



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“IDENTIFICACIÓN DEL ESTADO DE PORTADORA EN LA XLA,
DETECCION Y CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES DE LA BTK”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

KAREN SOLÓRZANO ROSAS

DIRECTORA DE TESIS

DRA. GABRIELA LÓPEZ HERRERA



Ciudad Universitaria, CDMX, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
VOCAL: JULIO CESAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ
SECRETARIO: GABRIELA LÓPEZ HERRERA
1er. SUPLENTE: LUIS ÁNGEL FLORES MEJÍA
2° SUPLENTE: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA (INP), TORRE DE
INVESTIGACIÓN, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN
INMUNODEFICIENCIAS**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. GABRIELA LÓPEZ HERRERA

SUSTENTANTE:

KAREN SOLÓRZANO ROSAS

ÍNDICE

.....	1
ABREVIATURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE IMÁGENES	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
EL SISTEMA INMUNE.....	11
LINFOCITOS B.....	11
INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS.....	13
AGAMMAGLOBULINEMIA LIGADA AL CROMOSOMA X (XLA)	15
TIROSINA CINASA DE BRUTON (BTK)	16
HERENCIA LIGADA AL SEXO	18
INACTIVACIÓN AL AZAR DEL CROMOSOMA X.....	19
DETECCIÓN DEL CROMOSOMA X INACTIVO Y DEL X ACTIVO.....	22
ENSAYO HUMARA.....	22
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	26
OBJETIVOS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
HIPÓTESIS	28
METODOLOGÍA.....	29
GENEALOGIA DE LAS FAMILIAS ESTUDIADAS.....	29
PURIFICACIÓN DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA (PBMCs)	30
PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS B.....	30
EXTRACCIÓN DE DNA DE LOS LINFOCITOS B	31
ENSAYO HUMARA.....	32
Digestión enzimática.....	32
Amplificación del gen receptor de andrógenos (AR) mediante PCR	32

Amplificación del gen constitutivo 18S.....	34
WESTERN BLOT.....	35
Extracción de la proteína BTK de las muestras	35
Curva patrón albumina sérica bovina (BSA)	35
Preparación geles de poliacrilamida	36
Transferencia semiseca.....	36
Revelado de BTK Y/O GAPDH.....	37
EXTRACCIÓN DE RNA	38
LIGACIÓN.....	41
TRANSFORMACIÓN BACTERIANA	42
SELECCIÓN DE COLONIAS.....	42
EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO Y SECUENCIACION DEL INSERTO	44
RESULTADOS.....	47
MUJERES PORTADORAS.....	47
DETECCION DE BTK EN PACIENTES CON XLA	55
DISCUSIÓN	62
ESTUDIO DE PORTADORAS	63
DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BTK EN PACIENTES CON XLA.....	66
CONCLUSIONES.....	68
REFERENCIAS.....	69

ABREVIATURAS

AR: gen para el receptor de andrógenos humano

BTK: proteína cinasa de Bruton

BTK: gen que codifica para la proteína Btk

BCR: receptor de célula B

BSA: albúmina sérica bovina

C: citosina

CD: grupo de diferenciación

cDNA: ácido desoxirribonucleico copia

CO₂: dióxido de carbono

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ESID: Sociedad Europea para las Inmunodeficiencias

G: guanina

gDNA: ácido desoxirribonucleico genómico

HUMARA: Ensayo para gen del receptor de andrógenos humano

H₂O: agua

IDP's: inmunodeficiencias primarias

Ig: inmunoglobulina

IgD: inmunoglobulina clase D

IgM: inmunoglobulina clase M

IUIS: Unión Internacional de Sociedades de Inmunología

kDa: kilodaltones

MgCl₂: cloruro de magnesio

mM: milimolar

μL: microlitros

ng: nanogramos

pb: pares de bases

PBMC's: células mononucleares de sangre periférica

PBS: amortiguador fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RNA: ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

seg: segundos

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido

STR: secuencias cortas repetidas

T: timina

V: voltios

XLA: agammaglobulinemia ligada al cromosoma X

°C: grados Celsius

18S: subunidad ribosomal, S: Svedberg (coeficiente de sedimentación)

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. INMUNODEFICIENCIAS HUMORALES..	14
TABLA 2. SECUENCIA DE LOS CEBADORES SENTIDO Y ANTISENTIDO USADA PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE ANDRÓGENOS.	32
TABLA 3. CONDICIONES DEL PROCESO DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE ANDRÓGENOS.	33
TABLA 4. SECUENCIA DE LOS CEBADORES USADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN 18S.	34
TABLA 5. CONDICIONES DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN 18S.	34
TABLA 6. FORMA DE PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE BSA.	35
TABLA 7. VOLÚMENES A OCUPAR PARA REALIZAR LOS GELES DE POLIACRILAMIDA.	36
TABLA 8. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA DEL RNA.	39
TABLA 9. SECUENCIA DE LOS CEBADORES OCUPADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN BTK DIVIDIDO EN 4 SECCIONES CON SUS RESPECTIVAS TEMPERATURAS DE ALINEAMIENTO.	39
TABLA 10. CONDICIONES DE LA PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL PAR 1, 2, 3 Y 4.	40
TABLA 11. SECUENCIA DE LOS CEBADORES OCUPADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO PJET1.2/BLUNT	42
TABLA 12. CONDICIONES DE LA PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO PJET1.2	43
TABLA 13. CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN	45
TABLA 14. RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE EL ENSAYO HUMARA DE LAS DISTINTAS FAMILIAS.	54

ÍNDICE DE IMÁGENES

IMAGEN 1. ONTOGENIA DEL LINFOCITO B.	13
IMAGEN 2. IDP´S REPORTADAS EN ESID.	15
IMAGEN 3. POSICIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA BTK.....	17
IMAGEN 4. HERENCIA DE ENFERMEDADES RECESIVAS LIGADAS AL CROMOSOMA X.....	19
IMAGEN 5. PROCESO DE INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X.....	22
IMAGEN 6. LOCALIZACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE ANDRÓGENOS HUMANO	23
IMAGEN 7. ESQUEMA DEL GEN HUMARA Y DESARROLLO DE LA PRUEBA	23
IMAGEN 8. EJEMPLIFICACIÓN DEL ENSAYO HUMARA	25
IMAGEN 9. GENEALOGÍA DE LAS 7 FAMILIAS SELECCIONADAS PARA EL ESTUDIO	29
IMAGEN 10. PLÁSMIDO PJET1.2/BLUNT OCUPADO PARA LA TRANSFORMACIÓN	41
IMAGEN 11. PRODUCTOS PCR AR Y 18S.....	48
IMAGEN 12. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS MATERNAS CON DIGESTIÓN ENZIMÁTICA CON HHA1 Y LAS MUESTRAS MATERNAS SIN DIGERIR	50
IMAGEN 12. CONTINUACIÓN	51
IMAGEN 13. IDENTIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS ACTIVO E INACTIVO EN LAS MUESTRAS MATERNAS	52
IMAGEN 13. CONTINUACIÓN	53
IMAGEN 14. GENEALOGÍA DE LAS FAMILIAS ESTUDIADAS.....	55
IMAGEN 15. WESTERN BLOT REALIZADO AL VARÓN DE LA FAMILIA F (F.II.2) Y AL VARÓN DE LA FAMILIA H (H.II.2).....	56
IMAGEN 16. AMPLIFICACIÓN DE LOS PARES DEL GEN BTK	57
IMAGEN 17. SE OBSERVAN LOS PRODUCTOS DE LA PCR AMPLIFICADOS DEL PLÁSMIDO.	58
IMAGEN 18. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MUTACIÓN EN EL VARÓN DE LA FAMILIA F (F.II.2)	59
IMAGEN 19. PREDICCIÓN DEL DAÑO DE LA MUTACIÓN ENCONTRADA EN EL VARÓN DE LA FAMILIA F.....	61
IMAGEN 20. SE MUESTRA EL BLAST REALIZADO A LA SECUENCIA DEL PAR 1 DEL GEN BTK DEL PACIENTE H.II.1	62

RESUMEN

En este trabajo se realizó la identificación de mujeres portadoras de agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA), así como la caracterización de mutaciones en *BTK* en dos pacientes.

La detección de portadoras de enfermedades ligadas al cromosoma X en México no se realiza a nivel profesional, únicamente se ha realizado a nivel experimental; a pesar de que los métodos son relativamente sencillos. En este trabajo se realizó la detección de mujeres portadoras de la XLA ya que este padecimiento es de las inmunodeficiencias primarias más frecuentes que se presentan en niños. Para entender un poco mejor el ensayo de detección de portadoras es necesario mencionar que la XLA es un padecimiento en el cual las células del sistema inmune conocidas como linfocitos B, son incapaces de madurar; por lo tanto, los pacientes carecen de linfocitos B y células plasmáticas encargadas de la producción de anticuerpos en contra de agentes extraños. Esta ineficiencia en el proceso de maduración de los linfocitos B está causada, en la mayoría de los casos, por una mutación en el gen que codifica para la proteína BTK, la cual pertenece a la familia de las tirosina cinasas y es necesaria para la señalización del receptor del linfocito B (BCR). La XLA se hereda de forma recesiva ligada al cromosoma X; es decir, en el caso de las mujeres esta enfermedad se hereda pero no se manifiesta dado que éstas poseen dos cromosomas X; por lo tanto dos alelos del mismo gen. Sin embargo en el caso de los hombres la enfermedad se manifiesta dado que solo poseen un cromosoma X, por lo cual poseen un sólo alelo, el cual, si resultara afectado, generaría la manifestación de la enfermedad.

Cabe señalar que, de manera natural, las mujeres presentan un fenómeno conocido como inactivación al azar del cromosoma X, lo cual consiste en reprimir la expresión de uno de sus cromosomas X y les permite tener la misma dosis génica que los varones. La inactivación del X involucra una serie de eventos de represión genética, entre los que se incluye la metilación del DNA para el mantenimiento del estado de inactivación del cromosoma X seleccionado el cual presenta una herencia clonal.

Basándonos en el hecho de que los defectos genéticos en *BTK* impiden la maduración de linfocitos B y, por lo tanto, su presencia en circulación sanguínea, debido a la inactivación al azar del cromosoma X los linfocitos B en sangre periférica presentarán la inactivación del alelo paterno o del alelo materno en una proporción del 50%, respectivamente. Aquellas células que presenten activo el cromosoma X que contiene una mutación en *BTK* no llegarán a encontrarse en sangre periférica, por lo que solo en mujeres portadoras se observará un fenómeno de inactivación sesgada del cromosoma X en linfocitos B, observándose casi siempre un solo cromosoma X inactivo y el otro de forma activa.

En este trabajo se analizó esta inactivación del cromosoma X mediante el ensayo HUMARA (Receptor de Andrógenos Humano), el cual permite distinguir entre ambos cromosomas (inactivo y activo) a través de un proceso de digestión enzimática (empleando enzimas sensibles a la metilación) y la amplificación de una zona particular del gen *AR* en la cual se encuentran una serie de repetidos cortos en tándem de CAG. Este ensayo nos permitió analizar a siete mujeres quienes tenían al menos a un familiar con diagnóstico genético de XLA, con el objetivo de determinar si estas mujeres eran o no portadoras del padecimiento. De ellas, seis mujeres resultaron portadoras.

Por otra parte, se analizó la secuencia de *BTK* en dos pacientes que presentaban una historia clínica atípica para XLA, sin embargo, estos pacientes no presentaban linfocitos B circulantes. Al realizar el análisis de expresión de *BTK* por Western blot, se detectaron bandas de diferente peso molecular al esperado. En uno de estos pacientes se identificó la mutación p1397T. El análisis *in silico* de dicho cambio predijo ser una mutación dañina. En el segundo paciente se realizó la secuenciación de la primera parte del mRNA de *BTK* sin encontrarse ningún cambio.

INTRODUCCIÓN

EL SISTEMA INMUNE

El sistema inmunológico tiene como función defender al organismo en contra de microorganismos que puedan afectar e infectar a éste. Está dividido en dos tipos de respuesta: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata es la respuesta inmediata a la presencia de microorganismos, este tipo de inmunidad está compuesta principalmente por las barreras físicas y químicas, células como neutrófilos, macrófagos y linfocitos citolíticos naturales mejor conocidos como NK; así mismo, está constituido, por factores del sistema del complemento, citocinas, etc. [1].

La respuesta inmune adaptativa, también conocida como específica, tiene como característica ser altamente especializada, es capaz de distinguir entre estructuras distintas del mismo grupo de microorganismos así como de mantener una memoria para responder de manera más eficaz tras una exposición posterior a dicho patógeno [2]. Esta inmunidad tiene como células efectoras principales a los linfocitos T y B. Las células T están a cargo de la respuesta adaptativa celular y requieren de la presentación antigénica para activarse y ejercer sus funciones efectoras; por otro lado, los linfocitos B tras el reconocimiento del antígeno se diferencian a células plasmáticas, mismas que son encargadas de producir y secretar anticuerpos [3].

En este trabajo nos centraremos en el último tipo de respuesta: la inmunidad adaptativa humoral y primordialmente en los linfocitos B.

LINFOCITOS B

Existen dos tipos de subpoblaciones, los linfocitos B-2 y los linfocitos B-1. Los linfocitos B1 se encuentran contenidos en la respuesta del sistema inmune adaptativo y producen inmunoglobulinas, la cual es importante ya que reconoce antígenos propios, así como epítopes repetitivos como carbohidratos en ciertos grupos de bacterias [4]. Estos linfocitos tienen como característica que su célula progenitora se encuentra en el hígado fetal y posteriormente se llega a encontrar

una pequeña población en médula ósea en la etapa adulta [5]. La población de linfocitos B-2 se subdivide en dos poblaciones, los linfocitos de zona marginal y los linfocitos foliculares. Es importante destacar que los linfocitos B-1 mantienen una distribución clonal indicando que existen muchos clones de estas células y que su especificidad antigénica es diferente.

Los linfocitos B de zona marginal son, como su nombre lo indica, linfocitos B que se encuentran en la zona marginal del bazo; estos expresan un receptor de la célula B (BCR) poli reactivo y receptores de complemento (CD21 y CD35). Son una población muy versátil debido a su capacidad de generar anticuerpos mediante las vías T-dependiente y T-independiente [5].

Los linfocitos B foliculares son los linfocitos B convencionales; que se encuentran en bazo y nódulos linfáticos y representan aproximadamente el 90% de linfocitos B totales; estos linfocitos B se generan a partir de una célula transicional en el bazo mediante la vía dependiente de la proteína BTK. Los linfocitos B foliculares participan en la respuesta inmune mediada por vía T-dependiente, aunque también se ha observado que estas pueden participar en las respuestas por vía T-independiente [6].

La maduración de los linfocitos B comienza con la célula troncal hematopoyética presente en la médula ósea. Esta se diferencia hacia la célula B progenitora conocida como célula pro-B la cual expresa una fosfatasa de tirosina transmembranal conocida como CD45R, estas células se diferencian en células B precursoras (células pre-B) para que este procedimiento sea llevado a cabo es necesario la interacción de las células pro-B con las células estromales las cuales secretan interleucina 7 para que sea posible el desarrollo.

Las células Pro-B son el primer estadio en el proceso de maduración de los linfocitos B presenta el marcador de superficie CD19; durante este estadio se observa el inicio del rearreglo de los segmentos de los genes D y J de la cadena pesada del BCR. La señalización mediante la interleucina 7 genera la proliferación y la expansión de los linfocitos pro-B (Imagen 1). El complejo pre-BCR se forma

una vez que se ha observado que el rearreglo de la cadena pesada se ha llevado a cabo de forma positiva, así como de las cadenas ligeras sustitutas (I-like y V-preB) y de los componentes de transductores de señal Ig-a e Ig-b (los cuales contienen motivos ITAM citoplasmáticos que ayudan a la señalización del BCR) [7]. Una vez que se logra la formación del complejo pre-BCR, se inicia el rearreglo de las cadenas ligeras y se promueve la maduración del BCR; para esto es necesaria la presencia de una serie de proteínas, entre las cuales se encuentra BTK [7].

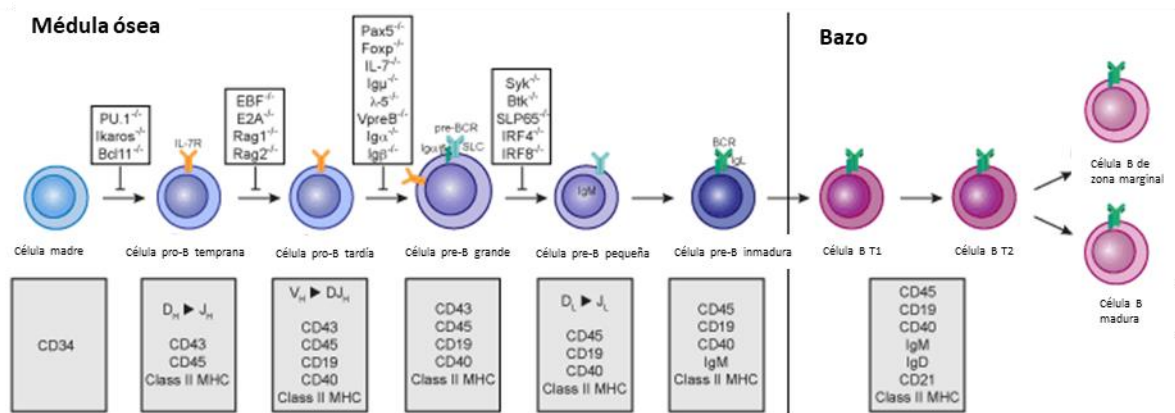


Imagen 1. Ontogenia del linfocito B. Proceso de maduración del linfocito B, marcadores de superficie importantes para cada etapa; así como proteínas importantes. Imagen tomada de [8].

INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

Las inmunodeficiencias primarias (IDP), como su nombre lo indica, hacen referencia a una falla en el sistema inmunológico debido a mutaciones que pueden afectar algún componente del sistema inmunitario. Este tipo de inmunodeficiencia se presenta durante la lactancia o la infancia, son hereditarias y son clasificadas dependiendo el componente celular que afectan. La Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) ha clasificado en el 2014 a las inmunodeficiencias primarias en 9 categorías, las cuales son: inmunodeficiencias que afectan la inmunidad celular y humoral, inmunodeficiencias combinadas con características específicas o relacionadas con algún síndrome, deficiencias predominantemente de anticuerpos, enfermedades de disregulación inmune, defectos congénitos en el número o función de los fagocitos, defectos en la inmunidad intrínseca e innata, trastornos autoinflamatorios, deficiencias del

complemento y fenocopias de IDP [9]. Para los fines de este trabajo nos centraremos en las inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos, las cuales se encuentran divididas y se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Inmunodeficiencias humorales. Tabla tomada de [10].

