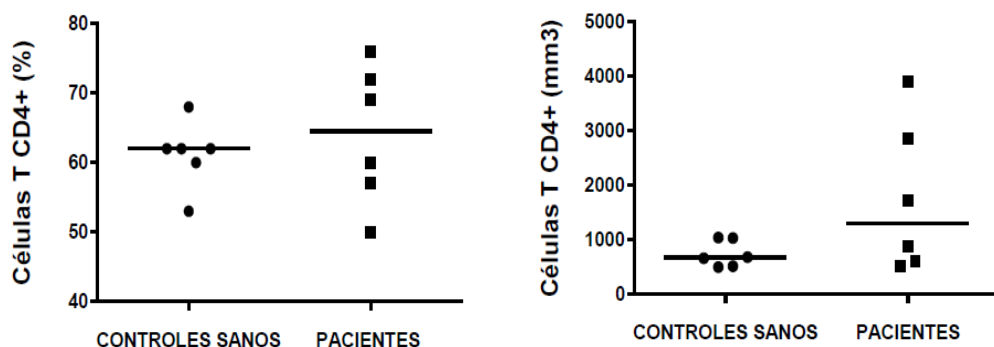


Figura 23. Análisis estadístico de las células T CD4+ en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de las células T CD4+ en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente.

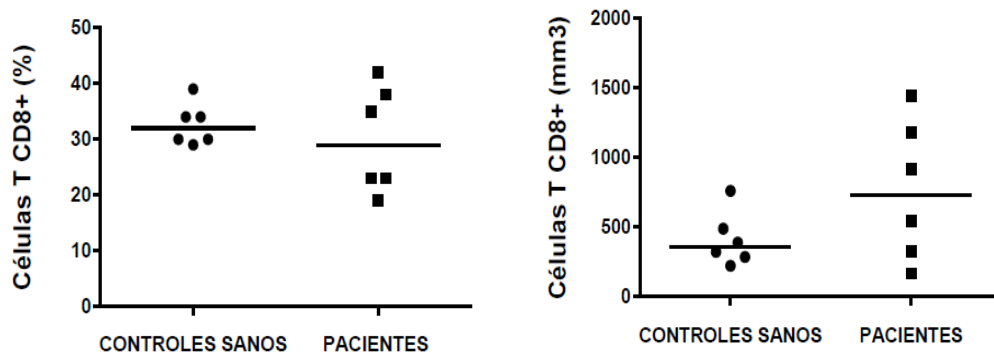


Figura 24. Análisis estadístico de las células T CD8+ en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de las células T CD8+ en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente.

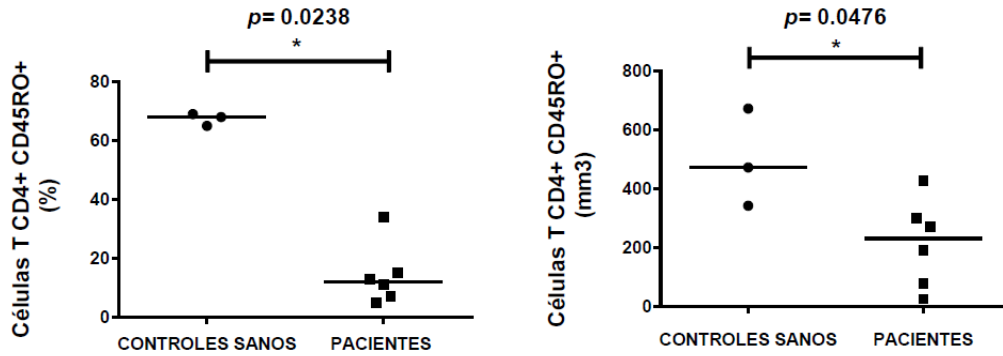


Figura 25. Análisis estadístico de las células T CD4+ CD45RO+ en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de las células T CD4+ CD45RO+ en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente. (*) Diferencia significativa, $p < 0.05$; (**) muy significativa, $p < 0.01$; y (***) altamente significativa, $p < 0.001$.

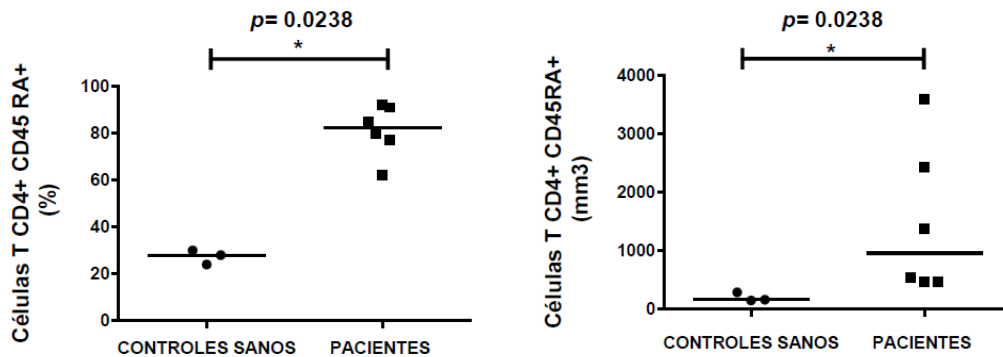


Figura 26. Análisis estadístico de las células T CD4+ CD45RA+ en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de las células T CD4+ CD45RA+ en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente. (*) Diferencia significativa, $p < 0.05$; (**) muy significativa, $p < 0.01$; y (***) altamente significativa, $p < 0.001$.

Como se desprende de las figuras anteriores, se observó que no existieron diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta a las células T CD4+ y TCD8+; sin embargo, las subpoblaciones de las células T CD4+ CD45RO+ si mostraron diferencias significativas tanto en valores porcentuales como en números absolutos ($p=0.0238$ y $p=0.0476$ respectivamente), así como las células TCD4+ CD45RA+ también mostraron diferencias significativas tanto en valores

porcentuales como en números absolutos ($p=0.0238$ y $p=0.0238$ respectivamente).

Subpoblaciones de células B

Para llevar a cabo la determinación de las subpoblaciones de células B, se realizaron tinciones triples como se explica a continuación: para conocer las células B CD19+ de memoria se utilizaron los anticuerpos anti-CD27 PE/anti-CD19 APC/anti-IgD FITC; mientras que para conocer los plasmablastos y las células transicionales se utilizaron los anticuerpos anti-CD24 PE/anti-CD38 APC/ anti-CD19 FITC. En todos los casos primero se determinaron las células dentro de una región de células B CD19+, a partir de la cual se muestran las proporciones de las células B CD19+ de memoria, transicionales y plasmablastos.

En la determinación de las células B de memoria se analizó la expresión de CD27 (**figura 27**), así como también se analizó la expresión de los plasmablastos (CD24- CD38 alto) y de las células B transicionales (CD24 alto CD38 alto) (**figura 28**).

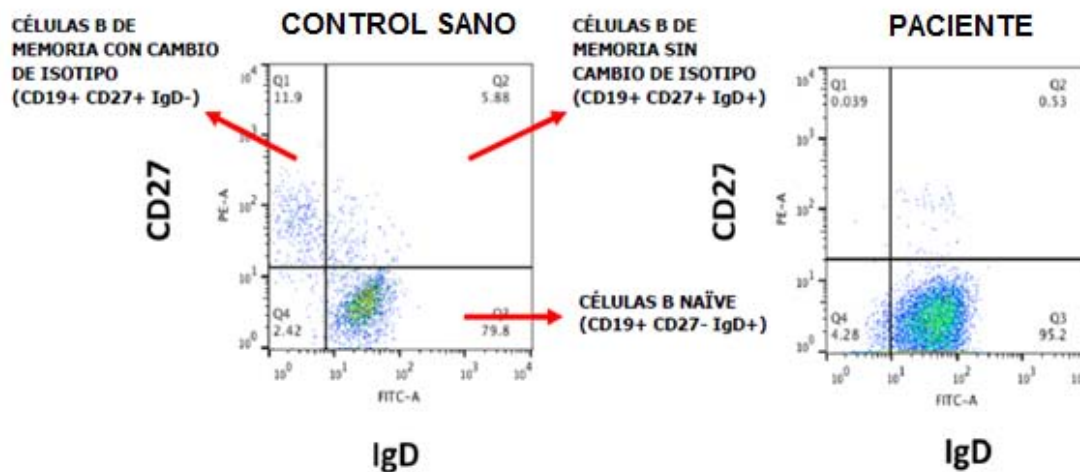


Figura 27. Porcentaje de subpoblaciones de células B CD19+: células naïve, células de memoria sin cambio y con cambio de isotipo en una muestra de control sano y paciente. Las gráficas que se muestran se realizaron capturando células dentro de una región CD19+. En el cuadrante superior izquierdo, se encuentran las células B de memoria con cambio de isotipo (CD19+ CD27+ IgD-); en el cuadrante superior derecho, las células B de memoria sin cambio de isotipo (CD19+ CD27+ IgD+); y en el cuadrante inferior derecho, se muestran las células B naïve (CD19+ CD27- IgD+).

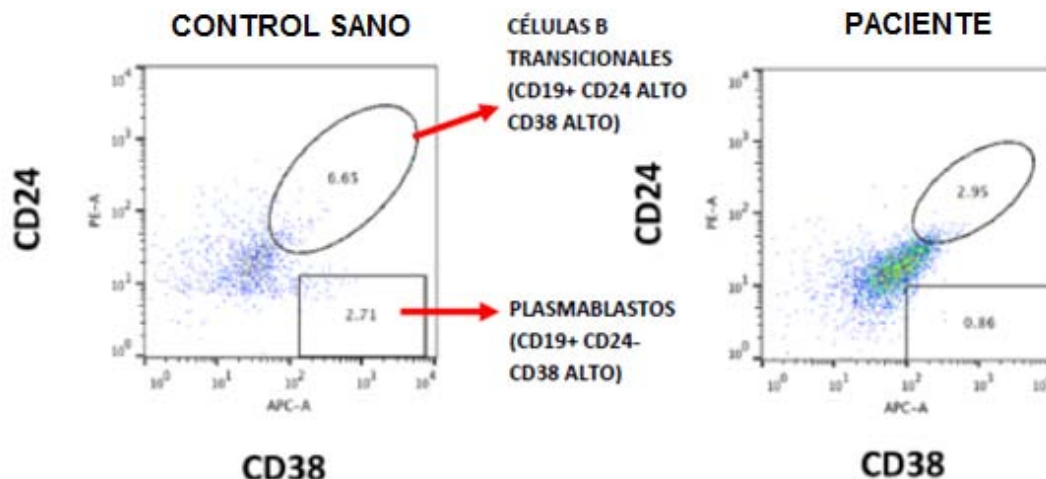


Figura 28. Porcentaje de subpoblaciones de células B CD19+: células transicionales y plasmablastos en una muestra de control sano y paciente. Las gráficas que se muestran se realizaron capturando células dentro de una región CD19+. En la parte superior se muestran las células B transicionales (CD19+ CD24 alto CD38 alto) y en la parte inferior se muestran los plasmablastos (CD19+ CD24- CD38 alto).