Enfermedad	Deficiencias funcionales	Mecanismo del defecto
A. Agammaglobulinemias		
Ligadas al cromosoma X	Disminución de todos los isotipos de Ig séricas; reducción del número de linfocitos B	Defecto del punto de verificación del receptor pre-B; mutación de Btk
Formas recesivas autosómicas	Disminución de todos los isotipos de Ig séricas; reducción del número de linfocitos B	Defecto del punto de verificación del receptor pre-B; mutaciones de la cadena pesada de la IgM (μ), sustituto de las cadenas ligeras (λ 5), Ig α , BLNK
B. Hipogammaglobulinemias/defectos de los isotipos		
Deficiencia selectiva de IgA	Disminución de IgA; se puede asociar a un aumento de la susceptibilidad a infecciones por bacterias y protozoos, como <i>Giardia lamblia</i>	Mutaciones de TAC1 en algunos pacientes
Deficiencia selectiva de IgG2	Aumento de infecciones bacterianas	Un pequeño subgrupo tiene delección en el locus IgH γ 2
Inmunodeficiencia variable combinada (IDVC)	Hipogammaglobulinemia; número de linfocitos B normal o reducido	Mutaciones de ICOS y TAC1 en algunos pacientes
Síndrome de ICF	Hipogammaglobulinemia, ocasionalmente defectos leves de los linfocitos T	Mutaciones de DNMT3B
C. Síndromes de hiper-IgM		
Ligados al cromosoma X	Defectos de la activación de los linfocitos B, los macrófagos y las células dendríticas mediada por los linfocitos T cooperadores; defectos de la mutación somática, el cambio de clase y la formación de centros germinales; defectos de la inmunidad celular	Mutación de CD40L
Recesivos autosómicos con defectos de la inmunidad celular	Defectos de la activación de los linfocitos B, los macrófagos y las células dendríticas mediada por los linfocitos T cooperadores; defectos de la mutación somática, el cambio de clase y la formación de centros germinales; defectos de la inmunidad celular	Mutación de CD40, NEMO
Recesivos autosómicos con defectos humorales únicamente	Defectos de la mutación somática y recambio de isotipo	Mutaciones de AID, UNG

Como se observa en la Imagen 2 entre las inmunodeficiencias primarias más comunes se encuentran los desordenes predominantes de anticuerpos con más de un 50% de casos reportados con respecto a todas las clasificaciones. Es por esto que es de suma importancia el estudio realizado en este trabajo, ya que la XLA se encuentra localizada en esta categoría. Si bien en la Imagen 2 es posible observar que el porcentaje de casos reportados ha disminuido en comparación del 2004 al 2014, esto se debe a que muchos de los padecimientos no se encontraban bien caracterizados y se ha logrado además una mayor difusión y

una mejoría en el diagnóstico. A continuación, nos centraremos en la Agammaglobulinemia Ligada al Cromosoma X (XLA).

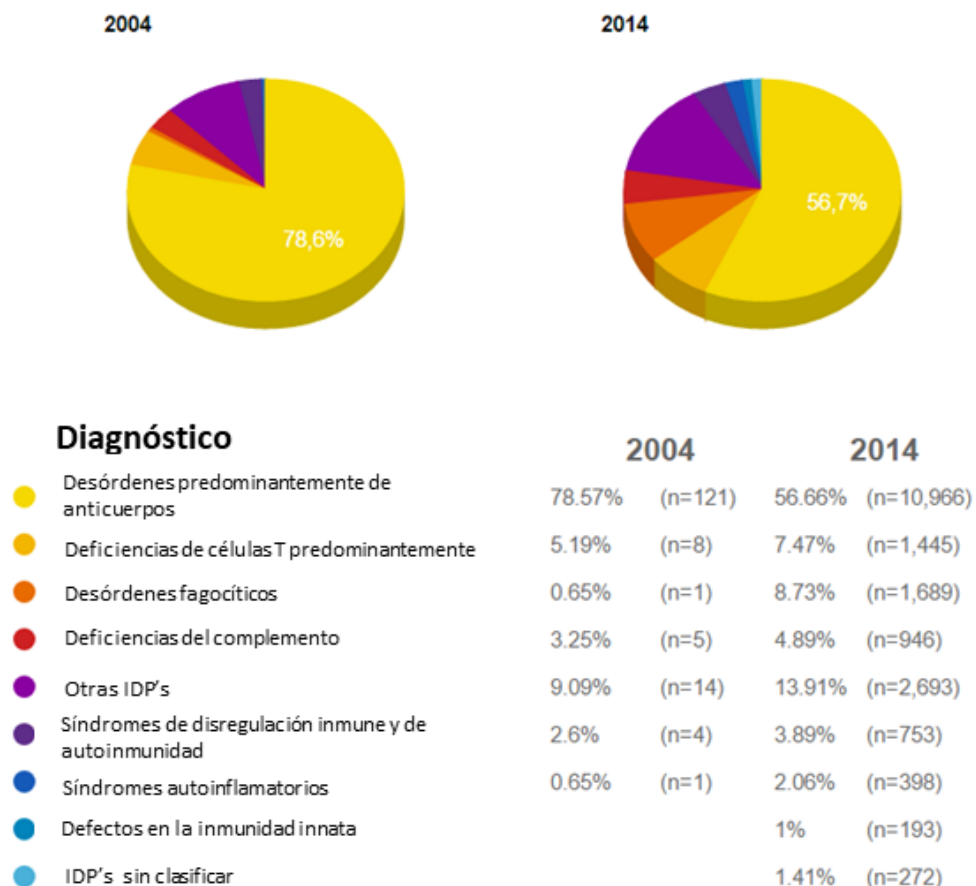


Imagen 2. IDP's reportadas en ESID. Porcentajes de casos reportados de las inmunodeficiencias primarias reportadas en la ESID; en el lado izquierdo se observa la gráfica de las IDP's reportadas en Europa en el año 2004. En el lado derecho se observan los casos y porcentajes reportados en el año 2014. Imágenes tomadas de [11]

AGAMMAGLOBULINEMIA LIGADA AL CROMOSOMA X (XLA)

La XLA fue descrita en 1952 por el Dr. Ogden C. Bruton y fue la primera inmunodeficiencia en ser identificada. Este describió un padecimiento en un varón de 8 años de edad; el cual manifestaba ausencia completa de inmunoglobulinas con niveles normales de otras proteínas séricas, así mismo presentaba infecciones recurrentes pneumocócicas, éste llegó a presentar infecciones clínicas 19 veces en un periodo de 4 años. Se descubrió que si se le administraba inmunoglobulina subcutáneamente ésta podría encontrarse después en niveles séricos normales y se dejaban de observar las infecciones recurrentes [12].

Es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X la cual se caracteriza principalmente por una ausencia de linfocitos B. Está caracterizada por algunos problemas clínicos tales como infecciones bacterianas recurrentes en hombres afectados, siendo la otitis la infección más común, aunque también se presentan conjuntivitis, diarrea, infecciones en la piel; en el 60% de los individuos afectados se puede desarrollar una infección muy severa que puede amenazar la vida del paciente, tales como neumonía, meningitis, sepsis o artritis séptica [13]. En un paciente con XLA se observan concentraciones séricas de IgG menores a 200 mg/dL, niveles de IgM e IgA menores a 20 mg/dL, siendo los valores de referencia de IgG de 560-1800 mg/dL, IgA de 100-400 mg/dL y de IgM de 45-250 mg/dL [14]. Así mismo se observa un número reducido de linfocitos B (células CD19+) menor al 1% en circulación periférica.

La prevalencia de la enfermedad es de aproximadamente 1:200,000 en recién nacidos [15].

La XLA es una enfermedad en la cual no es posible la diferenciación del linfocito pre-B a linfocito B maduro debida a una mutación en la tirosina cinasa de Bruton denominada BTK, misma que, participa en la señalización mediada por el BCR. La deficiencia de BTK provoca un bloqueo en la maduración del linfocito B en médula ósea y en consecuencia, los pacientes no presentan linfocitos B en circulación.

Dada la localización de este gen, esta enfermedad se encuentra ligada al cromosoma X, por lo cual las mujeres portadoras presentarán un alelo normal y un alelo con la mutación en *BTK*, mientras que los hombres que porten la mutación presentarán la inmunodeficiencia.

TIROSINA CINASA DE BRUTON (BTK)

La BTK es una tirosina cinasa citoplasmática la cual presenta un tamaño aproximado de 659 aminoácidos y pertenece a la familia de las Tec cinasas que incluye también a las proteínas ITK, TEC y BMX; se encuentran presentes en las células hematopoyéticas y se encuentran involucradas en la señalización de las vías de transducción activadas por factores de crecimiento o de diferenciación.

BTK contiene 5 dominios: 2 dominios homólogos Src como SH2 y SH3, un dominio PH en el amino terminal y el dominio de tirosín cinasa SH1 [16].

La activación de la BTK se inicia tras la interacción del BCR con su antígeno, este evento genera un aumento en los niveles intracelulares de PIP3; esta molécula se une al dominio PH de la BTK. Cuando se lleva a cabo esta unión la proteína BTK se mueve hacia la membrana plasmática de la célula en donde es activada. Una vez que ha ocurrido lo anterior, se observa la activación de Syk, Lyn y Fyn así como la fosforilación de los motivos ITAM. Syk y Lyn fosforilan Y551 de la proteína BTK y se autofosforila Y223; estas fosforilaciones en la proteína aumentan la actividad de la BTK. Consecuentemente a lo anterior se observa la movilización de calcio a través de p-PLC γ 2 [17].

El gen que codifica la transcripción y traducción de la BTK se encuentra localizado en el cromosoma Xq22.1 (Imagen 3), presenta 21 exones de los cuales 19 son funcionales. Se han encontrado 3 isoformas de esta proteína que son funcionales. La primera isoforma presenta un transcrito con referencia: NM_000061.2, este transcrito tiene una longitud de 2611 pb con 19 exones, siendo la más común de estas isoformas. La isoforma 2 con referencia: NM_001287345, tiene un transcrito de 2248 pb y se diferencia de la isoforma 1 en que ésta contiene un exón distinto en la región 5'UTR y carece de ciertos exones en comparación a la isoforma 1. La isoforma 3, con referencia NM_001287344.1, presenta un transcrito con una longitud de 2767 pb y difiere de la isoforma 1 en la región 5'UTR y CDS, resultando en una proteína con una región N-terminal más larga [18]. La isoforma 1 es la que nos concierne con respecto a los linfocitos B.

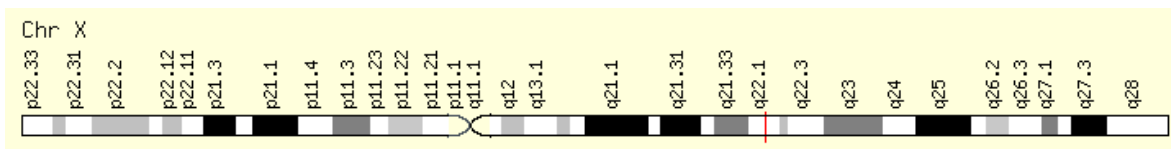


Imagen 3. Posición del gen que codifica para la BTK. Imagen obtenida de [19].

HERENCIA LIGADA AL SEXO

Dado que la XLA se encuentra ligada al cromosoma X cabe mencionar un poco al respecto.

Las células somáticas humanas están formadas por 46 cromosomas o 23 pares, siendo de estos, 22 pares autosómicos y 1 par sexual; las mujeres presentan 2 cromosomas X (XX) mientras que los varones presentan 1 cromosoma X y otro cromosoma más corto denominado Y (XY) debido a la existencia de los pares de cromosomas es que heredamos 2 copias del mismo gen, una por cada progenitor. Los cromosomas sexuales son heredados y determinan el sexo de la persona. Las mujeres heredan dos cromosomas X, mientras que los varones heredan un cromosoma X y un cromosoma Y [20].

Las enfermedades que se heredan de forma ligada al cromosoma X se presentarán casi siempre en los varones ya que son hemicingotos. En el caso de las mujeres, la expresión no será completa si son heterocigotas e influye la inactivación al azar del cromosoma X, de la cual se hablará más adelante. Una mujer con uno de los cromosomas X con el gen con una mutación será una mujer portadora de la enfermedad y podrá heredarla a su descendencia [21]. Dependiendo de si una mutación en el cromosoma X es heredado por la madre ó el padre, se tienen las siguientes consideraciones:

- Una mujer que resulta portadora de la enfermedad será capaz de heredar la copia del gen mutante a su descendencia con un 50% de probabilidad. Si es heredada a una mujer ésta será portadora; sin embargo si un varón hereda el alelo que porta la mutación, entonces éste desarrollará la enfermedad (Imagen 4).
- Un hombre que presente la mutación en el gen expresará la enfermedad ligada al cromosoma X y la transmitirá siempre si la descendiente es mujer siendo ella portadora de ésta. Si el descendiente resultara ser varón, nunca será transmitida a éste (Imagen 4).

PATRÓN DE HERENCIA RECESIVO LIGADO AL CROMOSOMA X

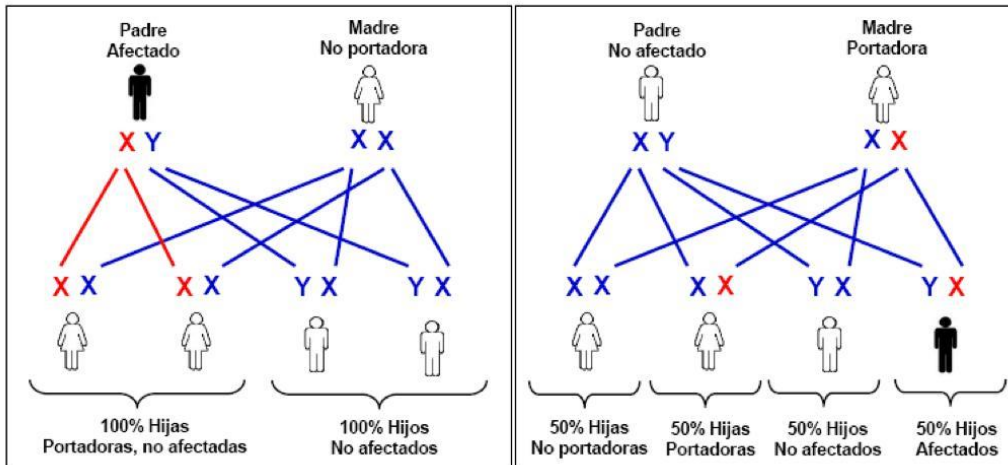


Imagen 4. Herencia de enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X. Imagen tomada de [22]

INACTIVACIÓN AL AZAR DEL CROMOSOMA X

Dado que las mujeres poseen dos cromosomas X es lógico pensar que éstas poseen dos copias de cada gen presente en el cromosoma X y por lo tanto dos productos, ya sea RNA o proteína, mientras que los varones solo presentan una copia; por lo cual es importante un mecanismo fundamental en las células conocido como compensación de dosis. Esta compensación de dosis génica en las mujeres se realiza mediante un mecanismo conocido como lionización (en honor a su descubridora Mary Frances Lyon) o inactivación del cromosoma X [23].

En 1961 Mary Lyon propuso la inactivación de uno de los cromosomas X, el cual forma el conocido “cuerpo de Barr”; así mismo describió este proceso de inactivación como un mecanismo dado al azar, el cual presenta herencia clonal. Poco después se descubrió que la inactivación no es de solo uno de los cromosomas; sino de todos a excepción de uno en el caso de los humanos.

Durante el proceso de inactivación del cromosoma X (Imagen 5) existen elementos importantes para que éste se lleve a cabo: el centro de inactivación del cromosoma X (XIC), el cual es una región de aproximadamente 1 Mbp localizado en Xq13. El gen más importante localizado en esta región es el *XIST*, el cual codifica para un RNA no codificante conocido como *XIST* RNA, de 19 kb, *XIST* solo es expresado en el cromosoma X inactivo y es capaz de adherirse a la

cromatina cercana en *cis*. Así mismo se sabe que éste RNA tiene la capacidad de reclutar a múltiples proteínas para lograr la inactivación del cromosoma X [24, 25].

En la inactivación del cromosoma X se han diferenciado algunas etapas; las cuales son: conteo, elección, iniciación, extensión y mantenimiento de la inactivación [26]. En las primeras dos etapas de la inactivación se ha observado la presencia de la proteína Rnf12, como activador del gen *Xist*, el gen *Rnf12* que codifica para la proteína antes mencionada se encuentra cercano a *Xist* y se ve influenciado por factores asociados a la pluripotencia celular, estos factores son: OXT3/4, NANOG, SOX2 y REX1, los cuales inhiben la activación de *Xist* al activar *Tsix* o unirse a regiones regulatorias de *Xist* [27, 28], siendo estas proteínas y factores antes mencionados los primeros en reconocerse en la inactivación del cromosoma X. A la fecha aún no se conoce ampliamente el proceso de conteo y de elección del cromosoma a inactivar por lo cual solo se conoce la presencia de proteínas que participan en este proceso.

Una vez que una célula embrionaria en la etapa de blastocisto [32] ha elegido cual cromosoma X inactivar, éste presenta herencia clonal; es decir, que en todas las células descendientes de esa célula progenitora presentarán el mismo cromosoma X inactivo. Por esto, las mujeres presentarán dos linajes celulares distintos: en uno de los linajes se encontrará el cromosoma X paterno inactivo y en el otro linaje el cromosoma X materno será el que se encuentre inactivo.

Al activar a *XIST* se observa la transcripción de este y se comienza a formar un complejo de esta molécula que se va uniendo al cromosoma X; recubriéndolo completamente. *XIST* interactúa después directa e indirectamente con una serie de proteínas que provocan cambios que afectarán la conformación y la inactivación de genes del cromosoma X. Entre algunas de las proteínas que interactúan con *XIST* se encuentran SPEN también conocida como SHARP, es una proteína de aproximadamente 3500 aa, esta tiene un papel en la represión transcripcional ya que es capaz de atraer a represores transcripcionales como: SMRT/NcoR, componentes de HDAC3 (un complejo de histonas desacetilasas que actúan sobre la lisina 27 de la Histona 3 H3K27), también se recluta PCR2 el

cual es un complejo responsable de la di y trimetilación de H3K27, lo cual es importante ya que se sabe que esta metilación provoca la inactivación de genes [24, 30, 31].

Otra proteína con la cual interactúa directamente *XIST* es hnRNPK la cual se descubrió que al ser inactivada provocaba la reducción de los marcadores de represión H3K27me3 y H2AK119Ub; así mismo se observó que la presencia de PRC2 se redujo al inactivarse esa proteína [32].

La inactivación del cromosoma X como se ha mencionado, comienza cuando el RNA *XIST* es expresado en el cromosoma X a inactivar y recubre a todo este cromosoma interactúa con un complejo de proteínas entre las cuales se encuentran SPEN, el receptor de láminas B (LBR), proteína asociada a tumores de Wilms (WTAP), PRC1, PRC2 y hnRNPU, proteínas que están involucradas en el reclutamiento de histonas desacetilasas, además de estar involucradas en la metilación del RNA (WTAP), posible mecanismo por el cual se comience el silenciamiento del cromosoma X [33, 34]. Mientras que uno de los cromosomas X es inactivado, este es anclado a la periferia nuclear a través de la interacción de *XIST* con la proteína LBR [33]. Mientras que la inactivación del cromosoma X avanza, se da la etapa de mantenimiento del estado de inactivación a través del reclutamiento de macroH2A junto con DNMT3a/b y DNMT1, los cuales generan la metilación de los dominios CpG, y otras modificaciones de la cromatina (H2AK119Ub por el complejo PRC1 y H3K27me3 por parte de PRC2). Una vez que se ha terminado la inactivación del cromosoma X se comienza a perder la formación de dominios de asociación topológica (TAD's) y se observa como heterocromatina (Imagen 5) [33], siendo este el último paso en el mantenimiento de la inactivación del cromosoma X.