A continuación en las **tablas 27, 28, 29, 30, 31 y 32** se muestran los valores porcentuales y absolutos de las células B de memoria con cambio y sin cambio de isotipo, las células B naïve, las células transicionales y los plasmablastos en controles sanos y pacientes, así como sus valores de referencia:

Tabla 27. Porcentaje y números absolutos de las células B naïve, células B de memoria con cambio y sin cambio de isotipo, y células B de memoria total en controles sanos

NO. CONTROL SANO	CELULAS B NAIVE (%)	CELULAS B NAIVE (mm3)	CELULAS B DE MEMORIA SIN CAMBIO DE ISOTIPO (%)	CELULAS B DE MEMORIA SIN CAMBIO DE ISOTIPO (mm3)	CELULAS B DE MEMORIA CON CAMBIO DE ISOTIPO (%)	CELULAS B DE MEMORIA CON CAMBIO DE ISOTIPO (mm3)	CELULAS B MEMORIA TOTAL (%)	CELULAS B MEMORIA TOTAL (mm3)
1	64	102	20	32	15	24	35	56
2	80	115	6	9	12	17	18	26
3	13	59	16	73	6	27	22	100
4	78	72	4	4	14	13	18	17
5	56	109	6	12	34	66	40	78
6	69	505	4	29	20	146	24	176

Tabla 28. Porcentaje y números absolutos de las células B naïve, células B de memoria con cambio y sin cambio de isotipo, y células B de memoria total en los seis pacientes

NO. PACIENTE	CELULAS B NAIVE (%)	CELULAS B NAIVE (mm3)	CELULAS B DE MEMORIA SIN CAMBIO DE ISOTIPO (%)	CELULAS B DE MEMORIA SIN CAMBIO DE ISOTIPO (mm3)	CELULAS B DE MEMORIA CON CAMBIO DE ISOTIPO (%)	CELULAS B DE MEMORIA CON CAMBIO DE ISOTIPO (mm3)	CELULAS B MEMORIA TOTAL (%)	CELULAS B MEMORIA TOTAL (mm3)
1	83	290	3	10	1	3	5	17
2	93	885	4	38	0	4	4	38
3	97	1180	2	24	0	0	2	24
4	97	435	2	9	0	0	2	9
5	97	1763	2	36	0	0	2	36
6	94	2302	2	56	0	5	2	61

Tabla 29. Valores de referencia en valores porcentuales y números absolutos de las células B naïve, células B de memoria con cambio y sin cambio de isotipo, y células B de memoria total (32)

EDAD	CELULAS B NAIVE (%)	CELULAS B NAIVE (mm3)	CELULAS B DE MEMORIA SIN CAMBIO DE ISOTIPO (%)	CELULAS B DE MEMORIA SIN CAMBIO DE ISOTIPO (mm3)	CELULAS B DE MEMORIA CON CAMBIO DE ISOTIPO (%)	CELULAS B DE MEMORIA CON CAMBIO DE ISOTIPO (mm3)	CELULAS B MEMORIA TOTAL (%)	CELULAS B MEMORIA TOTAL (mm3)
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 30. Porcentajes y números absolutos de las células B transicionales y plasmablastos en los controles sanos

NO. CONTROL SANO	TRANSICIONALES (%)	TRANSICIONALES (mm3)	PLASMABLASTOS (%)	PLASMABLASTOS (mm3)
1	3	5	1	2
2	7	10	3	4
3	7	31	0.4	0
4	*	*	*	*
5	1	2	0.1	0
6	10	73	3	22

*No se posee el dato

Tabla 31. Porcentajes y números absolutos de las células B transicionales y plasmablastos en los seis pacientes

NO. PACIENTE	TRANSICIONALES (%)	TRANSICIONALES (mm3)	PLASMABLASTOS (%)	PLASMABLASTOS (mm3)
1	14	74	0.3	1
2	16	152	2	19
3	27	329	1	12
4	*	*	*	*
5	9	164	1	25
6	*	*	*	*

*No se posee el dato.

Tabla 32. Valores de referencia de las células B transicionales y plasmablastos (32)

EDAD	TRANSICIONALES (%)	TRANSICIONALES (mm3)	PLASMABLASTOS (%)	PLASMABLASTOS (mm3)
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 29, 30, 31, 32, 33 y 34** se muestran los análisis estadísticos de las células B de memoria con cambio y sin cambio de isotipo, células B naïve, células B transicionales y plasmablastos en controles sanos y pacientes:

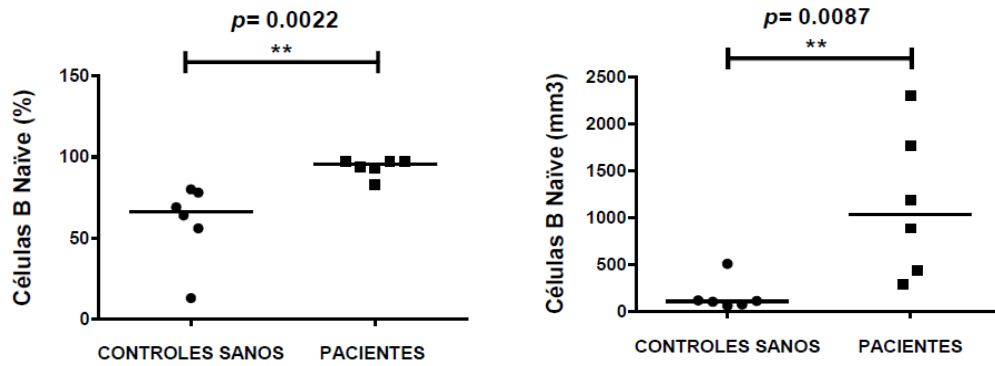


Figura 29. Análisis estadístico de las células B naïve en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de las células B naïve en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente. (*) Diferencia significativa, $p < 0.05$; (**) muy significativa, $p < 0.01$; y (***) altamente significativa, $p < 0.001$.

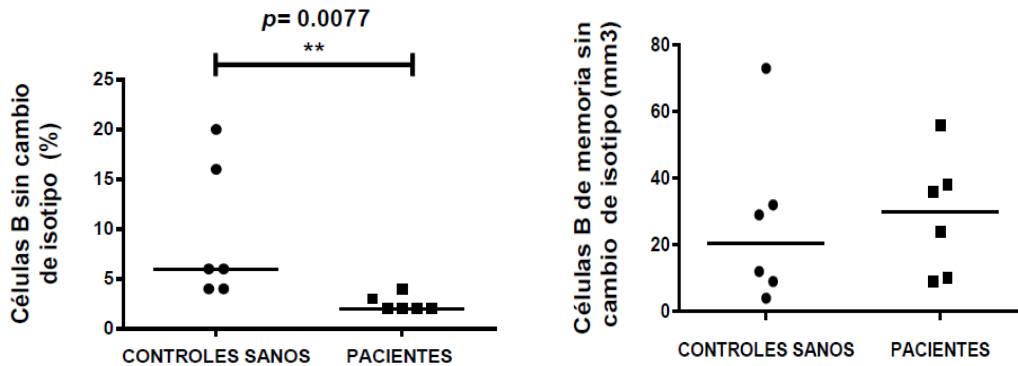


Figura 30. Análisis estadístico de las células B sin cambio de isotipo en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de las células B sin cambio de isotipo en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente. (*) Diferencia significativa, $p < 0.05$; (**) muy significativa, $p < 0.01$; y (***) altamente significativa, $p < 0.001$.

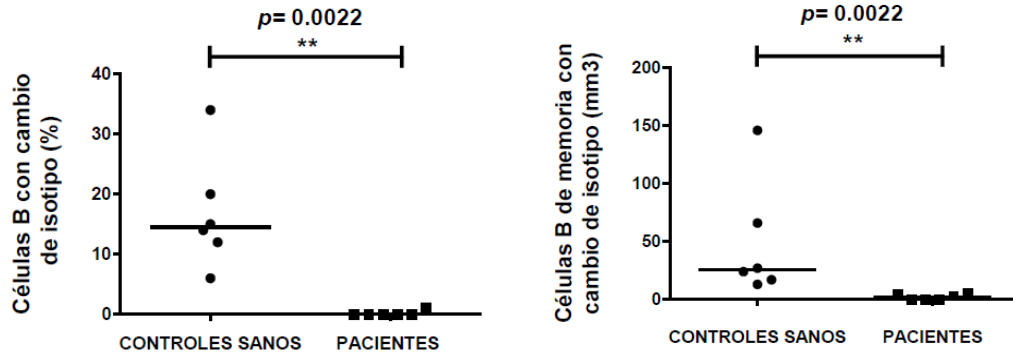


Figura 31. Análisis estadístico de las células B con cambio de isotipo en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de las células B con cambio de isotipo en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente. (*) Diferencia significativa, $p < 0.05$; (**) muy significativa, $p < 0.01$; y (***) altamente significativa, $p < 0.001$.

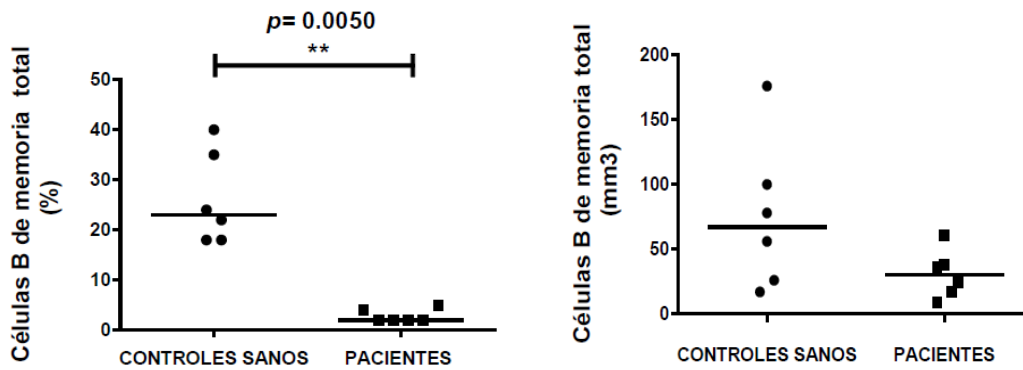


Figura 32. Análisis estadístico de las células B de memoria total en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de las células B de memoria total en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente. (*) Diferencia significativa, $p < 0.05$; (**) muy significativa, $p < 0.01$; y (***) altamente significativa, $p < 0.001$.

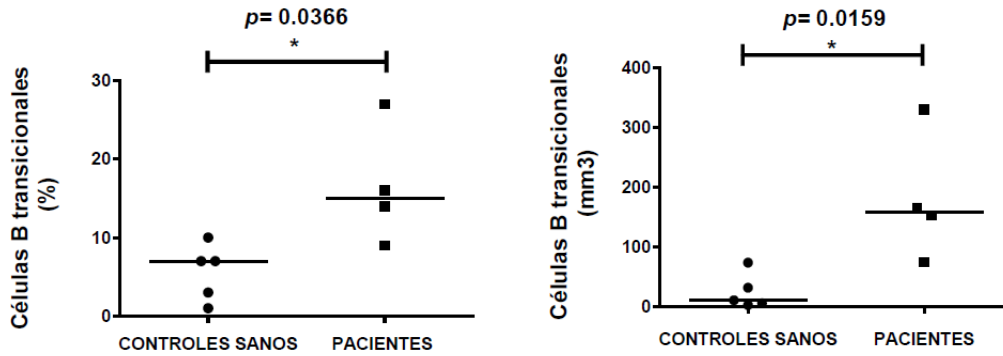


Figura 33. Análisis estadístico de las células B transicionales en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de las células B transicionales en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente. (*) Diferencia significativa, $p < 0.05$; (**) muy significativa, $p < 0.01$; y (***) altamente significativa, $p < 0.001$.

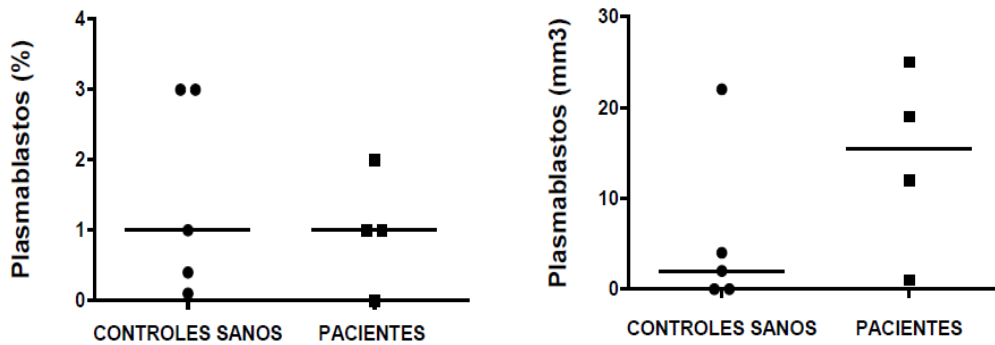


Figura 34. Análisis estadístico de los plasmablastos en controles sanos y pacientes. Análisis, en valores porcentuales y absolutos, de los plasmablastos en controles sanos y pacientes. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente.

Como se desprende de las figuras anteriores, es muy notable la ausencia de células B de memoria con cambio de isotipo cuya diferencia estadísticamente significativa se dio tanto en el porcentaje como en números absolutos ($p=0.0022$ y $p=0.022$ respectivamente). Las células B naïve también mostraron una diferencia significativa tanto en el porcentaje como en números absolutos ($p=0.0022$ y

$p=0.0087$ respectivamente), al igual que las células B transicionales mostraron diferencias significativas tanto en su porcentaje ($p= 0.0366$) como en números absolutos ($p=0.0159$). Por otra parte, las células B sin cambio de isotipo solo mostraron una diferencia significativa en su porcentaje ($p=0.0077$).

Expresión de CD40L

Se determinó la expresión del ligando de CD40 (CD154) en células T activadas con PMA e Ionomicina durante 12 horas. Se utilizó a CD69 como un control positivo de activación ya que es una proteína que se expresa tempranamente en la superficie de las células T activadas.

Se realizó una tinción triple con los siguientes anticuerpos: anti-CD3 PerCP/anti-CD40L PE/anti-CD69 FITC. La proporción de las poblaciones de células CD69+ y CD40L+ se hizo dentro de una región de células CD3+, a partir de la cual se muestra la proporción de las células CD3+CD69+ y CD3+CD40L+ como se muestran en las **figuras 35 y 36**. Por último se elaboraron histogramas donde se compararon la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células CD69+ y CD40L sin activar contra las activadas.

El análisis de los histogramas mostró que las células de los seis pacientes expresaron a la proteína CD69 de una forma similar a la que la expresaron los controles sanos (**tablas 33 y 34**); por otro lado, los pacientes presentan una expresión disminuida más no nula de la proteína CD40L en comparación con los controles sanos en donde se observa una mayor expresión (**tablas 33 y 34**). Cabe destacar que los pacientes 3 y 6 mostraron la menor expresión de CD40L tanto en valor porcentual como de IMF.

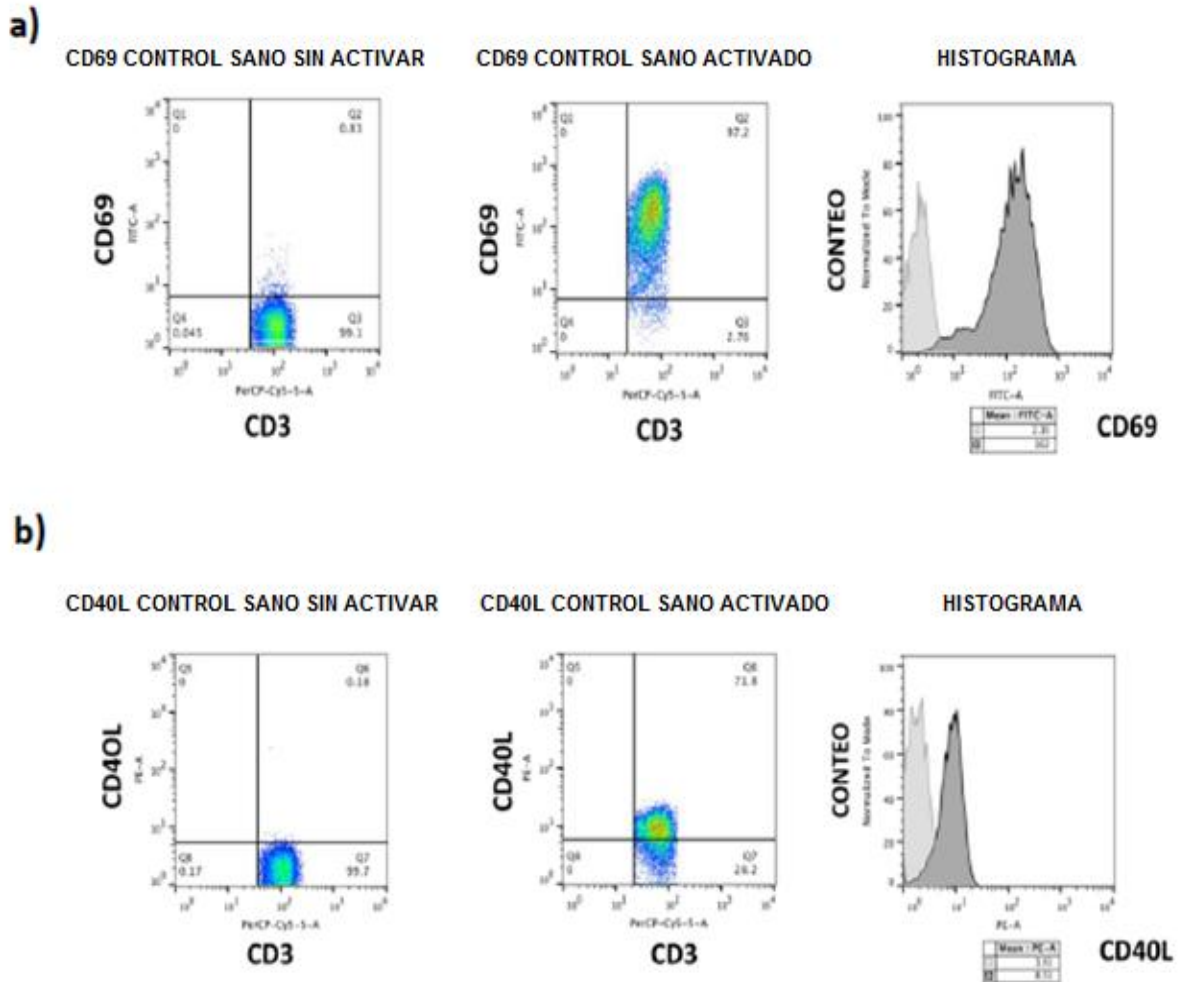
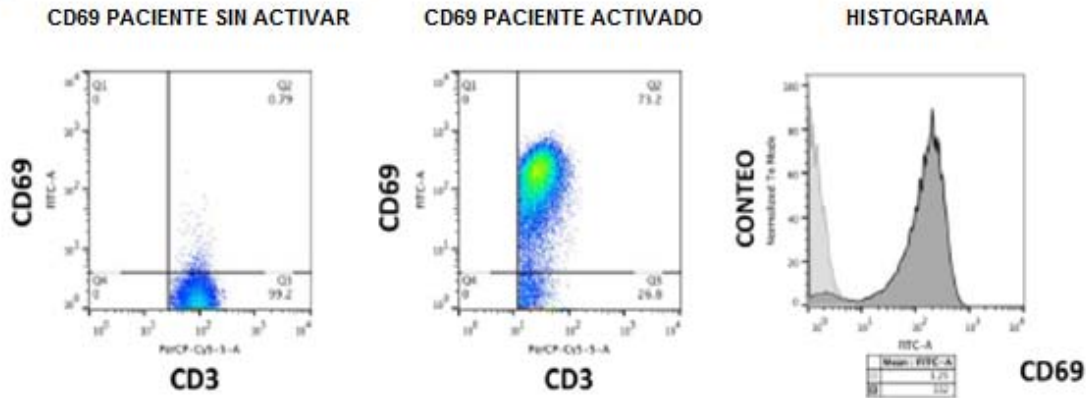


Figura 35. Análisis de la expresión de CD69 y CD40L en control sano en células T. En la figura a) se muestra el porcentaje de células CD69 sin activación y con activación. Posteriormente se muestra un histograma donde se compara la IMF de las células CD69 no activadas y activadas. En la figura b) se muestra el porcentaje de células CD40L sin activación y con activación. Posteriormente se muestra un histograma donde se compara la IMF de las células CD40L no activadas y activadas.

a)



b)

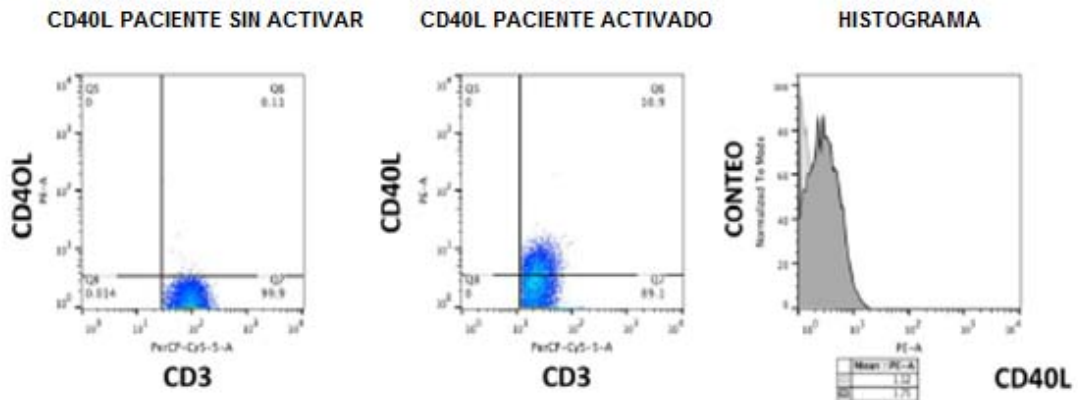


Figura 36. Análisis de la expresión de CD69 y CD40L en células T, en paciente. En la figura a) se muestra el porcentaje de células CD69 sin activación y con activación. Posteriormente se muestra un histograma donde se compara la IMF de las células CD69 no activadas y activadas. En la figura b) se muestra el porcentaje de células CD40L sin activación y con activación. Posteriormente se muestra un histograma donde se compara la IMF de las células CD40L no activadas y activadas.