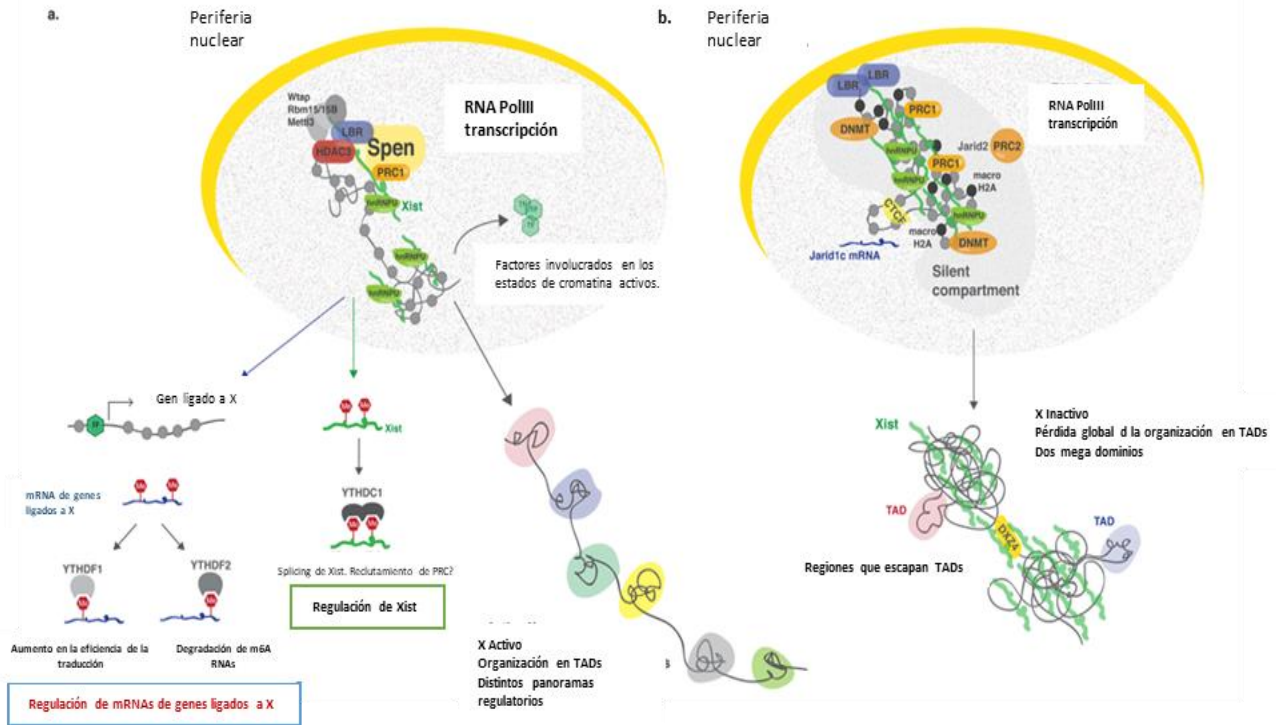


Imagen 5. Proceso de inactivación del cromosoma X. En la sección A se observa el inicio del reclutamiento del complejo proteico para la inactivación del cromosoma X; el cual consiste en el llamamiento de las proteínas SPEN, LBR, WTAP, PRC1 y hnRNP, conllevando así la ubiquitinación, la desacetilación de histonas y la metilación del RNA. En la sección B se observa el mantenimiento del estado de inactivación mediante las proteínas LBR, PRC2, macroH2A, DNMT y DNMT1. Imagen tomada y modificada de [33]

DETECCIÓN DEL CROMOSOMA X INACTIVO Y DEL X ACTIVO

El conocimiento de los mecanismos que tienen lugar para llevar a cabo la inactivación del cromosoma X, ha permitido establecer técnicas de laboratorio que ayudan a identificar cuál de los alelos está inactivo o activo. El ensayo HUMARA (Receptor de Andrógenos Humano) es un método que se emplea para la identificación de portadoras del XLA en mujeres que tienen familiares diagnosticados con el padecimiento, éste método aprovecha la metilación del DNA el cuál ocurre en el cromosoma inactivo.

ENSAYO HUMARA

Para este ensayo se ocupa el gen del receptor de andrógeno humano (*AR*) el cual se encuentra localizado en el cromosoma Xq12 (Imagen 6) y contiene 8 exones. Este gen es importante debido a la presencia de repetidos cortos en tandem (STR) hipervariables CAG en el exón 1, este gen es polimórfico en el 90% de las mujeres

siendo un marcador microsatélite para poder determinar la inactivación del cromosoma X [35, 36].

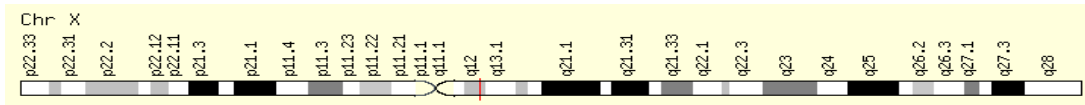


Imagen 6. Localización del gen receptor de andrógenos humano. Imagen tomada de [37].

El exón 1 de *AR* presenta múltiples sitios de corte para enzimas de restricción sensibles a la metilación como *HpaII* y *HhaI*, característica trascendental para el uso de este gen en el ensayo HUMARA ya que como se ha mencionado, en la compensación de dosis, el cromosoma inactivo está metilado para mantener el estado de inactivación, proveyéndonos así, una forma de diferenciar entre el cromosoma inactivo y el activo. Posterior a la digestión enzimática, se realiza la amplificación del STR, los cebadores para esta amplificación se encuentran en la zona de los sitios de corte de la *HhaI*, por lo cual se observará el amplificado en el cromosoma inactivo (metilado), mientras que el cromosoma activo (no metilado) no se amplificará (Imagen 7).

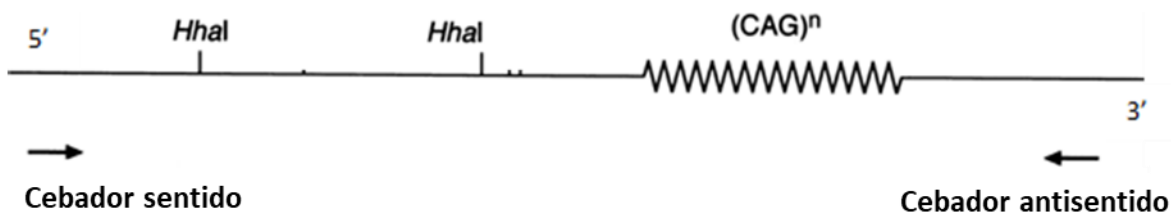


Imagen 7. Esquema del gen HUMARA y desarrollo de la prueba. Se observan la localización de los cebadores; así como los sitios de corte de la enzima *HhaI*. Imagen tomada y modificada de [35]

Dado que la deficiencia de *BTK* se acompaña con un bloqueo en la diferenciación temprana de los linfocitos B en la médula ósea, ocasionando una ausencia de linfocitos B en circulación, en las mujeres portadoras de la XLA se observará solo una población de linfocitos B en sangre periférica y éste contendrá activo el cromosoma que contenga el *BTK* sin la mutación, además, éstos linfocitos B circulantes presentarán una inactivación sesgada (ó no azarosa), es decir contendrán el mismo cromosoma X inactivo (el que presenta la mutación), ya que

en sangre periférica la población de linfocitos B que tenía activo el cromosoma X con la mutación se bloqueó en su diferenciación en médula ósea [38] (Imagen 8).

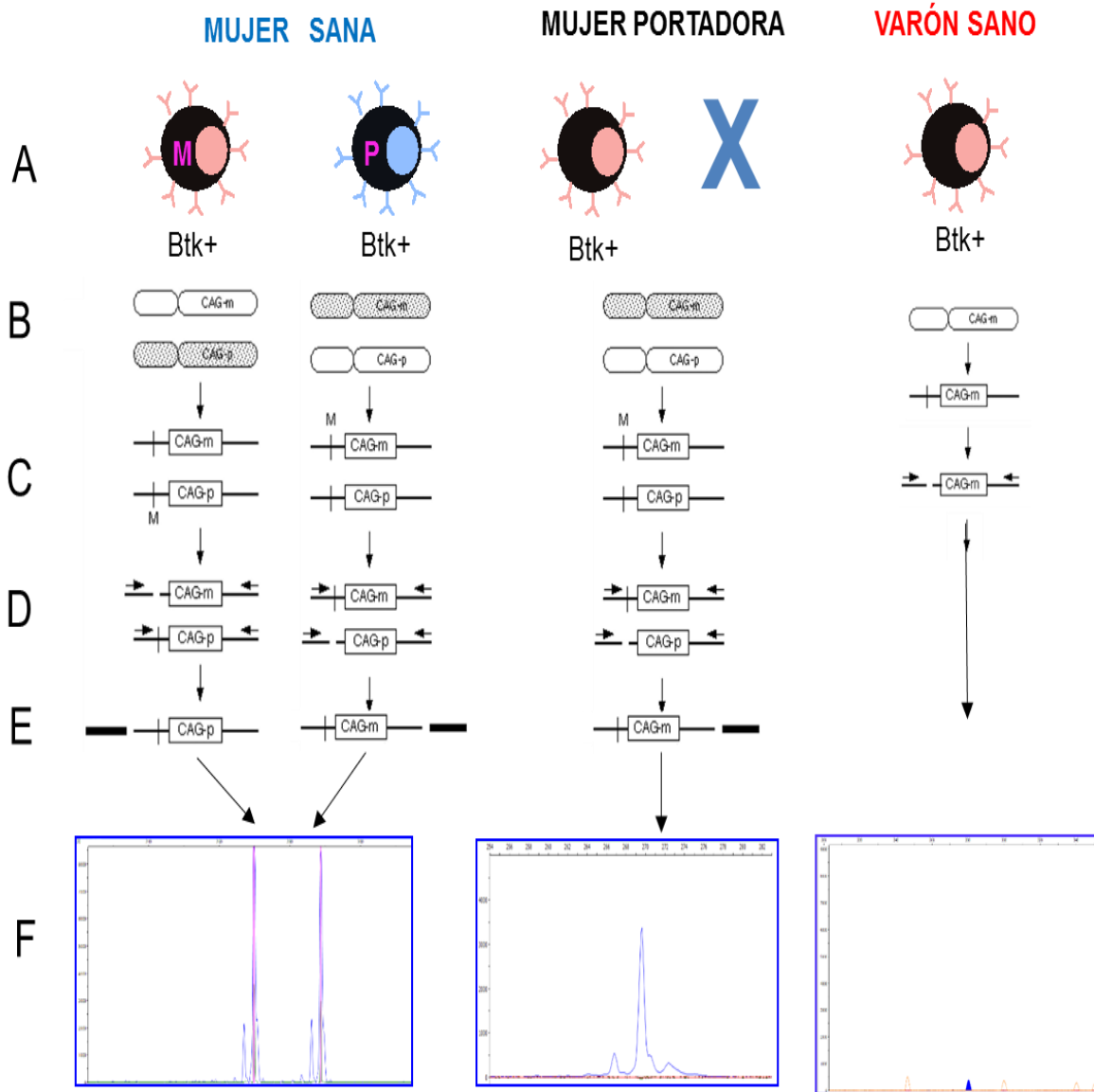


Imagen 8. Ejemplificación del ensayo HUMARA. En la sección A de esta imagen se observan las poblaciones de linfocitos B presentes en los distintos tipos de sujetos; la M corresponde a la población de linfocitos B que presenta el cromosoma X materno activo y la letra P corresponde a la población de linfocitos B con el cromosoma X paterno activo en la mujer sana. En el caso de la mujer portadora se observará una sola población de linfocitos B, los cuales presentan activo el cromosoma X sano mientras que se observa una X ya que no se observará a la población de estas células dado que no maduraron. En el caso del varón sano se observará una población de linfocitos B que presentarán el cromosoma materno y no se presenta la lionización. En la sección B es posible observar en gris al cromosoma X inactivo distinguiéndose entre el materno y paterno. En la sección C se muestra la metilación con una M del cromosoma inactivo. En la sección D se realizó la digestión enzimática con la enzima HhaI y se demuestra el corte en el cromosoma que no muestra metilación impidiendo de esta forma la amplificación. En la sección E se observan las bandas posterior a la PCR AR; en la mujer sana se observarán dos bandas de distinto peso, en la mujer portadora una sola banda y en el varón al realizarles el ensayo no se presentara ninguna banda. En la sección F se muestran las imágenes que se observarán en la sección de resultados; observándose que la mujer sana presentará dos picos; la mujer portadora 1 solo pico y el varón ningún pico si se le realiza la digestión enzimática. Imagen modificada de [39].

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

A lo largo de los años las inmunodeficiencias primarias han adquirido mayor relevancia, al ser defectos genéticos que afectan a niños en muy temprana edad; siendo la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA) una de las inmunodeficiencias primarias más comunes.

La XLA afecta a los varones, ya que contienen solo un cromosoma X y por lo tanto sus células expresan la mutación en *BTK*; sin embargo, al ser un padecimiento heredado, las madres que resulten ser portadoras del padecimiento pueden heredar la mutación a sus hijos o a sus hijas. Es importante por esto detectar a las mujeres que resultan portadoras de la XLA para proporcionarles un consejo genético y dar seguimiento a estas familias. El ensayo HUMARA es la técnica con la cual se realiza esta detección de mujeres portadoras de manera indirecta mediante la inactivación del cromosoma X.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante el ensayo HUMARA el estado de portadoras de XLA en mujeres con hijos previamente diagnosticados con el padecimiento, así como detectar posibles cambios en *BTK* en pacientes con diagnóstico reciente de inmunodeficiencia y con sospecha clínica de XLA y determinar el estado de portadoras de sus madres.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener DNA de leucocitos totales y de linfocitos B mediante el uso de perlas magnéticas acopladas a CD19.
2. Estandarizar el ensayo HUMARA
3. Detectar el cromosoma X inactivo mediante el ensayo HUMARA
4. Determinar los cromosomas activo e inactivo de las muestras maternas y así poder determinar si el hijo heredó el mismo cromosoma inactivo presente en la madre.
5. Determinar si las mujeres resultan ser portadoras de la XLA mediante el ensayo HUMARA.
6. Obtener la curva de BSA y cuantificar la proteína de las muestras
7. Obtener RNA y cDNA de distintas muestras.
8. Realizar la inmunodetección de BTK mediante la técnica de Western blot
9. Transformar a *E. coli* con la secuencia del RNA de BTK
10. Secuenciar el gen de *BTK* en las muestras estudiadas
11. Analizar las secuencias mediante alineamientos en la herramienta BLAST y predecir si los cambios genéticos que se detecten son importantes o no mediante programas computacionales.

HIPÓTESIS

Las madres que tengan hijos diagnosticados con XLA serán portadoras de éste padecimiento y será posible su detección mediante un ensayo indirecto denominado HUMARA utilizando a la población de linfocitos B.

Los pacientes que presenten un Western blot correspondiente con XLA presentarán mutaciones en el gen *BTK* y podrá ser detectada la mutación mediante la ligación y transformación de *E. coli* para poder secuenciar el gen de estos pacientes.

METODOLOGÍA

GENEALOGIA DE LAS FAMILIAS ESTUDIADAS

Se estudiaron a 7 familias (A-G), de estas familias, se obtuvieron muestras de las madres de los pacientes con diagnóstico de XLA, en total, se estudiaron a 7 mujeres, cada una con uno, dos o tres hijos afectados (familias A-G, Imagen 9); los pacientes con XLA fueron en total 10 varones de los cuales, 8 previamente fueron diagnosticados con XLA y presentaron mutaciones en *BTK*. Así mismo se analizaron a dos varones que por sus antecedentes clínicos, se presumía una posible XLA; de los cuales a una de estas familias se realizó el ensayo HUMARA y con el segundo varón (Familia H, H.II.1) se perdió contacto con la familia, por lo cual no fue posible averiguar más sobre el caso.

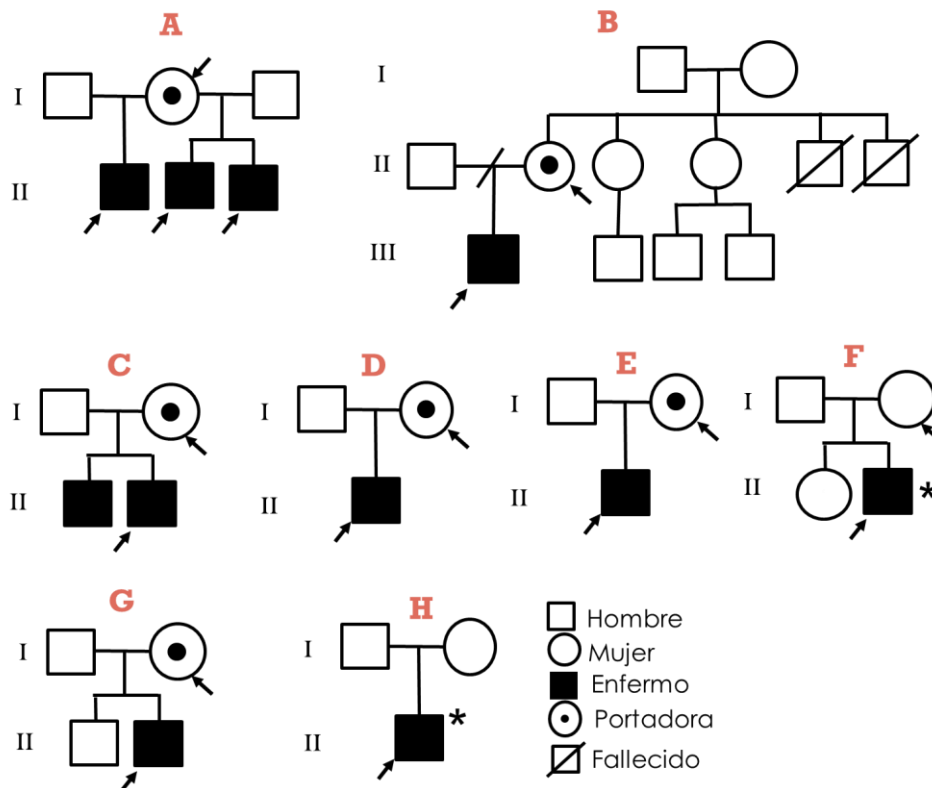


Imagen 9. Genealogía de las 7 familias seleccionadas para el estudio. Con una flecha se observan a las mujeres e hijos que fueron analizados para el ensayo Humara y con un asterisco a los pacientes a los cuales se realizó la secuenciación de *BTK*.

PURIFICACIÓN DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA (PBMCs)

1. Se recolectaron muestras de los participantes, en promedio 20ml. En un tubo cónico se colocó el Ficoll-Histopaque, 1 ml de éste por cada 2 ml de sangre periférica obtenida.
2. Se agregó la sangre inclinando el tubo y se dejó caer ésta lentamente tocando la pared del tubo para disminuir el ritmo de flujo de sangre, se centrifugó la muestra a 1500 rpm con una aceleración y desaceleración de 0 durante 30 minutos.
3. Se extrajo la porción de las PBMC's junto con el plasma y el Histopaque dejando en el tubo únicamente la porción de glóbulos rojos.
4. Se agregaron 3 mL de PBS a la porción extraída y se homogenizó la muestra, se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm con una aceleración y desaceleración de 7.
5. Se decantó la muestra y se repitió el proceso anterior en dos ocasiones; el botón resultante se resuspendió con 1 mL de solución reguladora de fosfatos (PBS).

PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS B

1. Se realizó el conteo de los PBMC's tomando 5 μ L de estos y adicionándole 45 μ L de azul tripano, se cuantificó mediante la cámara de Neubauer.
2. Se centrifugó el tubo con las células durante 5 minutos/1500 rpm a una aceleración de 7 y se adicionaron 80 μ L de PBS+Albúmina (amortiguador MACs) hasta la homogenización de la muestra y se procedió a adicionarle 20 μ L de anti-CD19 acoplado con perlas magnéticas (Miltenyi Biotec) por cada 10 millones de células por mililitro
3. Se incubó la muestra durante 15 minutos y se realizaron 2 lavados con 2 ml del amortiguador MACs, posterior a esto se resuspendieron las células con 2 ml de

amortiguador MACs y se transfirieron a un tubo estéril, se colocó este tubo en un magneto durante 5 minutos.

4. Se decantó la muestra (sin sacar el tubo del imán) y se le agregaron 2 ml de amortiguador MACs al tubo en el magneto, se incubó la muestra durante 3 minutos y se volvió a decantar, se realizó un tercer lavado, se retiró el tubo del magneto y se le adicionaron 2 ml de amortiguador MACs, se centrifugó 1500 rpm durante 5 minutos con una aceleración de 7.

5. Se resuspendió el botón obtenido en 1 ml de medio de cultivo y se le adicionó PKW 2 µg/ml, Pansorbin (células de *Staphylococcus aureus* cepa Cowan I suspendidas en PBS) 0.02% y CpG 1 µg/ml; las células se mantuvieron por 6 días a 37°C en 5% de CO₂ con el objetivo de expandir la población total de linfocitos B CD19+.

EXTRACCIÓN DE DNA DE LOS LINFOCITOS B

1. Después de la incubación, los linfocitos B expandidos se transfirieron a un microtubo de 1.5 mL y se centrifugaron a 6000 rpm en la microcentrifuga durante 5 minutos.

2. Se le agregaron 200 µL de una solución de lisis de leucocitos (Qiagen) al botón de células y se homogenizó la muestra.

3. Se adicionaron 70 µL de una solución precipitadora de proteínas (Qiagen), se centrifugó la muestra anterior a 13500 rpm durante 10 minutos, separando el botón que corresponde a las proteínas y residuos celulares y el sobrenadante correspondiente al DNA.

4. Al sobrenadante se le agregaron 250 µL aproximadamente de isopropanol por la pared del tubo y se mezclaron las soluciones invirtiendo el tubo, se centrifugó esta mezcla a 13500 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante.

5. Al botón obtenido se le realizaron 2 lavados con 500 µL de etanol al 75% centrifugando a 13500 rpm/10 minutos, en el último lavado se procedió a quitar el

sobrenadante con una micropipeta para retirar la mayor cantidad posible de etanol y permitir que el DNA se seque completamente.

6. El DNA se resuspendió con 50-100 μL de una solución de rehidratación de DNA durante 1 día.

7. Se cuantificó el DNA con un espectrofotómetro a las longitudes de onda de 260 y 280 nm^{-1} .

ENSAYO HUMARA

Digestión enzimática

1. Se realizó la siguiente mezcla en un tubo de PCR

DNA	0.5-1 ng
10X Amortiguador Fast Digest (Thermo scientific)	2 μL
Enzima <i>HhaI</i> Fast Digest (Thermo Scientific)	0.5 μL
Agua libre de nucleasas	cbp 20 μL

2. Se incubaron estos tubos a una temperatura de 37°C durante 15 minutos.

Amplificación del gen receptor de andrógenos (AR) mediante PCR

Se obtuvieron tres tipos de DNA: el DNA del paciente obtenido de leucocitos totales, el DNA de la madre obtenido de linfocitos B purificados y que no se digirieron con la enzima *HhaI* y el DNA de la madre después de realizarle la digestión enzimática.

Las secuencias de los cebadores empleados para realizar la amplificación del exón 1 de *AR* se especifican en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores sentido y antisentido usada para la amplificación del gen receptor de andrógenos.

CEBADORES	SECUENCIA
Cebador sentido	5'- TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3'
Cebador antisentido	5'- GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3'

1. Se realizó la siguiente mezcla en tubos de PCR agregando los distintos DNA's, empleando los reactivos proporcionados con la Taq polimerasa (New England Biolabs).

Amortiguador 10X	2.5 µL
MgCl 25 mM	1.5 µL
dNTP's 10 mM	0.5 µL
Cebador sentido 25 µM	0.2 µL
Cebador antisentido 25 µM	0.2 µL
Betaína 5 M	5 µL
Taq polimerasa	0.125 µL
DNA	0.5-1 ng
Agua grado biología molecular	cbp 25 µL

2. Se realizó la PCR bajo las condiciones descritas a continuación.

Tabla 3. Condiciones del proceso de amplificación del gen receptor de andrógenos.

Número de ciclos	Temperatura y tiempo		
	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
1	95°C 5 minutos		
4	95°C 15 segundos	66°C 30 segundos	68°C 30 segundos
4	95°C 15 segundos	64°C 30 segundos	68°C 30 segundos
4	95°C 15 segundos	60°C 30 segundos	68°C 30 segundos
4	95°C 15 segundos	58°C 30 segundos	68°C 30 segundos
20	95°C 15 segundos	56°C 30 segundos	68°C 30 segundos
1		68°C 5 minutos	10°C

3. Se visualizaron los productos obtenidos mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1% con un voltaje de 100 V y un tiempo de 30 minutos, éstos se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador con luz UV.

4. Una vez corroborado que la amplificación fuera correcta se realizó la PCR descrita anteriormente con el cebador sentido acoplado al fluorocromo 5-FAM y con el cebador antisentido sin el fluorocromo.

5. Se mezclaron 1.5 mL del producto de la PCR con 0.7 µL del marcador de peso Lyz500 GeneScan (Applied Biosystems) y 10.8 µL de formamida para ser analizado en un secuenciador ABI 3100.

Amplificación del gen constitutivo 18S

Las muestras de las madres ya digeridas fueron amplificadas para el gen 18S con los siguientes cebadores para corroborar la integridad del DNA.

Tabla 4. Secuencia de los cebadores usados para la amplificación del gen 18s.

CEBADORES	SECUENCIA
Sentido	5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3'
Antisentido	5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3'

1. Se realizó la mezcla para la amplificación que contiene las mismas cantidades que la mezcla para la PCR del gen AR sin embargo en esta no es necesario agregar betaína y los cebadores son distintos.

Tabla 5. Condiciones de la amplificación del gen 18s.

Número de ciclos	Temperatura y tiempo		
	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
1	95°C 5 minutos		
40	95°C 15 segundos	57°C 30 segundos	68°C 30 segundos
1		68°C 5 minutos	10°C

2. Los productos de la PCR 18S se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% durante 30 minutos a 100V, estos se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en el transiluminador (tamaño de 500 pb).

WESTERN BLOT

Extracción de la proteína BTK de las muestras

1. De una muestra se sangre se extrajeron los PBMC's como ya se describió anteriormente. Se lisan estas células con 150 μL buffer de lisis (Cell Signaling Technologies) partiendo de estas células se procede a lisar las muestras con buffer de lisis aproximadamente 150 μL , homogenizando bien la muestra por pipeteo (sin hacer burbujas) y se incubó la muestra 10 minutos en hielo.
2. Se centrifugan los tubos a una velocidad de 13500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se transfiere a un tubo Eppendorf nuevo.

Curva patrón albumina sérica bovina (BSA)

1. Se preparó una curva patrón en una microplaca para poder cuantificar la proteína de la muestra

Tabla 6. Forma de preparación de la curva patrón de BSA.

Tubo	Volumen del estándar (μL)	Estándar BSA	Volumen de amortiguador de lisis (μL)	Concentración de la proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	20	2 mg/mL	0	2000
2	30	2mg/mL	10	1500
3	20	2 mg/mL	20	1000
4	20	Tubo 2	20	750
5	20	Tubo 3	20	500
6	20	Tubo 5	20	250
7	20	Tubo 6	20	125
8 (blanco)			20	0

2. Se tomaron 5 μL de cada dilución y se mezclaron con 250 μL de reactivo de Coomassie para ser cuantificados en el espectrofotómetro EPOC (BioTek) a una longitud de onda de 595 nm.
3. Una vez obtenida la curva se calculó la concentración de las muestras agregando 5 μL con 250 μL de solución de Coomassie y se calculó la concentración con la fórmula de la regresión lineal.

4. A las muestras de la proteína extraída se les agregó 18 μ L de buffer de carga y se colocaron en un baño maría a 70°C durante 5 minutos.

Preparación geles de poliacrilamida

1. En la Tabla 8 se describe la mezcla para la preparación de estos geles, colocándose entre dos cristales, uno de ellos conteniendo un espaciador (Miniprotean Biorad).

Tabla 7. Volúmenes a ocupar para realizar los geles de poliacrilamida.

	12 % (Gel separador)	6 % (Gel concentrador)
30% Acrilamida/Bisacrilamida	2.0 mL	0.255 mL
1.5 M Tris pH 8.8	1.25 mL	X
1 M Tris pH 6.8	X	0.1875 mL
Persulfato de Amonio 10%	0.05 mL	0.015 mL
Dodecilsulfato de sodio (SDS) 10%	0.05 mL	0.015 mL
TEMED	2 μ L	1.5 μ L
Agua inyectable	1.65 mL	1.02 mL
Volumen final	5 mL	1.5 mL

2. Se colocan los geles en una cámara de electroforesis con amortiguador de corrida preparado con TRIS-Glicina 1x con SDS al 0.1%, se procedió a colocar en los pocillos 30 μ g de proteína de cada muestra en los pocillos del gel y el marcador de peso molecular (Prestained Protein Lader, Thermo Scientific).

3. Se comenzó la electroforesis a un voltaje de 80 V hasta que se observó que la última banda del marcador sobrepasó el gel concentrador; una vez que esto ocurre el voltaje se aumentó a 100 V y se dejó la electroforesis durante aproximadamente 2 horas (se tuvo cuidado para que la muestra nunca saliera del gel).

Transferencia semiseca

1. Se preparó una membrana de Polivinil difluorido (PVDF) (BioRad) y se sumergió durante 1 minuto en etanol para activarla, posterior a esto, se colocó la membrana

en solución amortiguadora de transferencia que contiene TRIS-Glicina 1x e isopropanol 5%.

2. Se colocó el gel que terminó la electroforesis en la solución amortiguadora de transferencia.

3. Se sumergieron dos papeles filtro en la solución amortiguadora de transferencia con los cuales se formó una especie de sándwich colocando el gel de poliacrilamida sobre uno de los filtros, encima de este gel se colocó la membrana (cuidando que no se formaran burbujas) y encima de la membrana se colocó el otro papel filtro.

4. Se colocó el sándwich sobre la cámara de transferencia, cuidando de colocar la membrana en el lado inferior del sándwich y se comenzó la transferencia a 15 V durante 30 minutos en la cámara de transferencia (TransBlot, Biorad).

Revelado de BTK Y/O GAPDH

1. Terminada la transferencia se colocó la membrana en leche al 3% preparada con leche Svelty y una mezcla de PBS 1X, tween 20 0.1% y agua, se dejó la membrana con la solución durante 30 minutos.

2. Se agregó el anticuerpo primario anti-BTK (Pharmingen) (dilución 1:1000 en leche 1% en PBS-Tween) a la membrana, se colocó ésta en un plástico sellado con el anticuerpo anti-BTK y se dejó incubar durante toda la noche.

3. Se lavó la membrana al día siguiente con leche al 1% repitiendo el proceso 3 veces.

4. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch) (dilución 1:7500 en leche 1% en PBS-Tween) durante 2 horas, inmediatamente se realizaron 3 lavados con leche al 1% y se le agregó luminol para su visualización en el transiluminador.

Cuando la membrana se visualizó para la proteína BTK se comenzó de nuevo con el proceso de incubación de anticuerpo primario pero ahora con el anticuerpo anti-

GAPDH (Trevigen) (Dilución 1:10,000) y el anticuerpo secundario anti-IgG conejo (Jackson ImmunoResearch) (dilución 1:3000).

EXTRACCIÓN DE RNA

1. Se realizó la centrifugación de las células PBMC's extraídas como se ha mencionado anteriormente durante 5 minutos a 6000 rpm, se removió el medio completamente y se realizó un lavado del botón con PBS.
2. Se lisaron las células del botón con 500 µl de Trizol® (Invitrogen) por pipeteo repetitivo y se incubaron las células durante 5 minutos para permitir la disociación de complejos núcleo-proteína.
3. Se centrifugó la muestra a 13500rpm/10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo.
4. Se le adicionaron 100 µL de una mezcla 98:2 de cloroformo: isoamílico; se mezcló en vortex vigorosamente durante 15 segundos y se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 3 minutos.
5. Se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 13500 rpm a una temperatura de 4°C y se obtuvo la fase acuosa (superior) transfiriéndose a un nuevo tubo midiendo el volumen obtenido.
6. Se mezcló la fase acuosa con el mismo volumen de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se procedió a centrifugar a 13500 rpm/10 minutos a 4°C.
7. Se removió el sobrenadante completamente y se adicionó 500 µl de etanol 75%, se procedió a centrifugar a 13500 rpm/5 minutos; se repitió el paso anterior y se procedió a secar el RNA dejándolo en la campana durante 30 minutos.
8. Se cuantificó el RNA mediante el EPOC y se procedió a realizar la transcripción reversa descrita a continuación, empleando la retrotranscriptasa M-MuLV (New England Biolabs).

Tabla 8. Descripción del proceso de transcripción reversa del RNA.

Reactivo	Volumen
RNA	0.5-2 mg
40 mM Primer Dt	2.0 µl
10 mM dNTP	1.0 µl
H2O cbp 15 ml	15 µl
Se incuba 5 minutos a una temperatura de 65-80°C	
5x Amortiguador RT	4.0 µl
RT	1.0 µl
Se incuba 1 hora a 42°C	
Se inactiva la RT durante 10 minutos a 90°C	

9. Una vez obtenido el cDNA se continuó con la amplificación del gen de la BTK, este gen fue dividido en 4 pares y se colocan a continuación los cebadores de estos 4 pares.

Tabla 9. Secuencia de los cebadores ocupados para la amplificación del gen BTK dividido en 4 secciones con sus respectivas temperaturas de alineamiento.

BTK	CEBADOR	SECUENCIA	Temperatura de alineamiento (Ta)
P1	Cebador sentido	5' TCGAGTCCCACCTTCCAAGTC 3'	60
	Cebador antisentido	5' GGTAGTGGCTTTTTCAAGATCTG 3'	
P2	Cebador sentido	5' TATGGGCTGCCAAATTTTGGAG 3'	57
	Cebador antisentido	5' TGCAGTGGAAGGTGCATTCTTG 3'	
P3	Cebador sentido	5' ATTACCTGGCTGAGAAGCACC 3'	59
	Cebador antisentido	5' AGCCCAAATGTCAGATTTGCTG 3'	
P4	Cebador sentido	5' TGGCAGCTCGAACTGTTTGG 3'	57
	Cebador antisentido	5' TTTCTTGGCCTTTGCTCAGAAG 3'	

10. Se realizó la siguiente mezcla en los tubos para PCR

10x Amortiguador	2.5 μ L
MgCl ₂ 25 mM	1.5 μ L
dNTPs 10 mM	0.5 μ L
Cebador sentido 25 μ M	0.2 μ L
Cebador antisentido 25 μ M	0.2 μ L
Taq Pol	0.125 μ L
cDNA	1 μ L
Agua grado biología molecular	cbp 25 μ L

11. Se colocó en el termociclador con las siguientes características:

Tabla 10. Condiciones de la PCR para la amplificación del par 1, 2, 3 y 4.

Número de ciclos	Temperatura y tiempo		
	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
1	95°C 5 minutos		
40	95°C 15 segundos	Ta 30 segundos	68°C 30 segundos
1		68°C 5 minutos	10°C

12. Una vez obtenidos los productos de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar los productos.

13. Se procedió a ligar estos productos en el plásmido pJETv1.2 (Thermo Scientific) y realizar una transformación en *E. coli* competente con CaCl₂ para posteriormente poder secuenciar; este procedimiento se describe a continuación (imagen 9), se utilizó el kit de clonación CloneJET PCR (Thermo Scientific):

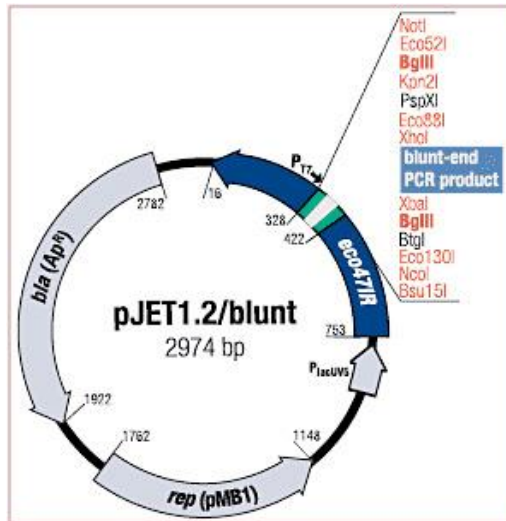


Imagen 10. Plásmido pJET1.2/blunt ocupado para la transformación de *E. coli*. Entre los componentes de este plásmido se encuentran marcados con flechas grises bla (Ap^R): lo cual corresponde al gen que proporciona la resistencia a la ampicilina, lo cual ayudará a seleccionar a las bacterias recombinantes. Rep (pMB1): replicon responsable de la replicación del plásmido pJET1.2. El gen representado con flecha azul corresponde a eco47IR: este gen corresponde a un gen letal, el cual al ser interrumpido por la secuencia de interés de nuestro gen no puede ser traducido; si este gen no es interrumpido entonces la bacteria no sobrevivirá.

LIGACIÓN

1. Corroborados los productos de la amplificación del gen de la *BTK* se procedió a realizar la ligación de éstos realizando la siguiente mezcla:

Amortiguador 2X	5 µL
Producto PCR	1-3 µL
Agua libre de nucleasas	cbp 8.5 µL
DNA blunting enzima	0.5 µL
Volumen final	9 µL

2. La mezcla se agitó brevemente y se centrifugó durante 5 segundos, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se inactivó la enzima incubando a 70°C durante 5 minutos, posterior a esto se colocó la mezcla en hielo.

3. A la mezcla anterior se le agregaron los siguientes componentes:

pJET 1.2/blunt cloning vector (50ng/µL)	0.5 µL
---	--------

T4 DNA ligasa	0.5 μ L
Vol total	10 μ L

4. Se agitó brevemente la mezcla y se centrifugó durante 5 segundos, se incubó 30 minutos a 16°C.

TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

1. De la mezcla anterior se tomaron 5 μ L y se agregaron a un tubo microtubo con 50 μ L de *E. coli* competente el cuál está ajustado al 0.5 del nefélometro de McFarland. Se incubó la mezcla 30 minutos en hielo.

2. Se realizó el choque térmico a 42°C durante 1 minuto y se colocó en hielo durante 1 minuto; se le agregaron 250 μ L de medio de cultivo Luria Bertani (LB) (Invitrogen) y se incubaron durante 1 hora a 37°C a 500 rpm

3. Se sembró la muestra en una placa con medio LB con 150 μ g/mL de ampicilina, la placa se dejó incubando a 37°C durante toda la noche.