Tabla 33. Porcentajes y valores de intensidad media de fluorescencia de células CD69 y CD40L sin activar y activadas en los controles sanos

NO. CONTROL SANO	CD69 SIN ACTIVAR (%)	CD69 ACT (%)	IMF CD69	CD40L SIN ACTIVAR (%)	CD40L ACT (%)	IMF CD40L
1	2	94	125	0	74	35.3
2	4	86	103	1	67	29.8
3	2	54	119	1	30	26.7
4	0	39	73.7	1	28	17
5	0	88	82.4	0	83	35.9
6	2	50	37.8	1	30	6.3

Tabla 34. Porcentajes y valores de intensidad media de fluorescencia de células CD69 y CD40L sin activar y activadas en los seis pacientes

NO. PACIENTE	CD69 SIN ACTIVAR (%)	CD69 ACT (%)	IMF CD69	CD40L SIN ACTIVAR (%)	CD40L ACT (%)	IMF CD40L
1	4	62	70.9	0	19	2.8
2	1	94	177	0	21	4.7
3	1	51	15.3	2	3	2.3
4	0	99	56.2	0	27	8.4
5	3	43	48.8	1	23	5.2
6	1	73	132	0	11	1.8

En la **figura 37 y 38** se muestran los análisis estadísticos de CD69 y CD40L en controles sanos y pacientes:

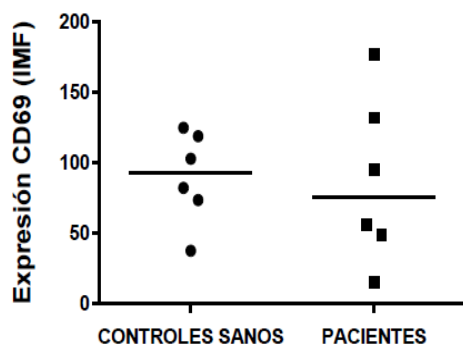


Figura 37. Análisis estadístico de la expresión de CD69 en células T, en controles sanos y pacientes. La expresión de CD69 se determinó en células T (CD3+) activadas y se compararon las intensidades medias de fluorescencia de los controles sanos (n=6) con la de los pacientes (n=6). Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente.

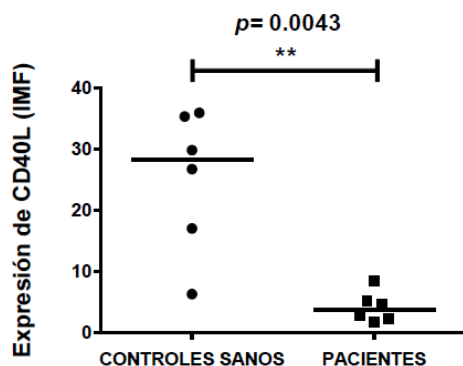


Figura 38. Análisis estadístico de la expresión de CD40L en células T, en controles sanos y pacientes. La expresión de CD40L se determinó en células T (CD3+) activadas y se compararon las intensidades medias de fluorescencia de los t controles sanos (n=6) con la de los pacientes (n=6). Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para realizar el análisis estadístico; la línea negra representa la mediana correspondiente. (*) Diferencia significativa, $p < 0.05$; (**) muy significativa, $p < 0.01$; y (***) altamente significativa, $p < 0.001$.

Como se desprende de las figuras anteriores, la expresión de CD40L en células T activadas en pacientes es muy baja comparada con la de los controles sanos y existe una diferencia estadísticamente significativa de $p=0.0043$.

Caracterización de mutaciones en el gen CD40L por técnicas de biología molecular

Amplificación del gen CD40L por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La caracterización de mutaciones solamente se realizó en 4 pacientes y se utilizó como muestra DNA genómico. Se trabajó con iniciadores específicos para cada exón del gen de CD40L (cinco pares de primers para los cinco exones que conforman el gen de CD40L [ver metodología]), después se amplificaron cada uno de los cinco exones en cada paciente y posteriormente se realizó un corrimiento electroforético cuyos resultados se muestran en las **figuras 39, 40, 41 y 42**.

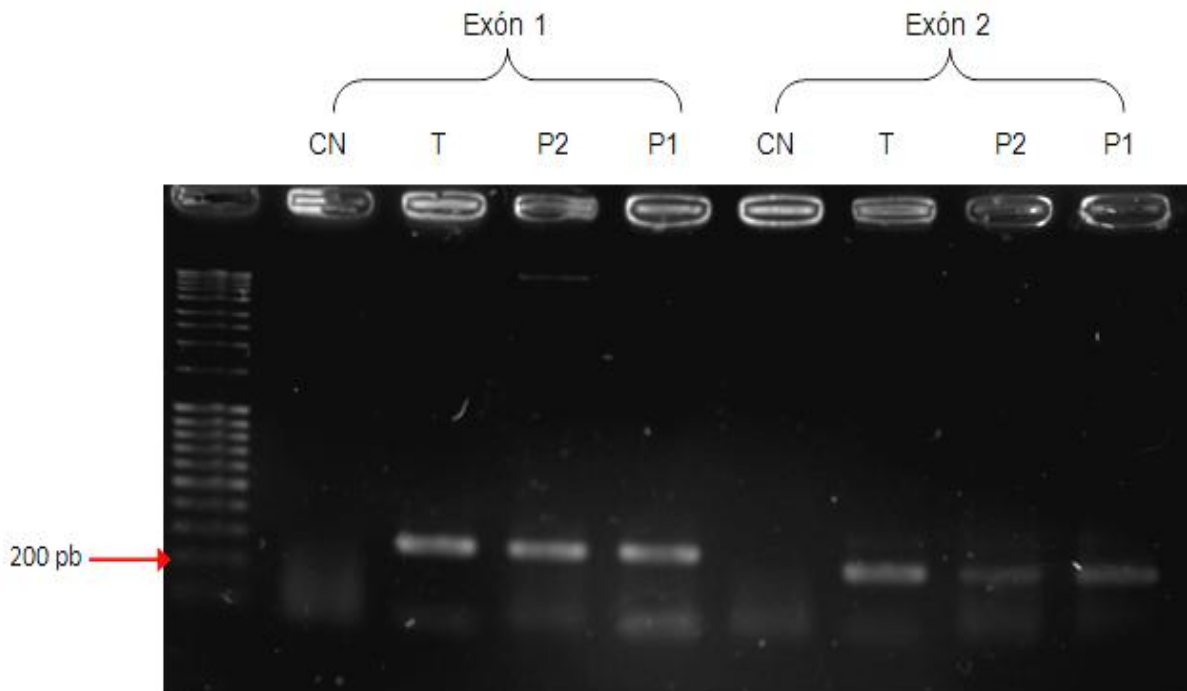


Figura 39. Amplificación del exón 1 y 2 del gen de CD40L. El exón 1 consta de 285 pares de bases, mientras que el exón 2 consta de 221 pares de bases. En la figura se muestra el producto de amplificación de los pacientes 1 y 2 (P1 y P2 respectivamente) con sus respectivos controles negativos (CN) y controles sanos (T) tanto para el exón 1 como para el exón 2.

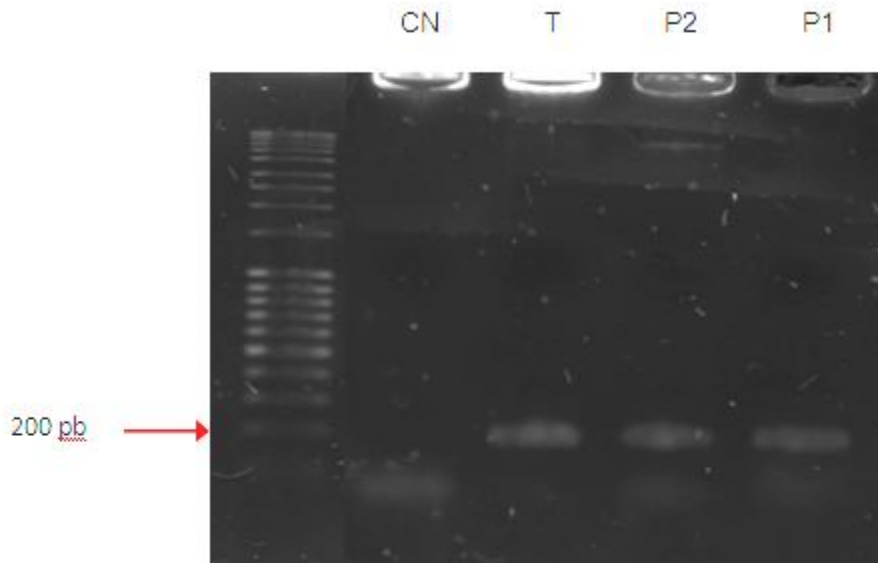


Figura 40. Amplificación del exón 4 del gen de CD40L. El exón 4 consta de 205 pares de bases y en la figura se muestra el producto de amplificación de los pacientes 1 y 2 (P1 y P2 respectivamente) con un control negativo (CN) y un control sano (T).

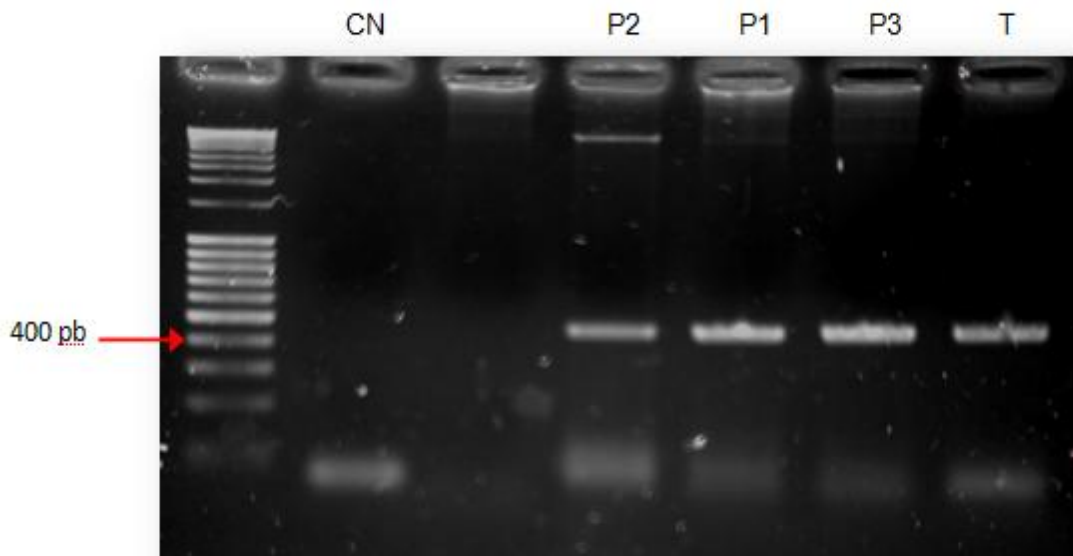


Figura 41. Amplificación del exón 5 del gen de CD40L. El exón 5 consta de 478 pares de bases y en la figura se muestra el producto de amplificación para los pacientes 1, 2 y 3 (P1, P2 y P3 respectivamente) con un control negativo (CN) y un control sano (T).

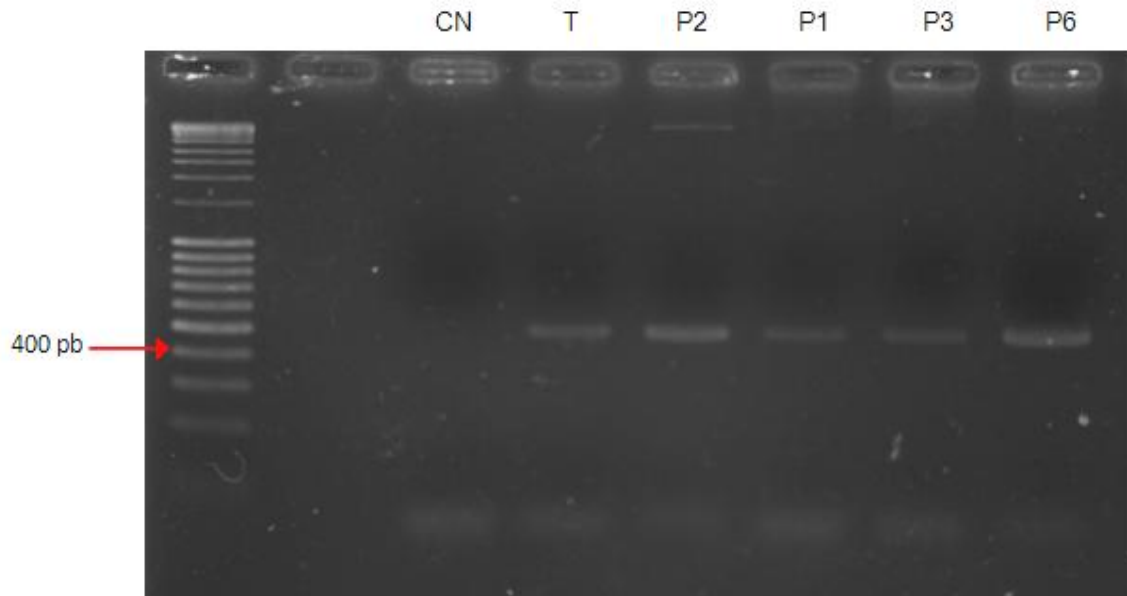


Figura 42. Amplificación del exón 3 del gen CD40L. El exón 3 consta de 447 pares de bases y en la figura se muestra el producto de amplificación de los pacientes 1, 2, 3, 6 (P1, P2, P3 y P6 respectivamente) con un control negativo (CN) y un control sano (T).

En las imágenes anteriores se muestran los productos de reacción de los pacientes para los cinco exones que conforman el gen de CD40L. Para cada exón se diseñó un par de primers específicos y en todos los ejemplos anteriores se observan que el producto de amplificación de los pacientes así como de los controles sanos se encuentra dentro del peso molecular específico de cada primer.

Clonación, ligación y transformación del gen CD40L

Al terminar el proceso de amplificación por PCR de los diferentes exones, se procedió a realizar la ligación y clonación de cada exón al plásmido pJET 1.2. Posteriormente se realizó una transformación bacteriana utilizando *E. coli* TOP 10 para reproducir a las bacterias con el plásmido insertado y para corroborar que las bacterias realmente tuvieran el plásmido se realizó una PCR que llamamos PCR

de colonia donde se seleccionaron a las mejores colonias para purificar el plásmido y secuenciarlo (**figura 43**).

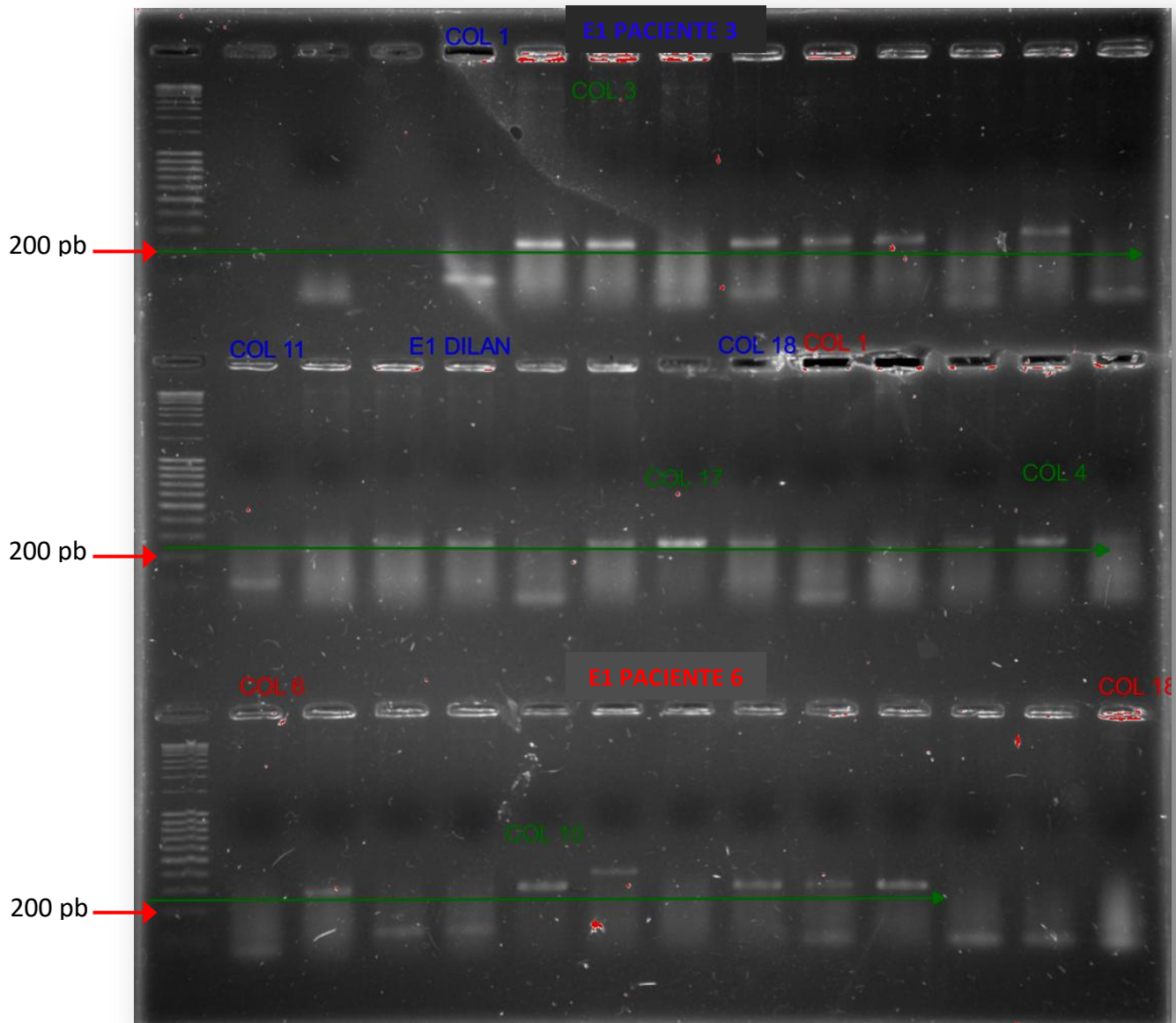


Figura 43. PCR de colonia del exón 1 del gen CD40L. Resultado del PCR de colonia del exón 1 (285 pb) de los pacientes 3 y 6. Se eligieron las colonias 3 y 17 del paciente 3 y las colonias 4 y 10 del paciente 6 para posteriormente secuenciarlas.

De acuerdo a la figura anterior, se puede observar que al realizar el PCR de colonias, aunque se esperaría que todas las colonias que crecieron en la placa tuvieran al plásmido insertado, realmente no todas lo contienen; es por esto que solamente se seleccionaron las dos mejores colonias de cada exón para cada paciente para posteriormente purificarlas y secuenciarlas.

Secuenciación y análisis

El análisis de la secuenciación de CD40L del paciente 3 (P3) reveló una transición de guanina por citosina en la posición 12205 (g.12205 G>C) en el exón 5, lo que provocó un cambio de aminoácido en la posición 257 de glicina a arginina (figura 44). También el paciente 6 presentó una transición de citosina por timina en el en la posición 12101 (g.12101 C>T) del exón 5, ocasionando un cambio de aminoácido en la posición 222 de serina a fenilalanina (figura 45).