SELECCIÓN DE COLONIAS

1. Al día siguiente se tomó una asada de 1 colonia totalmente aislada y se procedió a sembrar esa asada en otra caja Petri previamente cuadrículada y enumerada

2. Esa misma asada se sumergió en un tubo de PCR con 6 μ L de agua, tubo en el cual se llevará a cabo la amplificación de la secuencia insertada en el vector pJET

1.2. El proceso se repite para 15 colonias diferentes.

3. Se prepara la mezcla siguiente para la amplificación del inserto del gen en el vector. Los cebadores son descritos a continuación:

Tabla 11. Secuencia de los cebadores ocupados para la amplificación del plásmido pJET1.2/blunt

Cebadores	Secuencia
Cebador pJet 1.2 Forward	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'
Cebador pJet 1.2 Reverse	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

10x Amortiguador	1 μ L
MgCl ₂ 25 mM	0.6 μ L
dNTPs 10 mM	0.2 μ L
Cebador pJET 1.2 F 10 μ M	0.2 μ L
Cebador pJET 1.2 R 10 μ M	0.2 μ L
Taq pol	0.05 μ L
Agua	cbp 4 μ L

4. Se introducen los tubos en el termociclador a que se lleve a cabo la amplificación con las condiciones siguientes:

Tabla 12. Condiciones de la PCR para la amplificación del plásmido pJET1.2

Número de ciclos	Temperatura y tiempo		
	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
1	95°C 5 minutos		
40	95°C 15 segundos	60°C 30 segundos	68°C 1 minuto
1		68°C 5 minutos	10°C

5. Terminado el proceso de amplificación se procedió a visualizar los productos de PCR con una electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 30 minutos con un voltaje de 100 V; posterior a esto se tiñó el gel con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador con luz UV.

6. La caja Petri cuadrículada y recién sembrada se incubó durante toda la noche a 37°C.

7. Los productos de PCR de las colonias que mostraban un fragmento aproximado de 700 pb fueron seleccionados para continuar con el experimento ya que estos adquirieron la secuencia del gen.

8. Al día siguiente se seleccionaron las colonias que dieron positivo para los fragmentos de una longitud de 700 pb y se tomó una asada sembrándola en un

tubo cónico de 15 mL con 5 ml de medio LB y ampicilina a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos tubos se dejaron incubando a 37°C durante toda la noche.

EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO Y SECUENCIACION DEL INSERTO

1. Se centrifugó el tubo cónico a 3750 rpm durante 5 minutos para obtener el botón y se decantó el sobrenadante.
2. La extracción del plásmido se realizó empleando el kit de extracción DNA plasmid miniprep (Qiagen), para lo cual se resuspendió el botón de bacterias en 250 μL del Buffer P1 y se transfirió a un tubo microtubo.
3. Se adicionaron 250 μL del amortiguador P2 y se mezcló por inversión el tubo de 4-6 veces hasta que la solución se aclarara.
4. Se adicionaron 350 μL de amortiguador N3 y se mezcló por inversión el tubo de 4-6 veces. Se obtuvo el sobrenadante al centrifugar por 10 minutos a 13500 rpm el tubo anterior.
5. El sobrenadante obtenido se adicionó a la columna por pipeteo y se centrifugó ésta durante 1 minuto, descartándose el eluido.
6. Se procedió a lavar la columna adicionando 500 μL del amortiguador PB y se centrifugó la columna a 13500 rpm durante 1 minuto descartándose el eluido.
7. Se lavó la columna con 750 μL de amortiguador PE centrifugando la columna a 13500 rpm durante 1 minuto descartando el eluido, se repitió la centrifugación para eliminar cualquier agua de lavado residual.
8. Se transfirió la columna en un tubo nuevo y estéril de 1.5 ml y se agregaron 50 μL de Buffer EB para eluir el DNA, se dejó reposar la columna por 1 minuto y se procedió a centrifugar ésta durante 1 minuto más.
9. Una vez obtenido el DNA extraído se cuantificó como ya se ha mencionado.
10. Cuantificado el DNA se realizó la reacción de secuenciación para poder determinar la secuencia de nuestro gen de interés.

La mezcla de secuenciación se realizó de la siguiente forma, empleando el kit de secuenciación BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 (Thermo Scientific):

Amortiguador 5x	2 μ L
Big dye	0.8 μ L
Cebador pJET 1.2 10 μ M	1 μ L
DNA	150-200 ng
Agua grado biología molecular	cbp 10 μ L

11. Se colocaron los tubos en las siguientes condiciones en el termociclador

Tabla 13. Condiciones de la reacción de secuenciación

Número de ciclos	Temperatura y tiempo		
	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
1	95°C 5 minutos		
40	95°C 15 segundos	60°C 30 segundos	68°C 1 minuto
1		68°C 5 minutos	10°C

12. Por cada plásmido obtenido se realizó la mezcla con el cebador pJet sentido y otra mezcla para el cebador pJet antisentido.

13. Las reacciones de secuenciación se purificaron empleando el kit de purificación BigDye Xterminator purification kit (Thermo Scientific). Para esto, a cada reacción de secuenciación se le adicionaron 10 μ L de Perlas X-terminator y 45 μ L de Buffer SAM, se homogenizó la muestra y se agitaron durante 30 minutos. Finalmente se centrifugaron para obtener el sobrenadante y transfiriéndolo a tubos nuevos.

14. Las reacciones de secuenciación purificadas se mandaron a un servicio de secuenciación, en donde se realizó la electroforesis capilar de las mismas en un secuenciador automatizado ABI310.

15. Finalmente, las muestras se analizaron mediante el programa Chromas lite y analizadas en BLAST en la página de NCBI usando la secuencia de referencia NM_000061.2 y NP_000052.1.

RESULTADOS

MUJERES PORTADORAS

El ensayo HUMARA se aplicó a siete mujeres madres de familia, las cuales tenían al menos un hijo que había sido diagnosticado con XLA. Como ya se mencionó, en este estudio se analizó de forma indirecta la inactivación del cromosoma X en una población celular que en mujeres portadoras debería presentar un sesgo en la inactivación. Para esto fue necesario realizar el ensayo con DNA extraído a partir de linfocitos B purificados de muestras de sangre periférica de las posibles portadoras. Las muestras de DNA se sometieron a un proceso de digestión enzimática con la enzima *HhaI* la cual es sensible a la metilación; es decir, cortará en sitios específicos del cromosoma X únicamente si este no se encuentra metilado (cromosoma activo); posterior a la digestión se procedió a amplificar el segmento que contiene el STR de CAG; la amplificación sólo se llevará a cabo si el DNA se encuentra intacto, es decir si la enzima no realizó cortes, amplificándose sólo el cromosoma que se encuentra metilado (inactivo) tras emplear los cebadores con fluorocromo 5-FAM. Dado que los varones solo portan un cromosoma X, este no es inactivado así que no se lleva a cabo la digestión enzimática en este caso.

En la Imagen 11 se visualizan los productos de la PCR de las muestras de las madres y de los hijos. Como ya se mencionó, a las muestras provenientes de las posibles portadoras se les realizó una digestión enzimática previa a la amplificación de fragmentos mientras que a las muestras de los hijos no se les realizó este procedimiento. Se observan dos amplificaciones, la PCR AR y la PCR 18S; la primera de ellas muestra los productos de PCR del exón 1 de AR; mientras que la segunda se usó como control para corroborar la integridad del DNA antes y después de ser realizada la digestión enzimática. Por cada madre se observa una sola banda de aproximadamente 300 pb ya sea cuando las muestras de DNA se digirieron o no con la enzima *HhaI*, correspondiente a los productos de la amplificación del repetido CAG en AR.

Si bien en los geles de agarosa no es posible visualizar la existencia de dos bandas en el caso de las muestras sin digerir de las posibles portadoras, el propósito era corroborar que la amplificación de *AR* fuera adecuada antes de enviar las muestras para su lectura en un secuenciador automatizado, ésto con el fin de determinar la longitud exacta de los fragmentos amplificados, para poderlos cotejar con las muestras de los varones con XLA. Por otro lado, se incluyó también la muestra de DNA de un varón sometido a una digestión enzimática para corroborar la eficiencia de ésta y evitar la presencia de falsos negativos en las madres portadoras debido a una digestión ineficiente. Así mismo se incluyeron controles negativos de los reactivos para el proceso de PCR.

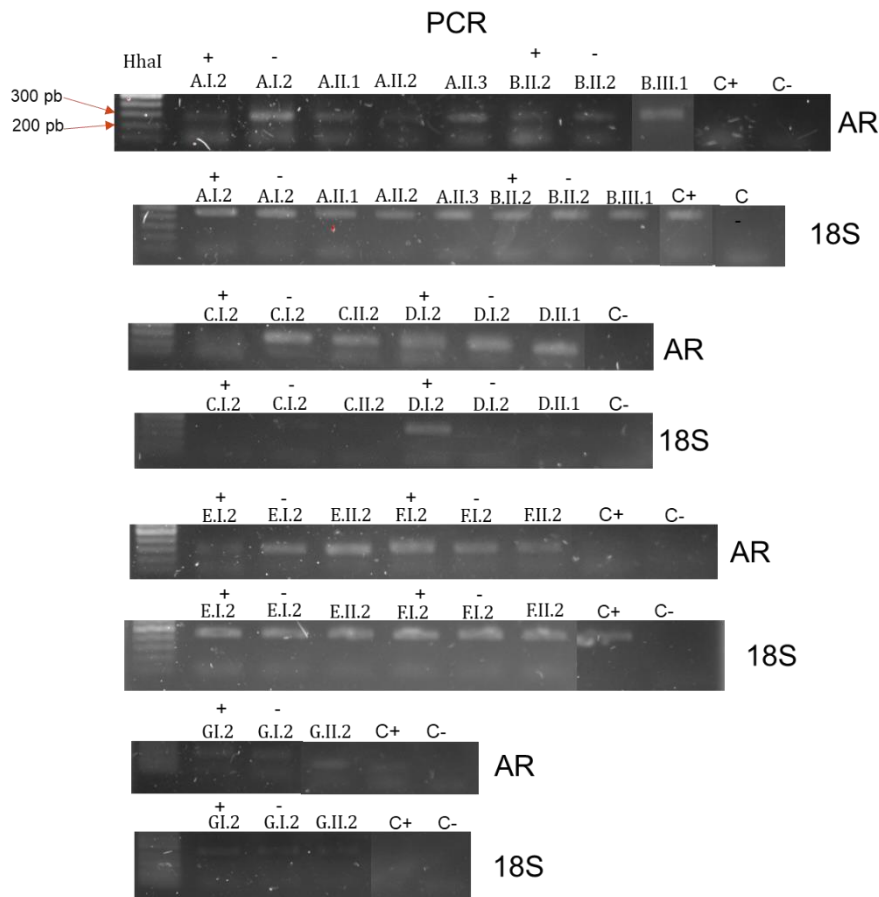


Imagen 11. Productos PCR AR y 18S. En esta imagen se observan los productos de la PCR del gen receptor de andrógenos (AR) y los productos de la PCR 18s (18S). Las muestras de las madres con un signo + en la parte superior fueron sometidas a la digestión enzimática, las muestras con el signo - indican que son muestras maternas a las que no se les realizó la digestión enzimática. Entendiéndose que a ninguna de las muestras de los hijos se les realizó la digestión enzimática. La letra C+ corresponde a un varón que pasó por el proceso de digestión con la enzima HhaI. La letra C- corresponde al control de reactivos de la PCR realizada. Las letras M corresponden a las muestras de las madres y la letra H corresponde a las muestras de los hijos.

Posterior a la comprobación de la amplificación de las PCR con los oligos HUMARA, los productos amplificados se corrieron en una electroforesis capilar en el secuenciador ABI310 para determinar la longitud de los fragmentos amplificados.

En la Imagen 12A es posible observar los picos obtenidos después de realizar la digestión enzimática; en esta imagen se observa la longitud exacta del STR CAG en las distintas mujeres. En la Imagen 12B se observan la amplificación de AR en muestras de DNA de las madres que no se digirieron enzimáticamente, corroborando de esa forma la existencia de dos longitudes distintas del fragmento, es decir, dos alelos, de esta forma es posible comparar la columna A con la columna B y se observa que la longitud de uno de los fragmentos se repite.

Debe notarse que todas las madres muestran un solo pico con una longitud característica (Imagen 12A), excepto la madre de la familia F (F.I.2) de la cual se les hablará posteriormente. Cabe mencionar que como se ha señalado anteriormente, el pico observado en estos diagramas de la Imagen 12A corresponde al fragmento STR presente en el cromosoma X inactivo (metilado) de estas madres.

En la Imagen 12B se observan las muestras de las madres sin realizarles la digestión enzimática, debido a esto, es posible amplificar los dos repetidos en ambos cromosomas; esto nos ayuda a corroborar la presencia de los dos cromosomas. Así mismo ayuda a corroborar los resultados anteriores ya que en la imagen 12A debe observarse la misma longitud que uno de los picos de la imagen 12B y ayuda a detectar cuál de los cromosomas es el que se encuentra inactivo y cual activo en los Linfocitos B de la madre.

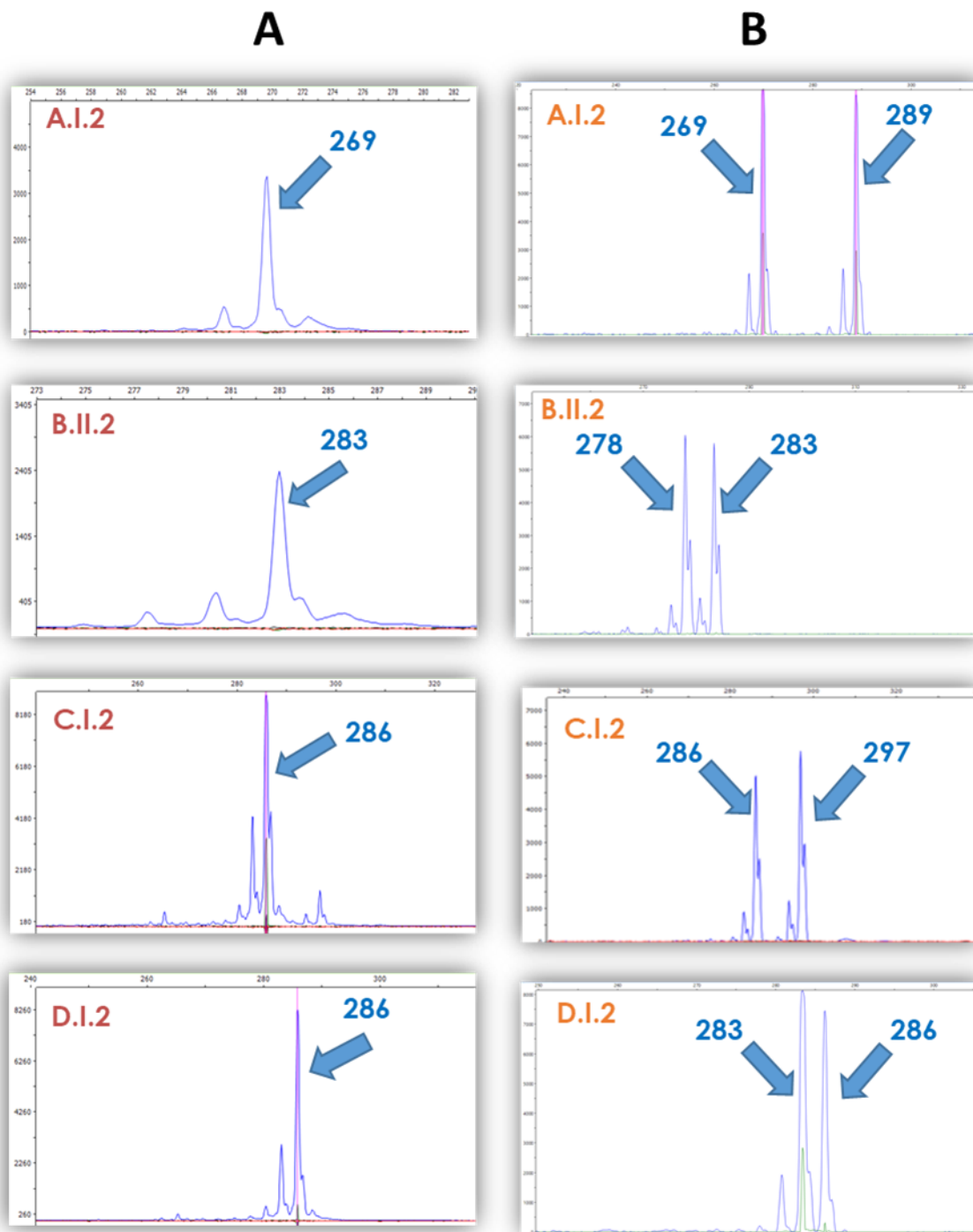


Imagen 12. Resultados de las muestras maternas con digestión enzimática con Hhal y las muestras maternas sin digerir. En la columna A a las muestras de las madres digeridas con la enzima Hhal, mientras que en el lado B se observan las muestras de estas madres sin digerir.

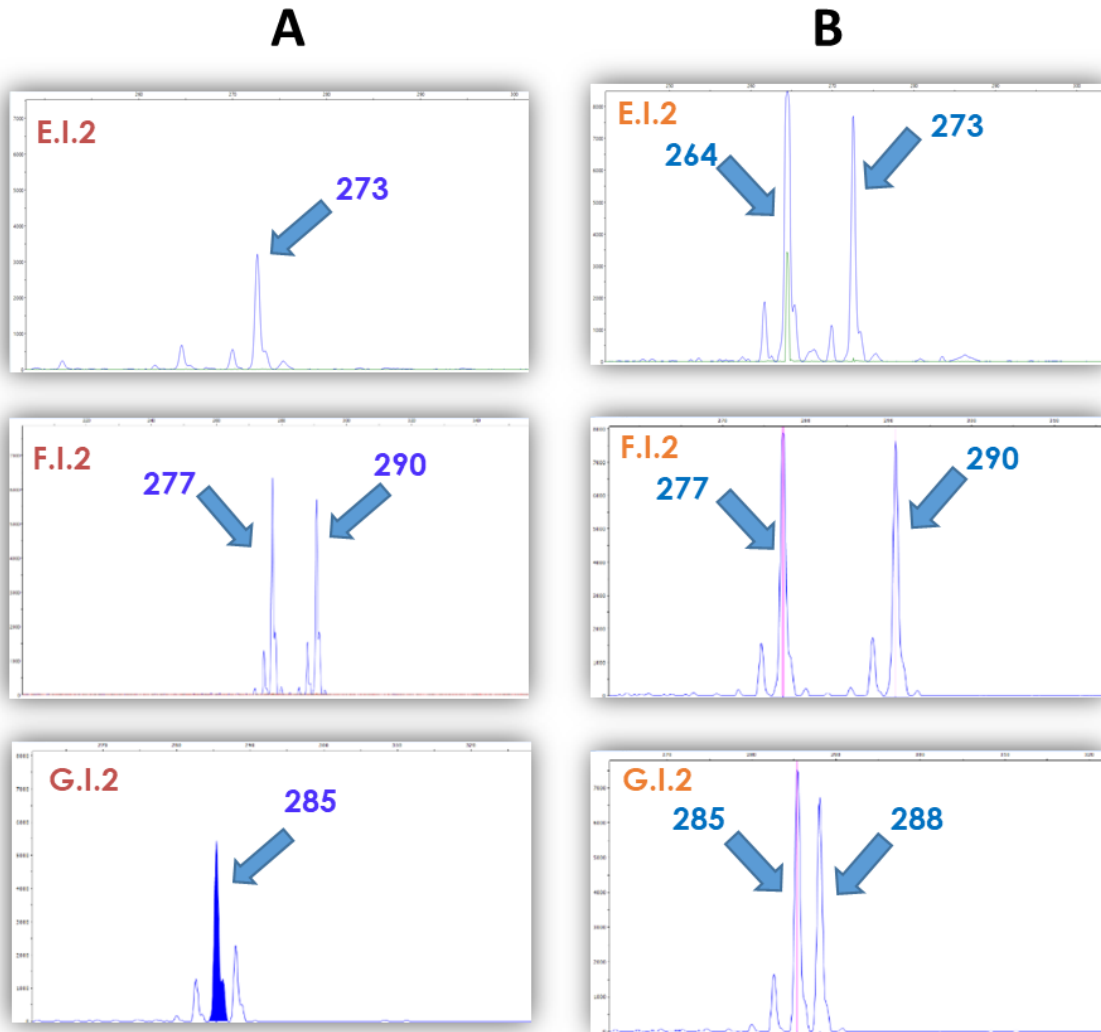


Imagen 12. Continuación... Resultados de las muestras con digestión enzimática con HhaI y las muestras maternas sin digerir. En la columna A las muestras de las madres digeridas con la enzima HhaI mientras que en el lado B se observan las muestras de estas madres sin digerir.