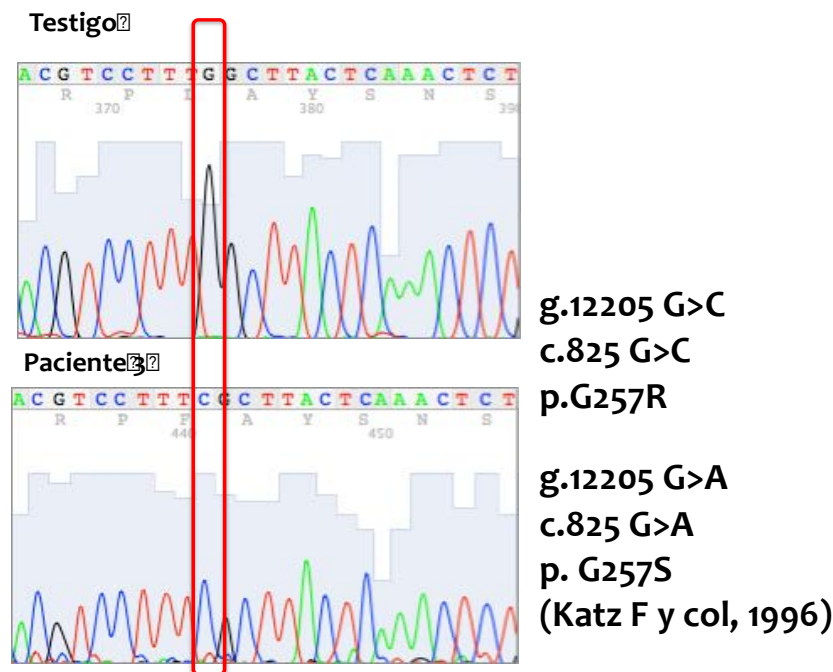


Figura 44. Análisis de las secuenciación del exón 5 del paciente 3. Electroferograma que ilustra los resultados de la secuenciación del DNA genómico del paciente 3 en el exón 5 donde el cuadro rojo indica el nucleótido mutado en el paciente comparado con el testigo. Se caracterizó anteriormente una mutación en el mismo sitio por Katz F. y colaboradores en 1996 (33).

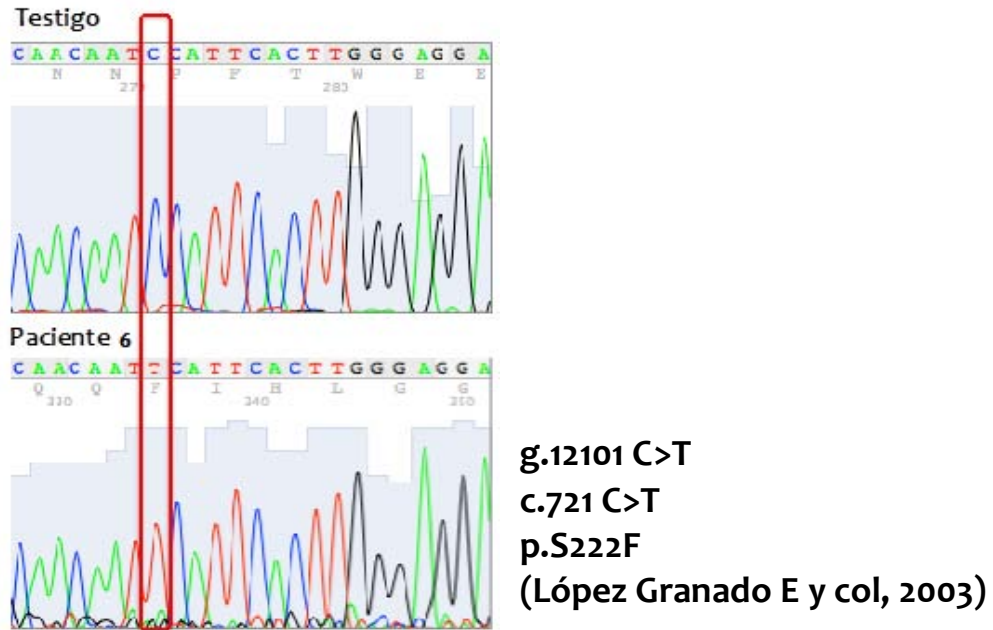


Figura 45. Análisis de la secuenciación del exón 5 del paciente 6. Electroferograma que ilustra los resultados de la secuenciación del DNA genómico del paciente 6 en el exón 5 donde el cuadro rojo indica el nucleótido mutado en el paciente comparado con el testigo. Esta mutación ya fue caracterizada por López, E. y colaboradores en 2003 (34).

VIII. DISCUSIÓN

En este estudio se describieron las características clínicas, inmunológicas y moleculares de seis pacientes con probable SHIGM ligado al cromosoma X (SHIGM Tipo1). En México el diagnóstico clínico de este síndrome se basa principalmente en la historia clínica del paciente (cuadros recurrentes de infecciones de vías respiratorias y el desarrollo de neutropenia), así como de los niveles séricos de las inmunoglobulinas (6).

Las manifestaciones clínicas más comunes en los pacientes fueron las infecciones de las vías respiratorias (100%), neumonía (83%) y diarrea crónica (50%). Los microorganismos que se lograron aislar de los pacientes incluyen: *Candida albicans* el cual fue encontrado en dos de los seis pacientes (paciente 3 y 5); virus como el de *Parvovirus*, *Enterovirus* y *Rhinovirus* los cuales se encontraron en el paciente 6; *Cryptosporidium parvum* y *Staphylococcus aureus* (encontrados en el paciente 3); *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa* (encontradas en el paciente 4) y *Mycobacterium tuberculosis* (encontrado en el paciente 1). La media de edad de los pacientes fue de 2 años por lo que podemos concluir que a edades muy tempranas los pacientes con SHIGM cursan con infecciones graves por microorganismos atípicos y/o oportunistas, lo que nos habla de una inmunodeficiencia severa que se tiene que atender con tratamientos oportunos para que no existan secuelas graves en el paciente.

El SHIGM se define como una inmunodeficiencia primaria caracterizada por valores séricos normales o elevados de IgM y una ausencia o valores muy disminuidos de todos los demás tipos de inmunoglobulinas (16). En los 6 pacientes analizados se observó que 3 de ellos presentaban valores normales de IgM (paciente 1, 4 y 5), mientras el paciente 3 presentó un valor por arriba de los valores de referencia y los pacientes 2 y 6 presentaron valores un poco por debajo de los valores de referencia (**tablas 9 y 10**). En el caso de las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgE se observó que aunque los valores son heterogéneos entre los

pacientes, la mayoría de ellos presentan valores por debajo de los de referencia sobre todo de la IgG (**tablas 9 y 10**). Se sabe que las células B circulantes en la periferia son normales pero son exclusivamente IgM/IgD positivas (células B naïve), por lo que el defecto subyacente en estos pacientes es la incapacidad de llevar a cabo el cambio de isotipo de IgM/IgD a IgG, IgA o IgE (35).

Se ha identificado que alrededor del 50% de los pacientes con SHIGM Tipo 1 presentan neutropenia la cual, por lo general, sigue un curso crónico, aunque también puede ser cíclico como consecuencia de una diferenciación mieloide defectuosa que causa la detención de la maduración o un defecto en la liberación de granulocitos maduros de la médula ósea hacia la sangre periférica (16); sin embargo, ninguno de nuestros pacientes cursaba con un cuadro de neutropenia cuando se proporcionó la muestra sanguínea (**tabla 13**).

Para entender las causas que llevan a una patología como el SHIGM es necesario el estudio de las poblaciones leucocitarias, subpoblaciones linfocitarias y la determinación de la expresión de la proteína CD40L ya que es una herramienta que nos sirve para orientar el diagnóstico clínico de la enfermedad.

Con respecto a los resultados obtenidos de las poblaciones leucocitarias, la población de linfocitos totales presentó una diferencia significativa en valores porcentuales ($p=0.0247$), donde se apreció un elevado porcentaje de células en los pacientes ($n=6$) comparado con los testigos ($n=6$), pero no se observó diferencia significativa en los valores absolutos (**figura 14**); por otro lado, la población de monocitos no mostró diferencias significativas entre testigos y pacientes (**figura 16**); por último, en la población de neutrófilos se observó diferencia significativa solamente en el valor porcentual donde se aprecia un decremento en el porcentaje de células en los pacientes ($p=0.0159$) (**figura 15**).

Se ha descrito en la literatura que los valores de linfocitos totales y de monocitos se encuentran normales; sin embargo, la población de neutrófilos se puede ver afectada en caso de que los pacientes cursen con neutropenia ya que se observaría un decremento de la población (36). La etiología de la neutropenia

todavía no se conoce a fondo pero se ha planteado la hipótesis de que el CD40L “anormal” interacciona con células estromales dando lugar a una síntesis defectiva de factores de crecimiento inductores de granulocitos. A favor de esta hipótesis está el hecho de que el tratamiento de los pacientes con G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) recombinante resulta en un aumento o recuperación de los niveles normales de neutrófilos (37). El G-CSF controla la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células a lo largo de la vía granulocítica y es necesario para la diferenciación terminal a neutrófilos (38).

El análisis de las poblaciones linfocitarias, se observó que las células T CD3+ y NK CD16+56+ no mostraron diferencias significativas tanto en números absolutos como en porcentajes entre testigos (n= 6) y pacientes (n=6) (**figuras 18 y 20**). Por otra parte, las células B CD19+ mostraron una diferencia significativa solamente en números absolutos ($p=0.0260$) (**figura 19**) observándose un número elevado de células en los pacientes; sin embargo, en la literatura se ha reportado que el número de células B se mantiene en valores normales (15).

En lo que respecta a las subpoblaciones de células T CD3+: CD4+ y CD8+, no presentaron diferencia significativa entre testigos y pacientes (**figuras 23 y 24**). De acuerdo a trabajos realizados anteriormente, se ha reportado una disminución de las células T CD4+ y T CD8+ (39); aunque, en nuestro estudio observamos que tanto testigos como pacientes mostraron valores similares (**tablas 21 y 22**).

Por lo que se refiere a las subpoblaciones de las células T CD4+, se encontraron diferencias significativas como se describe a continuación: las células T CD4+ CD45RO+ (células de memoria) mostraron diferencias significativas tanto en porcentaje ($p= 0.0238$) como en números absolutos ($p= 0.0476$), observándose una disminución en la cantidad de células de los pacientes (**figura 25**); en el caso de las células T CD4+ CD45RA+ (células naïve), también se encontraron diferencias significativas tanto en porcentaje ($p=0.0238$) como en números absolutos ($p= 0.0238$), observándose que los pacientes presentaron un incremento en el número de células (**figura 26**). Al comparar los resultados de las subpoblaciones de células T CD4+ con los valores de referencia de acuerdo a la

edad de los pacientes, se puede apreciar que los pacientes 1, 3 y 4 presentan valores disminuidos de los linfocitos T CD4+ CD45RO+, mientras que los pacientes 4 y 5 presentan valores disminuidos de los linfocitos T CD4+ CD45RA+ (**tabla 25 y 26**).

En relación con lo descrito en el párrafo anterior, se ha reportado en la literatura que los pacientes con SHIGM tienen un defecto en la maduración post-tímica de las células T, lo que se manifiesta por una capacidad bastante disminuida de lograr una diferenciación hacia células maduras (células de memoria CD45RO+) (40). Esto es directamente atribuible a la deficiencia en la señalización de CD40L, ya que se ha demostrado que desempeña un papel clave en la diferenciación de las células T: las células T activadas expresan CD40L el cual interactúa con su receptor CD40 en células presentadoras de antígeno e induce la regulación de la secreción de IL-12 la cual dirige la diferenciación de las células T naïve a células Th1 (40), lo que explica la susceptibilidad de estos pacientes a desarrollar infecciones por oportunistas (40, 41).

Retomando de nuevo el tema de la interacción de CD40L con su receptor, recordemos que esta proteína se expresa específicamente en las células T activadas y su receptor es CD40, el cual se expresa en monocitos, neutrófilos, células dendríticas e importantemente, en las células B. La interacción de CD40 con CD40L en las células B, induce la activación de esta célula, el cambio de isotipo y la hipermutación somática, mecanismos por los cuales la célula B induce el cambio de isotipo en las inmunoglobulinas de IgM a IgG, IgA o IgE (18). Es por esto que los pacientes presentan una disminución tan drástica en las células B de memoria con cambio de isotipo, y por lo cual es importante realizar el análisis de las subpoblaciones de las células B, ya que éstas son las células que se ven más afectadas en este síndrome.

De acuerdo a los resultados analizados de las subpoblaciones de células B, se observó que los plasmablastos presentaron valores porcentuales y absolutos similares en testigos y pacientes (**tabla 30 y 31**), por lo que no se encontraron diferencias significativas (**figura 34**). En el caso de las células B sin cambio de

isotipo mostraron una diferencia significativa solamente en los valores porcentuales ($p=0.0077$) (**figura 30**), observándose un incremento en el porcentaje de las células de los pacientes; igualmente, las células B de memoria total mostraron diferencias significativas solamente en el valor porcentual ($p=0.0050$) donde se observó una disminución en el porcentaje de estas células en los pacientes (**figura 32**).

Por otra parte, las células B naïve mostraron una diferencia significativa tanto en valores porcentuales como en absolutos ($p=0.0022$ y $p=0.0087$ respectivamente) donde se apreció un número elevado de células en los pacientes (**figura 29**); las células B transicionales, de igual forma, presentaron una diferencia significativa tanto en valores porcentuales como en absolutos ($p=0.0366$ y $p=0.0159$ respectivamente) observándose un incremento celular en los pacientes (**figura 33**). Sin embargo, al comparar los resultados de los pacientes con los valores de referencia de acuerdo a la edad de los pacientes, se observó que los pacientes se encuentran dentro de dichos valores de referencia (**tablas 28 y 29**). Se ha mencionado en estudios previos que las células sin cambio de isotipo y las naïve en pacientes se encuentran dentro de los valores de referencia (42).

Finalmente, las células B de memoria con cambio de isotipo mostraron una diferencia significativa tanto en valores porcentuales ($p=0.0022$) como en números absolutos ($p=0.0022$), donde en ambos casos se apreció una disminución muy drástica de las células de los pacientes comparada con los testigos (**figura 31**). En otros pacientes se ha reportado que los valores de las células B de memoria con cambio de isotipo se encuentran muy disminuidas comparadas con los testigos (42), lo que nos indica que la alteración en la formación del centro germinal debido a defectos en la expresión de CD40L resultan en un deterioro del desarrollo de las células de memoria con cambio de isotipo (42). Al comparar los resultados de los pacientes con los valores de referencia, se observó que el número de células de los pacientes se encuentra muy abatido (**tabla 28 y 29**), lo cual correlaciona con lo descrito en estudios anteriores (42).

La realización de pruebas para determinar la expresión de la proteína CD40L es esencial cuando se quiere tener un diagnóstico clínico más cercano aunque no concluyente cuando se sospecha de SHIGM Tipo 1, ya que como se mencionó anteriormente, ésta enfermedad se caracteriza por un defecto en el gen de CD40L por lo cual se espera encontrar una expresión de la proteína ausente o disminuida; en el caso de una expresión disminuida se cree que puede ser insuficiente para alcanzar el umbral necesario para la correcta estimulación de los linfocitos B (43). Un dato importante de mencionar es que se ha identificado que los anticuerpos monoclonales anti-CD40L no reconocen a la proteína mutada cuando existe la presencia de mutaciones sin sentido e inserciones/deleciones que ocasionen el cambio del marco de lectura. También se ha identificado que estos anticuerpos monoclonales anti-CD40L no logran discriminar entre el CD40L wild-type y el CD40L no funcional en presencia de mutaciones puntuales o inserciones/deleciones que no afecten el marco de lectura con lo cual, si omitiéramos esta observación, se podrían descartar hasta un 32% de los pacientes con una mutación en el gen de CD40L (44).

Para la determinación de la expresión de CD40L se realizó una tinción inmunológica utilizando los mitógenos PMA e ionomicina para activar a los linfocitos T (chechar metodología) y se utilizó como control positivo la expresión de CD69 ya que es una proteína que se expresa tempranamente cuando se activan las células T. Los resultados obtenidos mostraron que los pacientes expresaron un porcentaje de CD69 entre 43%-99%, mientras que los testigos lo expresaron entre 39%-94%. En el caso de CD40L, los pacientes lo expresaron mucho menos tanto en valor porcentual (entre 3%-27%) como en IMF (1.8-8.4) en comparación con los testigos, los cuales lo expresaron en un porcentaje entre 28%-74% y con una intensidad media de fluorescencia entre 6.3-35.9 (**tablas 33 y 34**). Los pacientes con la expresión más baja de CD40L fueron el 3 y el 6. Al realizar el análisis estadístico, se encontró que no existe diferencia significativa en la expresión de CD69 (IMF) entre pacientes y testigos (**figura 37**), pero si existe una diferencia significativa en la expresión de CD40L (IMF) entre pacientes

y testigos ($p= 0.0043$) donde se observa una disminución en la IMF de los pacientes (**figura 38**).

Se ha identificado que hay mutaciones que no afectan la estabilidad de la proteína ya que se puede observar una expresión de CD40L mediante citometría de flujo (18), por lo cual el diagnóstico genético para este síndrome debe ser siempre realizado cuando la clínica del paciente apoye el diagnóstico de SHIGM aunque la proteína CD40L se encuentre presente.

Dado a que el fenotipo de SHIGM Tipo 1 es similar a los otros tipos de SHIGM y el hecho de que la expresión disminuida de CD40L no es exclusiva de este síndrome (se ha observado una disminución de la expresión de esta proteína en pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable (45, 46)) es de suma importancia realizar los estudios moleculares para realizar un correcto diagnóstico de la enfermedad, especialmente tomando en cuenta que el trasplante de médula ósea en los primeros meses de vida se considera el mejor tratamiento para mejorar la salud del paciente a largo plazo ya que proporciona una cura permanente si se encuentra con un donador genéticamente compatible y si el procedimiento se lleva a cabo antes de que las complicaciones hayan ocurrido (47).

Después de analizar los resultados de la secuenciación de cuatro pacientes (paciente 1, 2, 3 y 6) se encontraron dos mutaciones puntuales en el exón 5 del extremo carboxilo terminal que corresponde al dominio de homología al TNF de la proteína CD40L. La primera mutación se encontró en el paciente 3 con un cambio de guanina por citosina lo que ocasionó un cambio del aminoácido glicina (el cual tiene un carácter hidrofóbico) por una arginina (el cual es un aminoácido polar cargado positivamente) (**figura 44**), esto ocurrió en el aminoácido 257 de la proteína CD40L; anteriormente Katz F. y colaboradores en 1996 (33) describieron una mutación en el mismo sitio donde observaron un cambio de guanina por adenina pero en este caso ocasionó un cambio del aminoácido glicina por serina, el cual es un aminoácido polar no cargado. Sería necesario realizar estudios funcionales para ver como afecta esta mutación a la proteína, aunque, de acuerdo a los resultados obtenidos de los estudios de citometría y moleculares, creemos

que debido a que la mutación se encuentra casi al final del exón 5 los dominios intracelular, transmembranal y la mayor parte del extracelular no fueron afectados, por lo cual si se está expresando en la superficie celular la proteína pero se observa una expresión baja de CD40L en la citometría de flujo (**tabla 34**). El cambio de aminoácido está provocando que no se forme un homotrímero funcional que se pueda unir a CD40 lo cual correlaciona con el hecho de que no se observan casi células B de memoria con cambio de isotipo (**tabla 28**).

La segunda mutación puntual que se encontró fue en el paciente 6, donde se observó un cambio de citosina por timina, lo que ocasionó el cambio del aminoácido serina (el cual tiene un carácter polar no cargado) por fenilalanina (el cual es un aminoácido hidrofóbico cíclico) (**figura 45**), esto ocurrió en la posición 222 de la proteína CD40L. Ésta mutación ya fue descrita anteriormente por López G. y colaboradores en 2003 (34) donde se mencionó que la proteína mutante es incapaz de unirse al receptor, esto se puede deber ya sea directamente por la sustitución de Ser222Phe o porque ésta sustitución afecte al aminoácido cercano Gln220 el cual en conjunto con otros cuatro aminoácidos (Lys143, Tyr145, Try146, Arg203) han sido identificados como residuos implicados en la interacción con CD40 (43).

A los otros dos pacientes que se les realizó la secuenciación de los cinco exones del gen CD40L no se les identificó algún defecto molecular y una de las perspectivas de este trabajo consiste en realizar el estudio molecular a los dos pacientes que faltaron.

Para entender las causas que conducen a una patología como el SHIGM, es necesario el estudio de la clínica del paciente junto con el de las poblaciones leucocitarias, subpoblaciones linfocitarias, así como el análisis de la expresión de la proteína CD40L, los cuales nos proporcionan una pauta para una orientación clínica acerca de esta enfermedad; sin embargo, solamente realizando los estudios moleculares podemos confirmar el diagnóstico de esta enfermedad. Es importante llevar a cabo los estudios mencionados anteriormente ya que se busca realizar el diagnóstico de la enfermedad en edades tempranas para iniciar con el

tratamiento pertinente para cada paciente, y poder evitar las complicaciones que ponen en riesgo su vida.

IX. CONCLUSIONES

- Los valores séricos de la inmunoglobulina IgM se encuentran de normales a altos en los pacientes (n=6), mientras que los valores de las demás inmunoglobulinas y sobre todo la IgM se encuentran disminuidos comparados con los valores de referencia.
- Al realizar el análisis estadístico de las subpoblaciones de las células T CD4⁺ CD45RO⁺ y T CD4⁺ CD45RA⁺ se encontró una diferencia significativa tanto en valores porcentuales de CD45 RO⁺ y CD45RA⁺ ($p=0.0238$ y $p=0.0238$, respectivamente), así como en números absolutos de CD45 RO⁺ y CD45RA⁺ ($p=0.0476$ y $p=0.0238$, respectivamente).
- Se observó una nula expresión de las células B de memoria con cambio de isotipo en todos los pacientes, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa tanto en valores porcentuales como en absolutos ($p=0.0022$ y $p=0.0022$, respectivamente).
- El análisis de la expresión de CD40L mostró una expresión disminuida de dicha proteína en todos los pacientes comparada con los testigos, encontrándose una diferencia estadísticamente muy significativa ($p=0.0043$).
- Al paciente 1 se le determinó la presencia de una bacteria que no es común encontrar en las personas que tienen este tipo de SGM (*Mycobacterium tuberculosis*) por lo que se sospecha que tiene otro tipo de SHGM (Tipo 6).
- Nuestro estudio sugiere fuertemente que el diagnóstico molecular para SHGM debe de ser siempre realizado cuando la clínica del paciente apoye este diagnóstico, aunque la proteína CD40L se encuentre presente.
- Se encontraron dos mutaciones puntuales en el exón 5: la primera corresponde al paciente 3 y hasta la fecha no se encuentra descrita en la literatura (g.12205 G>C, c.825 G>C, p.G257R). La segunda corresponde al paciente 6 y ya se encuentra descrita en la literatura (g.12101 C>T, c.721 C>T, p.S222F).