Para corroborar que el cromosoma inactivo corresponda al cromosoma heredado al paciente con XLA, se determinó la longitud del producto de PCR de AR para cada paciente. En la imagen 13 se muestran cuáles son los cromosomas activo e inactivo de cada madre deducidos mediante los resultados anteriores (Imagen 12) y sus respectivos hijos, los cuales cabe notar heredaron un pico con la misma longitud que la madre (el cromosoma inactivo en la madre) indicando por tanto que estos heredaron el cromosoma que en los linfocitos B de la madre se encuentra inactivo. Hay que notar dos excepciones: la madre de la familia D (D.I.2) en la cual es posible observar 2 picos de longitudes distintas y el hijo parece heredar el pico

con la longitud del cromosoma determinado como activo en la madre. El caso de la madre de la familia F (F.I.2) en la cual no se observó una inactivación sesgada del cromosoma X, por lo que podríamos pensar que el hijo de la familia F (F.II.2) presenta una mutación *de novo*, generada, probablemente, durante su desarrollo embrionario.

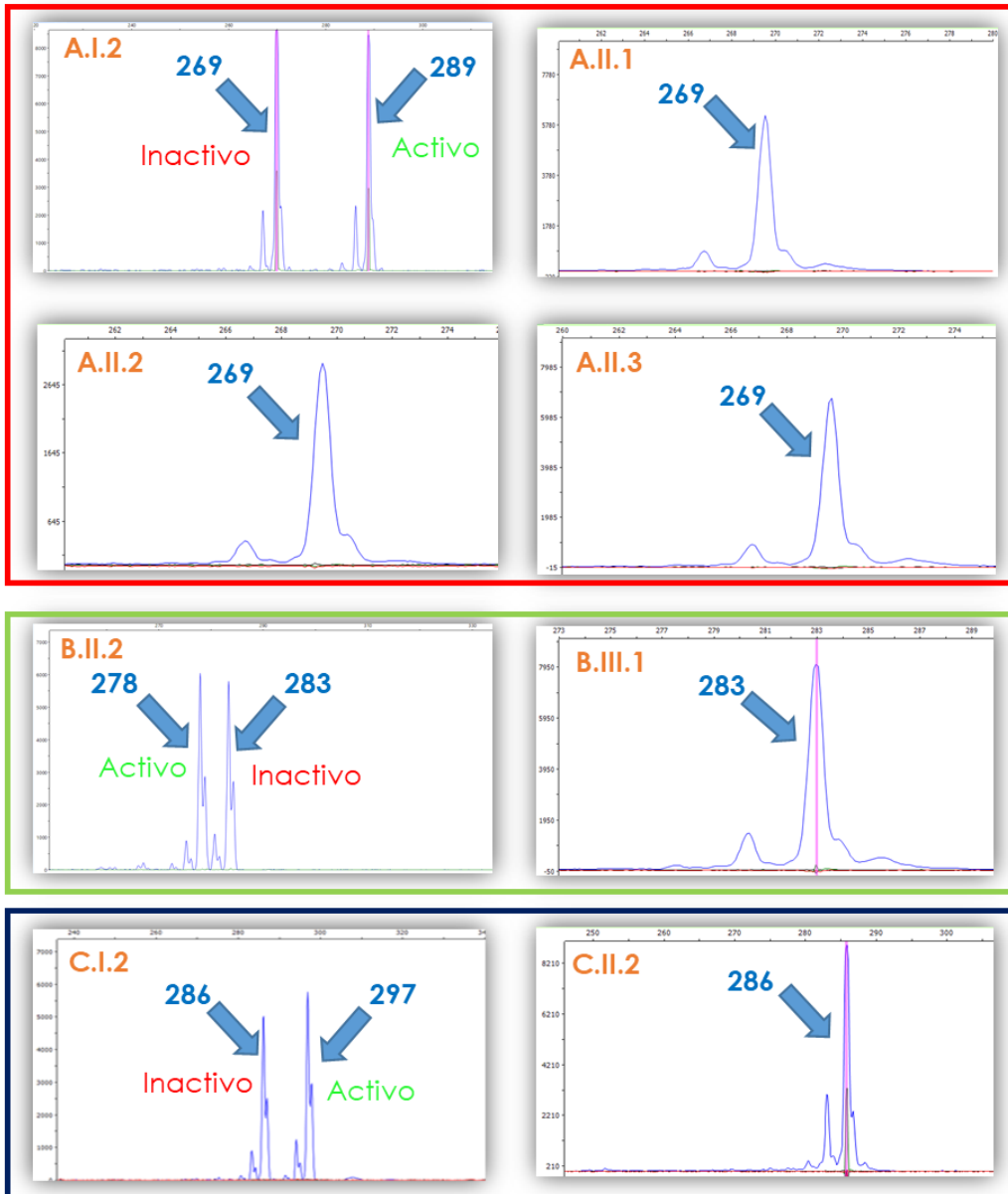


Imagen 13. Identificación de los cromosomas activo e inactivo en las muestras maternas. Se observan las muestras maternas sin digerirse enzimáticamente con sus respectivos hijos. Se estableció la longitud exacta de los fragmentos y se determinó cual de los cromosomas se encuentra activo y cual inactivo en las madres; cada familia se encuentra en un recuadro de color diferente.

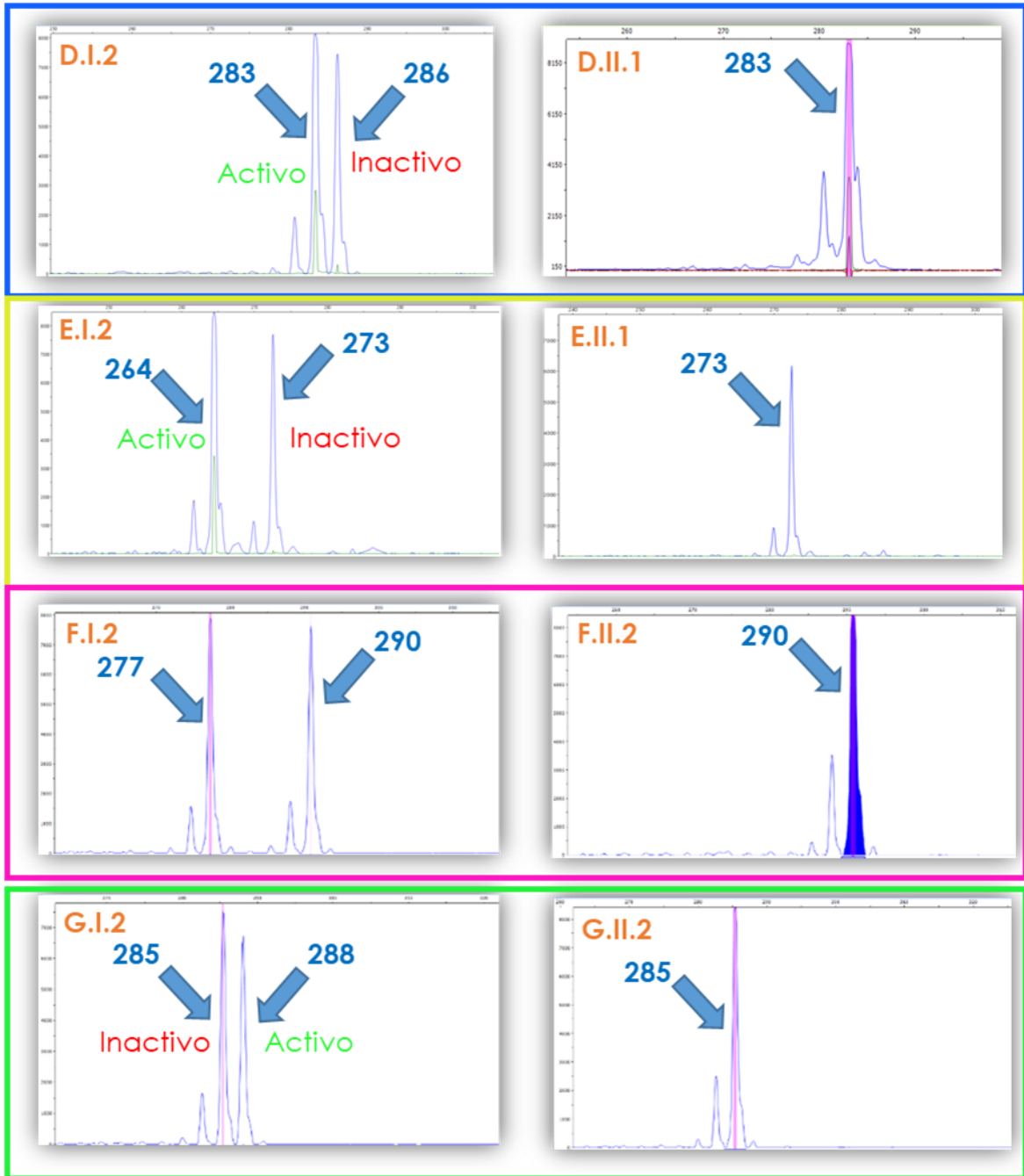


Imagen 13. Continuación... Identificación de los cromosomas activo e inactivo en las muestras maternas. Se observan las muestras maternas sin digerirse enzimáticamente con sus respectivos hijos. Se estableció la longitud exacta de los fragmentos y se determinó cual de los cromosomas se encuentra activo y cual inactivo en las madres; cada familia se encuentra en un recuadro de color diferente.

En la Tabla 14 y la Imagen 14 se observan los resultados del ensayo HUMARA sintetizados para un mejor entendimiento.

Tabla 14. Resultados obtenidos mediante el ensayo HUMARA de las distintas familias.

Familia	Paciente	Longitud STR en pb		Cromosoma		Diagnóstico
		C/digestión	S/digestión	Activo	Inactivo	
A	Mamá (A.I.2)	269	269, 289	289	269	Portadora de XLA
	Hijo (A.II.1)		269	269	-	XLA
	Hijo (A.II.2)		269	269	-	XLA
	Hijo (A.II.3)		269	269	-	XLA
B	Mamá (B.II.2)	283	278, 283	278	283	Portadora XLA
	Hijo (B.III.1)		283	283	-	XLA
C	Mamá (C.I.2)	286	286, 297	297	286	Portadora XLA
	Hijo (C.II.2)		286	286	-	XLA
D	Mamá (D.I.2)	286	283, 286	283	286	Portadora XLA
	Hijo (D.II.1)		283	283	-	¿XLA?
E	Mamá (E.I.2)	273	264, 273	264	273	Portadora XLA
	Hijo (E.II.1)		273	273	-	XLA
F	Mamá (F.I.2)	277, 290	277, 290	-	-	Madre sana
	Hijo (F.II.2)		290	290	-	¿XLA?
G	Mamá (G.I.2)	285	285, 288	288	285	Portadora XLA
	Hijo (G.II.2)		285	285	-	XLA

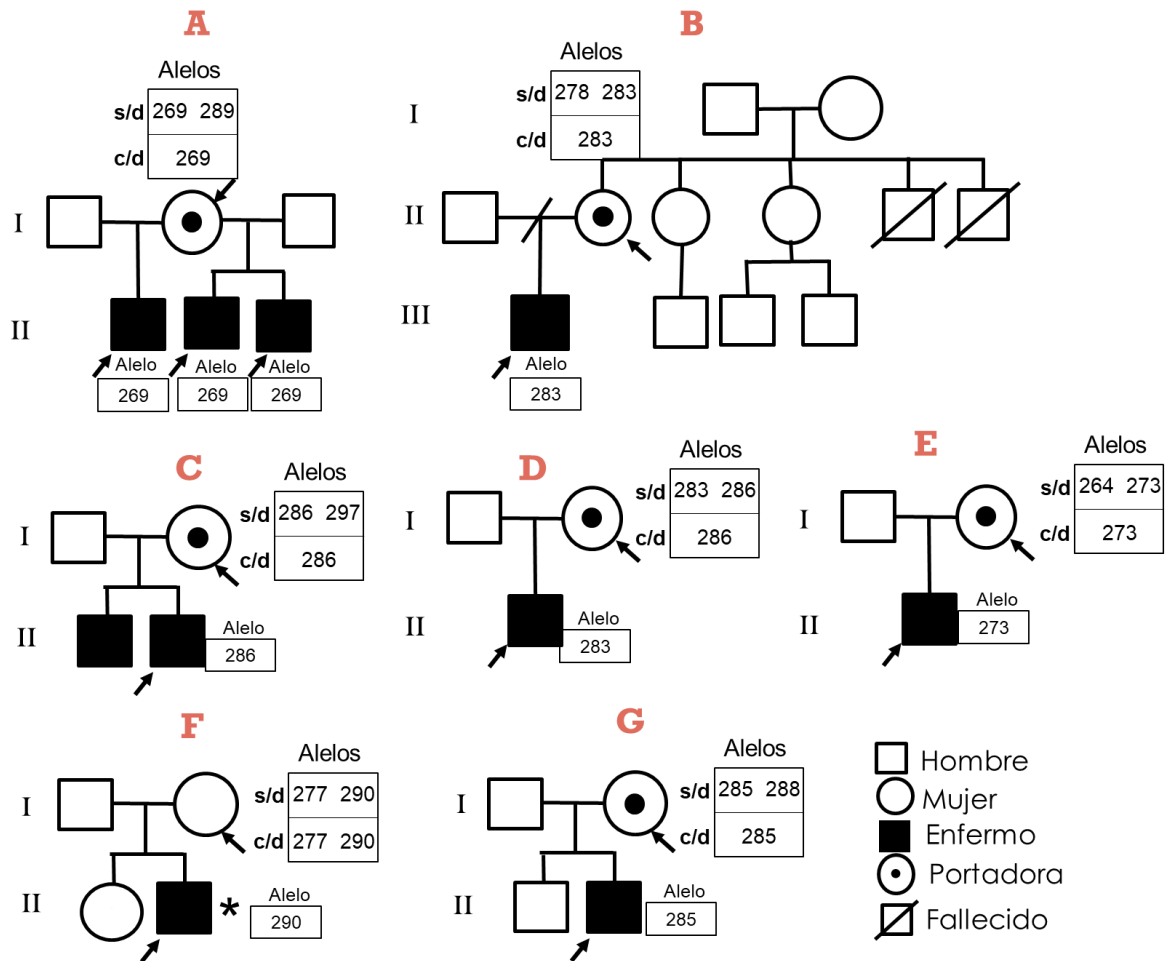


Imagen 14. Genealogía de las familias estudiadas. Se muestra la longitud de los alelos en cada muestra. s/d: sin digestión enzimática c/d: con digestión enzimática.

DETECCION DE BTK EN PACIENTES CON XLA

Se trabajaron con dos muestras particulares, las cuales pertenecen a dos pacientes que ingresaron con un fenotipo atípico de XLA, esto debido a que ambos pacientes se diagnostican a los 3 meses (F.II.2), quien presentó una infección cutánea posiblemente por *Staphylococcus aureus*. Por otro lado, el varón de la familia H (H.II.1, Imagen 9), de quien no fue posible obtener muestra de la madre para realizar el análisis de portadoras, inicia con síntomas al mes de vida en donde se presenta una infección en vías respiratorias y diarrea de difícil control. Ambos pacientes se consideran atípicos, pues en XLA, los síntomas infecciosos

normalmente comienzan después del primer año de vida, y las infecciones cutáneas son raras. En ambos casos se realizó un Western blot, el cual se mostrará a continuación. El estudio de portadoras se realizó a la madre del varón de la familia F (F.I.2) que se mostró en imágenes anteriores (Imágenes 12 y 13), quien resultó ser no portadora. En el caso del paciente de la familia H (H.II.1) no se tenía muestra de su madre con la cual se pudiera realizar el estudio y se perdió contacto con la familia; por lo cual, el estudio no pudo llevarse a cabo en este paciente. A continuación, se muestran los resultados obtenidos del Western blot.

En la Imagen 15 se observan los resultados del Western blot realizado al varón de la familia F (F.II.2), los cuales muestran una banda de más de 70 kDa correspondiente a la proteína BTK (77kDa), así mismo se observa una banda en la parte inferior cuando esta membrana fue colocada con el anticuerpo anti-BTK. Lo mismo ocurre con el paciente H.II.1 mostrando una banda correspondiente al peso conocido de la proteína BTK; sin embargo, así como en el paciente F.II.2 se observa una banda de menor peso molecular. En la parte de abajo se observan las bandas reveladas con el anticuerpo anti-GAPDH la cual es una proteína utilizada como control de carga presente en las células para llevar a cabo funciones muy importantes como la glucólisis, transcripción génica, el transporte del ARN, la replicación del ADN y en la apoptosis.

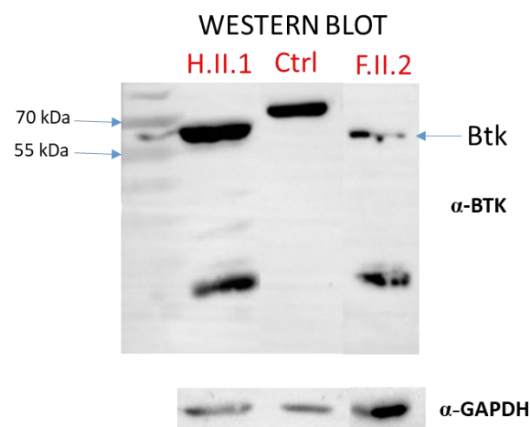


Imagen 15. Western blot realizado al varón de la familia F (F.II.2) y al varón de la familia H (H.II.2). La banda de ~70 kDa muestra a la proteína BTK. En la parte de abajo se muestran las bandas de la proteína GAPDH considerada como banda control. Así mismo se presenta una muestra control correspondiente a PBMC's de una persona sana para corroborar el proceso

Posterior a la realización del Western blot se procedió a amplificar el ARNm de BTK separándolo en cuatro reacciones de PCR; se muestran las bandas de los productos amplificados en la Imagen 16. Posteriormente se procedió a realizar la secuenciación de las muestras de ambos pacientes, para esto se realizó la inserción de los productos de PCR (Imagen 16) a un plásmido: el pJET1.2., transformando posteriormente a la bacteria *E. coli*. Como se ha mencionado en el procedimiento, una vez transformada la bacteria adquiere una resistencia a ampicilina lo cual nos ayudó a seleccionar a las colonias que podrían tener el plásmido con nuestra secuencia de interés.