- De los cuatro pacientes a los que se les realizó los estudios moleculares, se puede concluir que solamente el paciente 3 y el 6 poseen el SHIGM Tipo 1, es necesario realizar más estudios a los pacientes 1 y 2 para ir descartando otras formas de SHIGM u otras inmunodeficiencias primarias.

X. PERSPECTIVAS

- Realizar la secuenciación del gen de CD40L en los pacientes 4 y 5 para confirmar el diagnóstico de SHIGM Tipo 1.
- Realizar estudios funcionales para conocer como está afectando la mutación del paciente 3 (g.12205 G>C, c.825 G>C, p.G257R) la función de la proteína CD40L.
- En los pacientes donde no se encontró mutación (paciente 1 y 2) seguir realizando estudios para identificar si presentan otro de los tipos de SHIGM.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th edition ed. viii, 535 p. p.
2. Murphy KP, Travers P, Walport M, Janeway C. Janeway's immunobiology. 7th ed. New York: Garland Science; 2008. xxi, 887 p. p.
3. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S182-94.
4. Park MA, Li JT, Hagan JB, Maddox DE, Abraham RS. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *Lancet*. 2008;372(9637):489-502.
5. Jesus AA, Duarte AJ, Oliveira JB. Autoimmunity in hyper-IgM syndrome. *Journal of clinical immunology*. 2008;28 Suppl 1:S62-6.
6. Vargas-Hernandez A, Berron-Ruiz L, Staines-Boone T, Zarate-Hernandez M, Cordova-Calderon WO, Espinosa-Rosales FJ, et al. Clinical and genetic analysis of patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Clinical genetics*. 2013;83(6):585-7.
7. Burtin P. [An example of atypical agammaglobulinemia (a case of severe hypogammaglobulinemia with increase of the beta-2 macroglobulin)]. *Revue francaise d'etudes cliniques et biologiques*. 1961;6:286-9.
8. Rosen FS, Kevy SV, Merler E, Janeway CA, Gitlin D. Recurrent bacterial infections and dysgamma-globulinemia: deficiency of 7S gamma-globulins in the presence of elevated 19S gamma-globulins. Report of two cases. *Pediatrics*. 1961;28:182-95.
9. Hayward AR, Levy J, Facchetti F, Notarangelo L, Ochs HD, Etzioni A, et al. Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Journal of immunology*. 1997;158(2):977-83.
10. Qamar N, Fuleihan RL. The hyper IgM syndromes. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2014;46(2):120-30.
11. Durandy A. Hyper-IgM syndromes: a model for studying the regulation of class switch recombination and somatic hypermutation generation. *Biochemical Society transactions*. 2002;30(4):815-8.

12. Davies EG, Thrasher AJ. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. *British journal of haematology*. 2010;149(2):167-80.
13. Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P, et al. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *The Journal of pediatrics*. 1997;131(1 Pt 1):47-54.
14. DiPalma JA, Strobel CT, Farrow JG. Primary sclerosing cholangitis associated with hyperimmunoglobulin M immunodeficiency (dysgammaglobulinemia). *Gastroenterology*. 1986;91(2):464-8.
15. Etzioni A, Ochs HD. The hyper IgM syndrome--an evolving story. *Pediatric research*. 2004;56(4):519-25.
16. Notarangelo LD, Hayward AR. X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (XHIM). *Clinical and experimental immunology*. 2000;120(3):399-405.
17. Thomas C, de Saint Basile G, Le Deist F, Theophile D, Benkerrou M, Haddad E, et al. Brief report: correction of X-linked hyper-IgM syndrome by allogeneic bone marrow transplantation. *The New England journal of medicine*. 1995;333(7):426-9.
18. 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.
19. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *Journal of leukocyte biology*. 2000;67(1):2-17.
20. Durandy A, Revy P, Imai K, Fischer A. Hyper-immunoglobulin M syndromes caused by intrinsic B-lymphocyte defects. *Immunological reviews*. 2005;203:67-79.
21. Papavasiliou FN, Schatz DG. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell*. 2002;109 Suppl:S35-44.
22. Parks DR, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting: theory, experimental optimization, and applications in lymphoid cell biology. *Methods in enzymology*. 1984;108:197-241.
23. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *The Review of scientific instruments*. 1972;43(3):404-9.

24. Madigan MT, Brock TD. Brock biology of microorganisms. 12th ed. San Francisco, Calif. London: Benjamin Cummings ; Pearson Education distributor; 2008. xxviii, 1061 p. p.
25. Lodish HF. Molecular cell biology. 4th ed. New York: W.H. Freeman; 2000. xxxix, 1084 p. p.
26. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry 5th ed. 5th ed. New York Basingstoke: W. H. Freeman and Co. ; Palgrave; 2001. xxxviii , 974 p. p.
27. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). Clinical immunology. 1999;93(3):190-7.
28. Gilmour KC, Walshe D, Heath S, Monaghan G, Loughlin S, Lester T, et al. Immunological and genetic analysis of 65 patients with a clinical suspicion of X linked hyper-IgM. Molecular pathology : MP. 2003;56(5):256-62.
29. Jolliff CR, Cost KM, Stivrins PC, Grossman PP, Nolte CR, Franco SM, et al. Reference intervals for serum IgG, IgA, IgM, C3, and C4 as determined by rate nephelometry. Clinical chemistry. 1982;28(1):126-8.
30. Ittermann T, Roser M, Wood G, Preez H, Ludemann J, Volzke H, et al. Reference intervals for eight measurands of the blood count in a large population based study. Clinical laboratory. 2010;56(1-2):9-19.
31. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. The Journal of allergy and clinical immunology. 2003;112(5):973-80.
32. Piatosa B, Pac M, Siewiera K, Pietrucha B, Klaudel-Dreszler M, Heropolitanska-Pliszka E, et al. Common variable immune deficiency in children--clinical characteristics varies depending on defect in peripheral B cell maturation. Journal of clinical immunology. 2013;33(4):731-41.

33. Katz F, Hinshelwood S, Rutland P, Jones A, Kinnon C, Morgan G. Mutation analysis in CD40 ligand deficiency leading to X-linked hypogammaglobulinemia with hyper IgM syndrome. *Human mutation*. 1996;8(3):223-8.
34. Lopez-Granados E, Cambronero R, Ferreira A, Fontan G, Garcia-Rodriguez MC. Three novel mutations reflect the variety of defects causing phenotypically diverse X-linked hyper-IgM syndrome. *Clinical and experimental immunology*. 2003;133(1):123-31.
35. Ramesh N, Morio T, Fuleihan R, Worm M, Horner A, Tsitsikov E, et al. CD40-CD40 ligand (CD40L) interactions and X-linked hyperIgM syndrome (HIGMX-1). *Clinical immunology and immunopathology*. 1995;76(3 Pt 2):S208-13.
36. 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.
37. 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.
38. Mavroudi I, Papadaki HA. The role of CD40/CD40 ligand interactions in bone marrow granulopoiesis. *TheScientificWorldJournal*. 2011;11:2011-9.
39. Costa-Carvalho BT, Viana MA, Brunialti MK, Kallas EG, Salomao R. An imbalance of naive and memory/effector subsets and altered expression of CD38 on T lymphocytes in two girls with hyper-IgM syndrome. *Clinical and experimental immunology*. 2004;136(2):291-6.
40. Jain A, Atkinson TP, Lipsky PE, Slater JE, Nelson DL, Strober W. Defects of T-cell effector function and post-thymic maturation in X-linked hyper-IgM syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(8):1151-8.
41. Soong L, Xu JC, Grewal IS, Kima P, Sun J, Longley BJ, Jr., et al. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity*. 1996;4(3):263-73.

42. 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.
43. Bajorath J, Chalupny NJ, Marken JS, Siadak AW, Skonier J, Gordon M, et al. Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor-ligand interaction. *Biochemistry*. 1995;34(6):1833-44.
44. 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.
45. Farrington M, Grosmaire LS, Nonoyama S, Fischer SH, Hollenbaugh D, Ledbetter JA, et al. CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(3):1099-103.
46. Oliva A, Scala E, Quinti I, Paganelli R, Ansotegui IJ, Giovannetti A, et al. IL-10 production and CD40L expression in patients with common variable immunodeficiency. *Scandinavian journal of immunology*. 1997;46(1):86-90.
47. Duplantier JE, Seyama K, Day NK, Hitchcock R, Nelson RP, Jr., Ochs HD, et al. Immunologic reconstitution following bone marrow transplantation for X-linked hyper IgM syndrome. *Clinical immunology*. 2001;98(3):313-8.

Procedimiento

- Aforar a 1 litro con agua MiliQ o destilada y filtrar en membranas de 0.22 μm .
- Ajustar a pH 7.4.
- Diluir 1:10 antes de comenzar a trabajar.

SOLUCIÓN FIJADORA

Paraformaldehído al 1% diluido en PBS 1x.

SOLUCIÓN DE TURK

Reactivos

Ácido acético glacial 80g

Agua MiliQ o destilada c.b.p 100 mL

Procedimiento

- Disolver el ácido acético glacial en el agua MiliQ o agua destilada.
- Adicionar 1 ó 2 gotas de azul de metileno.

TRIS-ÁCIDO BÓRICO-EDTA (TBE) 10x

Reactivos

Tris base 108 g

Ácido bórico 55 g

EDTA 9.3 g

XII. APÉNDICE

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

BUFFER LISIS DE ERITROCITOS

Reactivos

NH_4CO_3 0.79 g

NH_4Cl 7.7 g

Agua MiliQ o destilada c.b.p 1L

Procedimiento

- Disolver los reactivos en el litro de agua MiliQ o agua destilada.

PBS 10x

Reactivos

NaCl 80g

KH_2PO_4 2 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29g

KCl 2 g

Agua MiliQ o destilada 1L

Agua MiliQ o destilada c.b.p 1L

Procedimiento

- Disolver los reactivos en el agua MiliQ o agua destilada.
- Ajustar el pH de la solución a 8.0.