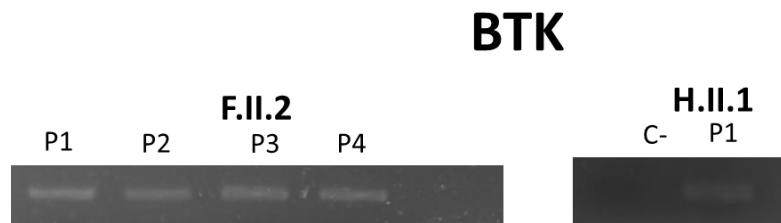


Imagen 16. Amplificación de los pares del gen BTK. Se muestran las bandas de los 4 pares en el caso del varón F.II.2 y la banda del par 1 del paciente H.II.1.

En la Imagen 17 se observan los productos de la PCR para la amplificación del plásmido, se seleccionaron 10 colonias y de estas solo las marcadas con el recuadro rojo son las que se seleccionaron para secuenciar. El gen de la BTK se dividió en 4 zonas a las que llamamos pares, se realizó el mismo procedimiento con cada par y se obtuvieron 3 colonias por cada par en caso de obtener suficientes colonias transformadas. Como se puede observar no en todos los casos fue posible obtener 3 colonias. En la parte superior se observa al varón de la familia F (F.II.2) y en la parte inferior al paciente H.II.1 al cual solo fue posible secuenciar el fragmento amplificado por el par 1 del gen.

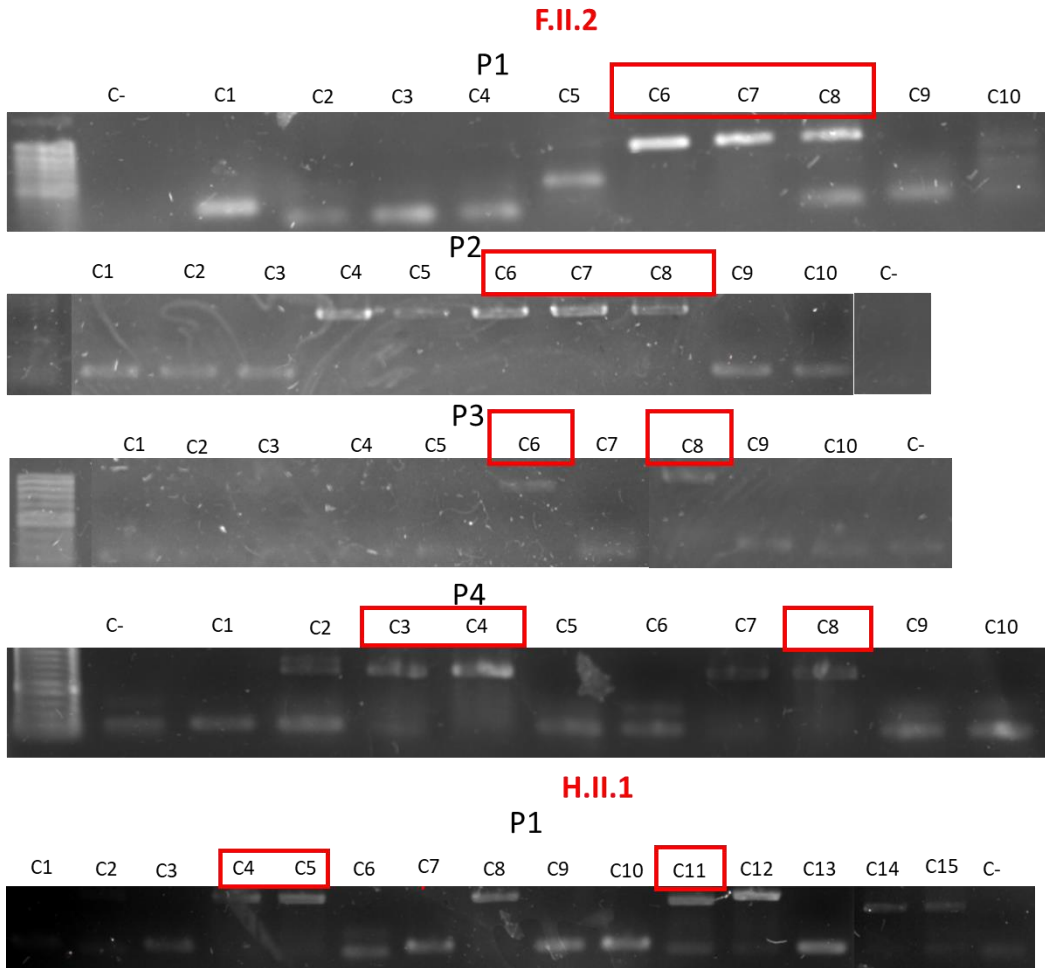


Imagen 17. Se observan los productos de la PCR amplificados del plásmido. Los cuadros rojos seleccionan las colonias que fueron posteriormente secuenciadas. P1, P2, P3, P4 se refiere al amplificado del ARNm de BTK, F.II.2:varón familia F y H.II.1: varón familia H.

Cuando se secuenciaron las muestras, se analizaron en el programa Chromas lite y posteriormente se les realizó un BLAST para corroborar las posibles mutaciones del paciente con la secuencia referencia, que en nuestro caso fue la secuencia NM_000061.2.

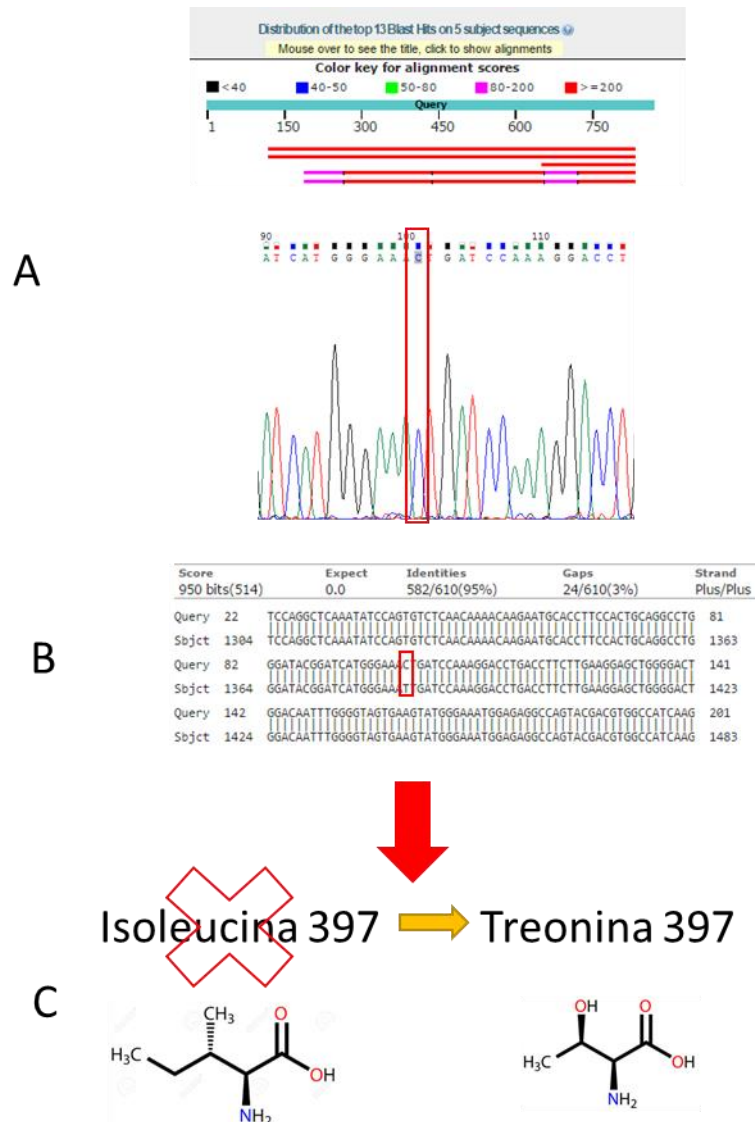


Imagen 18. Detección y caracterización de la mutación en el varón de la familia F (F.II.2). Se observa en la parte A el electroferograma obtenido mediante el programa chromas lite de F.II.2. En la sección B es posible observar el BLAST realizado a la secuencia obtenida del par 3 del gen BTK del paciente Query=Secuencia obtenida por H6 y Subject=secuencia de referencia del ARNm de BTK; se observa un cambio de base timina por una citosina (cuadro en rojo). En la sección C se observa que el cambio generado por esa mutación puntual produce un cambio del aminoácido isoleucina 397 por Treonina (p.I397T).

En la Imagen 18A se muestra el electroferograma en la sección que mostraba un cambio de base, en éste es posible observar que el pico es diferenciable de los picos adyacentes, confiriéndole una alta confiabilidad. En la imagen 18B es posible observar los resultados del BLAST de nuestra secuencia al compararla con la secuencia del cDNA de referencia, encasillado en rojo se demuestra la presencia de la mutación antes mencionada. En la sección C se muestra el cambio que ocasiona la mutación puntual encontrada, desarrollando un cambio en la Isoleucina 397 por una Treonina.

En la Imagen 19 es posible observar los resultados que arrojaron los programas predictivos al ingresar la mutación del varón de la familia F; el cambio de isoleucina por Treonina; en la Imagen 19A se usó el programa polyphen el cual predijo como consecuencia a la mutación un resultado probablemente dañino para la estructura de la proteína. En la sección B se observa el alineamiento múltiple realizado en el programa polyphen con distintas especies; en esta sección es posible observar que el aminoácido de interés (isoleucina) se encuentra altamente conservado en las distintas especies. En la sección C se usó el programa SIFT para predecir el daño que genera una cierta mutación; se clasificó la mutación como dañina en caso de presentarse ésta. Posterior a la predicción de daño se averiguó si la mutación encontrada ya se encontraba reportada; para poder realizar esto se usó la página BTKbase, en la Imagen 19D se observan los resultados de esta búsqueda; la secuencia de aminoácidos se encuentra en distintos colores dependiendo el dominio en el que se encuentra tal aminoácido, en la parte de arriba del aminoácido se observa el cambio o mutación reportado (en caso de existir); encasillado en rojo se observa a la isoleucina y en la parte superior no se observa ninguna mutación reportada.

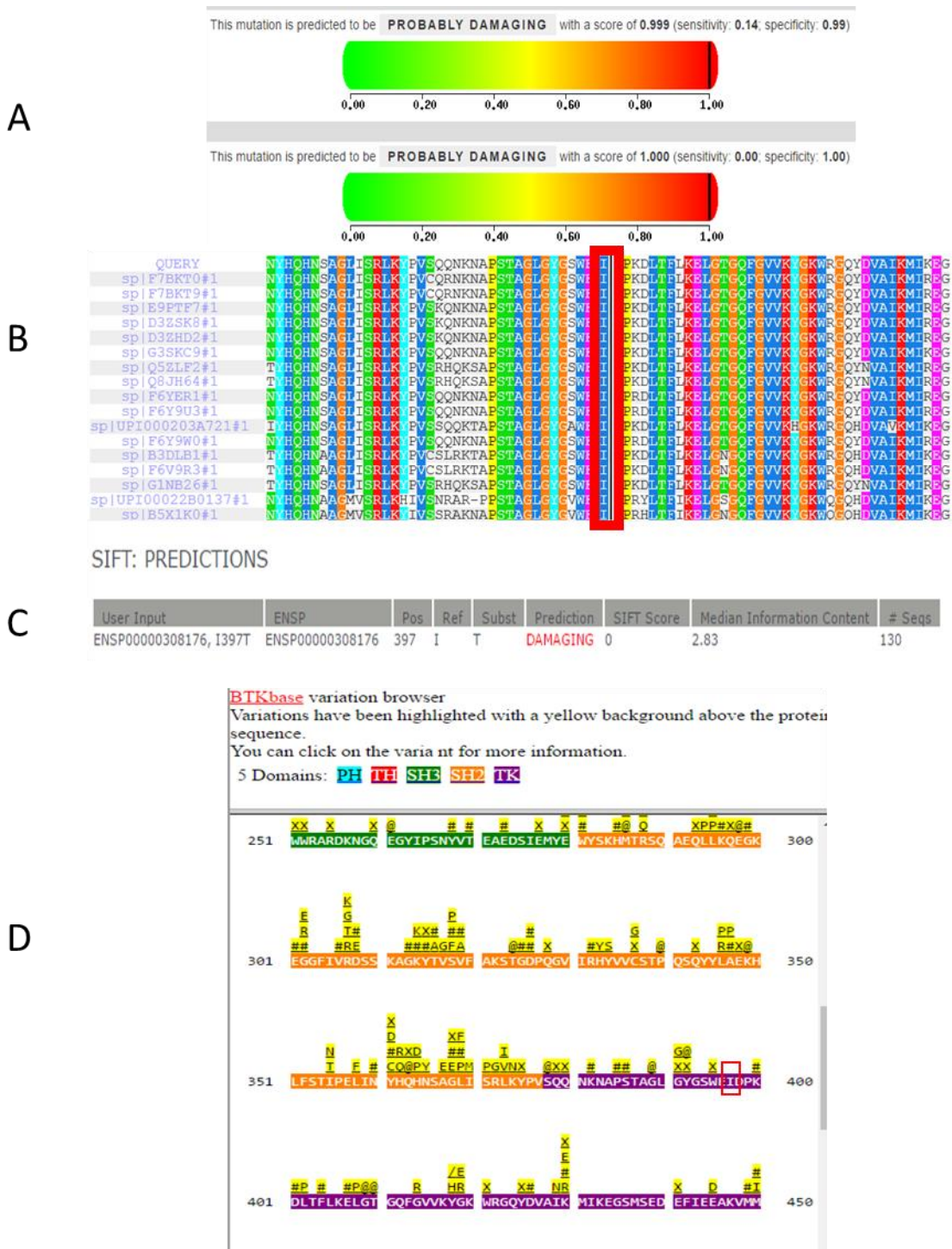


Imagen 19. Predicción del daño de la mutación encontrada en el varón de la familia F. En (A) se muestra la predicción realizada por el algoritmo SIFT, en donde marca el cambio p397T como dañino ó patogénico, en (B), se muestra que I397 es un aminoácido conservado entre varias especies, (C) En un cuadro en rojo se muestra que el residuo I397 no se ha reportado como mutado en otros pacientes con XLA reportados en la BTKbase.

En el caso del paciente H.II.1, sólo se realizó la secuenciación del primer PCR de BTK, se realizó el BLAST, el cual se muestra en la Imagen 20. Si bien es posible observar al inicio algunas mutaciones al corroborarlo con el electroferograma no se comprobaron, así mismo se revisaron otras colonias en las cuales no se encontraban las mutaciones. Dado que no se encontró mutación en dicha región es necesario continuar con la secuenciación del gen completo.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1171 bits(634)	0.0	682/703(97%)	12/703(1%)	Plus/Plus
Query 64	CAAGTCTTGCATCTCAATGCATT	CAGGAAAGCTACCTGCAGTT	CGT	CAGAACTGAAGCAC 123
Sbjct 108	CAAGTCTTGCATCTCAATGCATT	CGGAAAGCTACCTGCATTAAGT	CAGACTG	-AGCAC 166
Query 124	ACAGGTGAACTCCAGAAAAAAGAAGCT	ATGACCCGAGTGAT	-CT	-GAGAGCATTCTTT 181
Sbjct 167	ACAGGTGAACTCC-AG-AAAAGAAAGCT	ATGGCCGAGTGATT	CGGAGAGCA	-TC-TT 222
Query 182	TCTGAAGCGATCCCA-CAGAAAAAGAAAAACAT	CACCCTCTAACTTTCAAGAAGCGCCT		240
Sbjct 223	TCTGAAGCGATCCCAACAGAAAAAG-AAAAACATCA	-CCTCTAAAC-TTCAAGAAGCGCCT		279
Query 241	GTTTCTCTTGACCCGTGCACAAACTCTCCTACT	ATGAGTATGACTTTGAACGTGGGAGAA		300
Sbjct 280	GTTTCTCTTGA-CCGTGCACAAACTCTCCTACT	ATGAGTATGACTTTGAACGTGGGAGAA		338
Query 301	GAGGCAGTAAGAAGGGTTCAATAGATGTTGAGAAGAT	CACCTTGSTGTTGAAACAGTGGTTC		360
Sbjct 339	GAGGCAGTAAGAAGGGTTCAATAGATGTTGAGAAGAT	CACCTTGSTGTTGAAACAGTGGTTC		398
Query 361	CTGAAAAAAAACTCCTCCTCCAGAAAGACAGATTCC	GAGAAGAGGTGAAGAGTCCAGTGAAA		420
Sbjct 399	CTGAAAAAAAACTCCTCCTCCAGAAAGACAGATTCC	GAGAAGAGGTGAAGAGTCCAGTGAAA		458
Query 421	TGGAGCAAATTTCAATCATTGAAAGGTTCCCTTAT	CCCTTCCAGGTTGTATATGATGAAG		480
Sbjct 459	TGGAGCAAATTTCAATCATTGAAAGGTTCCCTTAT	CCCTTCCAGGTTGTATATGATGAAG		518
Query 481	GGCCTCTCTACGTCTTCTCCCAACTGAAGAACTA	AAGGAAGCGGTGGATTCAACAGCTCA		540
Sbjct 519	GGCCTCTCTACGTCTTCTCCCAACTGAAGAACTA	AAGGAAGCGGTGGATTCAACAGCTCA		578
Query 541	AAAAAGTAATCCGGTACAACAGTGATCTGGTT	CAGAAATATCACCTTGCTCTGGATCG		600
Sbjct 579	AAAAAGTAATCCGGTACAACAGTGATCTGGTT	CAGAAATATCACCTTGCTCTGGATCG		638
Query 601	ATGGGCAGTATCTCTGCTGCTCTCAGACAGCCAAA	AATGCTATGGGCTGCCAAATTTGG		660
Sbjct 639	ATGGGCAGTATCTCTGCTGCTCTCAGACAGCCAAA	AATGCTATGGGCTGCCAAATTTGG		698
Query 661	AGAACAGGAATGGAAGCTTAAAACCTGGGAGTTCT	CACCGGAAGACAAAAAGCCTCTTC		720
Sbjct 699	AGAACAGGAATGGAAGCTTAAAACCTGGGAGTTCT	CACCGGAAGACAAAAAGCCTCTTC		758
Query 721	CCCCAACGCCTGAGGAGGACCAGATCTTGAAAAAG	CCACTACC 763		
Sbjct 759	CCCCAACGCCTGAGGAGGACCAGATCTTGAAAAAG	CCACTACC 801		

Imagen 20. Se muestra el BLAST realizado a la secuencia del par 1 del gen BTK del paciente H.II.1. Ninguno de los cambios observados fueron significativos.

DISCUSIÓN

ESTUDIO DE PORTADORAS

El estudio de portadoras de XLA se realiza desde hace dos años en el Instituto Nacional de Pediatría. El primer estudio realizado, comprende el análisis de 16 mujeres posibles portadoras [40], de las cuales en sólo 7 de estas fue posible realizar la comparación de los picos con sus respectivos familiares con XLA, quedando en duda el estado de portadoras para varias de las mujeres analizadas.

En este estudio, realizamos el análisis de 7 posibles mujeres portadoras, todas ellas, se compararon el resultado con sus respectivos hijos. Además, realizamos la caracterización de expresión de BTK y de la mutación presente, en un paciente que tenía un fenotipo poco compatible con XLA, por presentarse a los tres meses de vida con una infección cutánea severa por *Staphylococcus aureus*, infecciones que se consideran raras en estos pacientes.

Todas las muestras empleadas en este trabajo presentaron una buena amplificación de los productos de PCR. En la Imagen 11 se muestran los resultados de la electroforesis realizada a los productos de la PCR 18S y exón 1 de *AR*; en esta imagen se puede notar que los productos de PCR *AR* se encuentran presentes y que el control de digestión enzimática se realizó correctamente ya que no se observa amplificación de *AR* en esta muestra. En el caso de los productos de PCR 18S se observan todas las bandas, ya que este producto se empleó como control de carga, esto indica que la ausencia de amplificación del exón 1 de *AR* en las muestras digeridas de los varones se debe a una efectiva digestión con *HhaI* y que dicha digestión no afectó la integridad del DNA total y que por lo tanto las condiciones en la que se realizó la digestión es adecuada.

En este estudio se incluyeron varias familias, en una de estas, se tenían tres hijos enfermos con XLA (familia A), en el resto, había solo un hijo afectado. En la Imagen 12 se observan a las 7 familias estudiadas, en esta imagen en la sección 12A se observa que al realizar la digestión enzimática del DNA de los linfocitos B

se presenta un solo pico de una longitud determinada en la mayoría de las familias con excepción a la madre de la familia F (F.I.2); esto nos indica que en las poblaciones de linfocitos B de estas familias no se presenta la inactivación al azar; sólo se observa un pico indicando, por lo tanto, que en estas células se presenta una inactivación sesgada del X en el que sólo uno de los cromosomas X se encuentra inactivo, dándonos por lo tanto el indicio de que se presenta inactivación sesgada del cromosoma X y dado el historial familiar, estas mujeres resultan ser portadoras, ya que se sabe que en la XLA los linfocitos B no pueden terminar su proceso de maduración y no es posible encontrarlos en sangre periférica. Es importante notar que se presenta una excepción en este caso; la madre de la familia F (F.I.2), la cual no presenta un sesgo en la inactivación del cromosoma X; y se observa que los picos presentan aproximadamente la misma altura; lo cual podría indicarnos que esta madre no resulta portadora de la XLA como las otras muestras (Imagen 12 y 13).

La madre de la familia A (A.I.2), quien tiene tres hijos con XLA, se consideró como un control positivo para este ensayo, siendo considerada como una portadora obligada (Genealogía A, Imagen 14). En la imagen 12A se observa que la inactivación del cromosoma X se encuentra sesgada en esta mujer; al analizar la imagen 13 se determinó cuál de los cromosomas de la madre se encuentra inactivo y cual activo y se observan los resultados de los hijos; en esta familia se observó que el cromosoma inactivo de la madre muestra un repetido CAG de una longitud de 269 pares de bases y que los hijos muestran un repetido de la misma longitud (269 pb); indicando que la madre presenta inactivación sesgada y que ésta resulta ser portadora del padecimiento.

En la mayoría de las familias se observa que la mujeres analizadas resultaron ser portadoras de la XLA, ya que se observa un sesgo en la inactivación del cromosoma X y se detecta que el cromosoma inactivo en la madre presenta un repetido CAG de la misma longitud que los amplificadores observados en sus hijos. Resulta interesante observar el caso de la madre de la familia D (D.I.2), en este caso el hijo que padece la XLA, presenta un alelo de 283 pb el cuál no

corresponde al alelo inactivo de la madre quien presentó una inactivación sesgada en donde el alelo inactivo es de 286pb y el alelo activo es de 283 pb. Dado que la población de linfocitos B de la madre si muestra un sesgo en su inactivación del cromosoma X y, que la diferencia entre ambos alelos de la madre es de sólo 3 pb, es decir un repetido extra, podría pensarse que el alelo heredado al hijo sufrió una modificación, es decir el alelo de 286 pb de la madre perdió un triplete al heredarse al hijo, durante la replicación genética; quizás una explicación alterna podría deberse a un error en el procedimiento HUMARA debido a la cercanía en la longitud del repetido CAG de los cromosomas. No se encontró información acerca de cierta ineffectividad del ensayo HUMARA si la longitud de los repetidos es muy cercana.

Así mismo se han descrito inactivaciones sesgadas del cromosoma X en mujeres sanas y se ha visto que este patrón se incrementa con la edad [41], motivo por el cual es importante tener en cuenta que a la madre de la Genealogía D, el resultado de portadora de XLA se debe confirmar por secuenciación directa de *BTK*, y ésta, debe tener la misma mutación que su hijo.

En el caso de la familia F (Imagen 14) se observó que la madre no muestra una inactivación sesgada del cromosoma X en la población de linfocitos B en sangre periférica, por lo cual se considera que el paciente (Genealogía F, F.II.2) podría estar presentando una mutación *de novo* en *BTK* (lo cual se discutirá a continuación). Así mismo, el paciente podría presentar otro tipo de agammaglobulinemia la cual es debido a mutaciones en la cadena pesada μ , a la proteína BLNK, entre otras, y su herencia sería entonces autosómica recesiva. Este tipo de agammaglobulinemia es difícil de distinguir ya que muestran prácticamente la misma sintomatología que la XLA distinguiéndose únicamente cuando se ha descartado la mutación en el gen de la proteína BTK [42].

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BTK EN PACIENTES CON XLA

En los resultados que se observaron con anterioridad del ensayo de Western blot (Imagen 15) pueden rescatarse un par de cosas: los pacientes que presentan el padecimiento de XLA típico cuando se les realiza un Western blot, en su mayoría no presentan una banda de ~77 kDa, ó no se observa ninguna banda debido a que las mutaciones en *BTK* producen un RNA que no codifica para la proteína adecuada, resultando una proteína que se degrada con facilidad; sin embargo en el caso de estos pacientes es posible observar una banda de ~70 kDa indicando una proteína de menor peso que la proteína de referencia; pero también es posible observar una banda de menor tamaño cuando se revelaron las membranas con anticuerpo anti-BTK indicando por tanto que existe proteína de menor peso molecular que es reconocida por el anticuerpo empleado, indicando quizás una posible degradación de esta proteína. Este fenómeno fue posible observarlo en los pacientes analizados; esto aunado al fenotipo que presentaban nos llevó secuenciar las muestras de estos pacientes. Así mismo ya se había determinado que la madre de la familia F (F.I.2) no presentaba una inactivación sesgada del cromosoma X, lo cual nos haría pensar como ya se mencionó anteriormente en una mutación *de novo* ó una mutación en un gen diferente a *BTK*.

Para comprobar si se trataba de una mutación *de novo* en BTK, se realizó la secuenciación de este gen en el paciente F.II.2, observándose un cambio de timina por citosina en la posición 1354 de la secuencia del cDNA (Ensembl cDNA ENST00000308731.7 [43]), cambio conocido como transición dado que el cambio se da entre dos pirimidinas. Este cambio se encuentra dentro de un triplete ATT el cuál codifica para una Isoleucina en la posición 397 de la proteína, el triplete resultante (ACT) codifica para Treonina (Imagen 18). Cabe resaltar que este cambio no ha sido reportado en ningún paciente con XLA [44] y como se observa en la Imagen 19 el algoritmo SIFT indica que el cambio p.I397T se predice como dañina para la correcta funcionalidad de esta proteína. Esta mutación cae en el dominio que corresponde para la función del dominio de cinasa de la proteína (SH1), este dominio resulta trascendental para la actividad de fosforilación de la

proteína. Se ha reportado que la mayor incidencia de mutaciones recae en el dominio SH1, es decir en el dominio de tirosín cinasa (44.7%) [17].

Finalmente, es importante señalar que esta mutación debe ser corroborada con la secuenciación de más colonias transformadas con la secuencia de BTK ya que sólo se observó esta mutación en una de sola colonia, por lo que es necesario repetir la secuenciación.

En el caso del paciente H.II.1 sólo se secuenció la primera parte del mRNA de *BTK* no observándose ninguna mutación en el par 1 secuenciado del gen de la BTK, es necesario secuenciar los demás pares para determinar si existe o no una mutación en el gen de la BTK.

CONCLUSIONES

Mediante el ensayo Humara se logró la correcta detección del cromosoma inactivo en la población de linfocitos B de madres de pacientes diagnosticados con XLA. A través de esta detección del cromosoma inactivo fue posible determinar a las madres portadoras del padecimiento ya que se seleccionaron correctamente las poblaciones linfocitarias que presentan la inactivación sesgada del cromosoma X. De las siete mujeres analizadas en este trabajo, el resultado de inactivación sesgada fue positivo y claro para 5 de ellas, una de ellas presentó inactivación al azar, y en una de ellas, el resultado no fue claro, sin embargo a pesar de esto, se considera que es un método valioso, ya que evitar realizar la búsqueda de mutaciones en todas las madres para determinar si son portadoras o no.

Fue posible la secuenciación completa del gen de la proteína BTK en uno de los pacientes, encontrando una mutación en el aminoácido 397. Así mismo fue posible predecir la gravedad de esta mutación mediante programas computacionales.

REFERENCIAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002) "Molecular Biology of the Cell", 4a edición. Innate Immunity. Nueva York, Garland Science, Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26846/>
2. Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S.. (2008). "Células y tejidos del sistema inmunitario adaptativo". En *Inmunología celular y molecular* (47). España: Elsevier.
3. Kindt, Thomas. Goldsby, Richard. Osborne, Barbara. "Inmunología de Kuby", Mc Graw Hill (2007), México.
4. Montecino-Rodriguez, E., & Dorshkind, K. (2012). B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult. *Immunity*, 36(1), 13–21. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.11.017>
5. Hoffman, W., Lakkis, F. G., & Chalasani, G. (2016). "B Cells, Antibodies, and More". *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. <http://doi.org/10.2215/CJN.09430915>
6. Pillai Shiv, Cariappa Annaiah. (2009), "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decisión", *Nature Reviews Immunology*. Doi: 10.1038/nri1656.
7. Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). "B-cell biology and development". En *The Journal of allergy and clinical immunology*. 131(4), 959-971. Recuperado de : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
8. Siggs, O., Arnold, C., Huber, C., et al. (2011). "Emptyhive". Mayo 25, 2017, de Mutagenetix. Sitio web: https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/phenotypic/phenotypic_pdf.cfm/mutagenetixemptyhive.pdf?pk=382
9. Bousfiha, A., Jeddane, L., Al-Herz W., et al. (2015). "The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies", *J Clin Immunol*. Recuperado en: 10.1007/s10875-015-0198-5
10. Abbas. Op. cit., p. 470
11. ESID, (2014). Major Immunodeficiency Groups, ESID. Recuperado de: <https://esid.org/Working-Parties/Registry/ESID-Database-Statistics>
12. Ogden C. Bruton, (1952) "Agammaglobulinemia", *Pediatrics*, USA, 722-728.

13. Smith C., Berglöf A. X-Linked Agammaglobulinemia. 2001 [Updated 2016 Aug 4]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews. Seattle: University of Washington, Seattle; 1993-2017. Recuperado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1453/>
14. U.S. National Library of Medicine, “Quantitative nephelometry test”, Consultado el 10/Mayo/17 en: <https://medlineplus.gov/ency/article/003545.htm>
15. U.S. National Library of Medicine, “X-Linked agammaglobulinemia”, Genetics Home Reference, Consultado el 15/Mayo/2017 en: ghr.nlm.nih.gov/
16. Maas A, Hendriks R. (2001). Role of Bruton’s Tyrosine Kinase in B Cell Development. *Developmental Immunology*. p.171-181. doi:10.1155/2001/28962.
17. López, G., Vargas, A., González, M., et al. (2014), “Bruton’s tyrosine kinase- an integral protein of B cell development that also has an essential role in the innate immune system”, *J Leukoc Biol*, Dio:10.1189/jlb.0513307
18. NCBI, (Actualizado 2017), “BTK Bruton tyrosine kinase [Homo sapiens (human)]” Recuperado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/695>
19. Human Gene Database, “BTK”, *GeneCards*, Consultado en: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BTK>
20. Immune Deficiency Foundation, “Inheritance”, Consultado en: <https://primaryimmune.org/about-primary-immunodeficiencies-diagnosis-information/inheritance>
21. IPOPI, “Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X”, International Patient Organisation for Primary Immunodeficiencies, (2007), Consultado en www.ipipo.org
22. Centro de medicina embrionaria, “¿Qué son las enfermedades hereditarias monogénicas?”. Consultado en: http://www.pgdcem.com/enf_hereditarias.html

23. Ahn, J. & Lee, J. (2008) "X chromosome: X inactivation". *Nature Education* 1(1):24. Consultado en: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/x-chromosome-x-inactivation-323>
24. McHugh, C., Chen, C., Chow, A., et al. (2015). "The Xist lncRNA directly interacts with SHARP to silence transcription through HDAC3", *Nature*, 14; 521: 232-236. Consultado en doi:10.1038/nature14443
25. Minajigi, A., Froberg, J., Wei, C., et al. (2015). "A comprehensive Xist interactome reveals cohesin repulsion and an RNA-directed chromosome conformation", *Science*, Volumen 349, Doi 10.1126/science.aab2276
26. Avner, P. & Heard, E. (2001). "X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation", *Nature Reviews Genetics* 2, 59-67. Doi:10.1038/35047580.
27. Vallot, C. Ouimette, J. et al. (2016). "Establishment of X-chromosome inactivation and epigenomic features of the inactive X depend on cellular contexts", *Bioessays Journal* 38, 869-880. Doi: 10.1002/bies.201600121
28. Gontan, C. Achame, E., et al. (2012). "RNF12 initiates X-chromosome inactivation by targeting REX1 for degradation", *Nature* 485, 386-390. Doi: 10.1038/nature11070
29. Van den Berg, I. M., Laven, J. S. E., Stevens, M., Jonkers, I., Galjaard, R.-J., Gribnau, J., & Hikke van Doorninck, J. (2009). X Chromosome Inactivation Is Initiated in Human Preimplantation Embryos. *American Journal of Human Genetics*, 84(6), 771-779. <http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.05.003>
30. Moindrot, B. Brockdorff, Neil. (2016), "RNA binding proteins implicated in Xist-mediated chromosome silencing", *Seminars in Cell & Developmental Biology* 56, 58-70. Doi: 10.1016/j.semcdb.2016.01.029
31. Kaneko, S., Bonasio, R., Saldaña, R., et al. (2014). "Interactions between JARID2 and noncoding RNAs regulate PRC2 recruitment to chromatin", *Molecular cell*, 53, 290-300. Consultado en: doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.012
32. Chu, C., Zhang, Q., da Rocha, S., (2015). "Systematic discovery of Xist RNA binding proteins", *Cell* 161, 404-416. doi 10.1016/j.cell.2015.03.025

33. Pinheiro, I. y Heard, E. (2017), "X chromosome inactivation: new players in the initiation of gene silencing" [version1; 2 approved]. F1000Research doi: 10.12688/f1000research.10707.1
34. Przanowski, P. Wasko, U. & Bhatnagar, S. (2018), "Novel molecular players of X chromosome inactivation: new technologies and new insights". *Journal of Translational Genetics and Genomics*. Vol 2:2. Doi: 10.20517/jtgg.2017.03
35. Boudewijns M, van Dongen JJM, Langerak AW. (2007), "The Human Androgen Receptor X-Chromosome Inactivation Assay for Clonality Diagnostics of Natural Killer Cell Proliferations". *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. Vol 9(3):337-344. doi:10.2353/jmoldx.2007.060155.
36. Fearon, E., Winkelstein, J. Civin, C., Pardoli, D. Vogelstein, (1987). "Carrier detection in X-linked agammaglobulinemia by analysis of X-Chromosome inactivation", *The New England Journal of Medicine*, Vol. 316, No. 8, pp 427-431.
37. Human Gene Database, AR Gene (Protein Coding), Gene cards, Consultado en: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AR>
38. Uchida T, Ohashi H, Aoki E, Nakahara Y, et al. (2000). "Clonality analysis by methylation-specific PCR for the human androgen-receptor gene (HUMARA-MSP)", *Leukemia*, Volumen 14, Pag 207-212
39. Chen, G. L., & Prchal, J. T. (2007) "X-linked clonality testing: interpretation and limitations". *Blood*, 110, 1411-1419. Consultado el 4 Mayo 2017. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-018655>.
40. Rodríguez Toriz, Pamela. (2015), "Identificación del estado de portadoras en mujeres con hijos con Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X", Facultad de Química, Asesora Gabriela López Herrera, Para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga.
41. Tonon, L., Bergamaschi, G., Dellavecchia, C., et al. (1998) "Unbalanced X-chromosome inactivation in haemopoietic cells from normal women", *British Journal of Haematology*, DOI: 10.1046/j.1365-2141.1998.00867.x

42. Cooper, M., Lanier, L., Conley, M., y Puck, J. (2003). "Immunodeficiency Disorders", ASH, no. 1. 314-330. Consultado en: <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2003/1/314.full>
43. Ensembl, (2012), "Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase", Consultado en: http://may2012.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000010671;r=X:100604435-100641183;t=ENST00000372869
44. Väliäho J. Smith Cl, Vihinen M. (2006) "BTKbase: the mutation database for X-Linked agammaglobulinemia. Hum Mutat". 27(12:1209-1217 Pubmed. Consultado en: <http://structure.bmc.lu.se/idbase/BTKbase/browser.php?content=browser>
45. Tobón, G., Izquierdo, J., y Cañas, C., (2013) "B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity—Focus on Systemic Lupus Erythematosus," *Autoimmune Diseases*, doi:10.1155/2013/827254.
46. LeBien TW, Tedder TF. "B lymphocytes: how they develop and function". *Blood*. 2008;112(5):1570-1580. doi:10.1182/blood-2008-02-078071.
47. M. Speletas, M. Kanariou, F. Kanakoudi-Tsakalidou, E. Papadopoulou-Alataki, K. Arvanitidis, E. Pardali, A. Constantopoulos, G. Kartalis, M. Vihinen, P. Sideras & K. Ritis. "Analysis of Btk Mutations in Patients with X-Linked Agammaglobulinaemia (XLA) and Determination of Carrier Status in Normal Female Relatives: a Nationwide Study of Btk Deficiency in Greece", *Scand. J. Immunol.* 2001, 54, 321-327.
48. BTK Uniprot. Consultado el 20/Abril/17 en www.uniprot.org
49. Larry R. Rohrschneider,¹ John F. Fuller, Ingrid Wolf, Yan Liu, and David M. Lucas, "Structure, function, and biology of SHIP proteins", *Genes & Development* 14:505–520 2000 Consultado en: www.genesdev.org
50. Sabine Middendorp, Gemma M. Dingjan, Alex Maas, Katarina Dahlenborg, Rudolf W. Hendriks. "Function

of Bruton's Tyrosine Kinase during B Cell Development Is Partially Independent of Its Catalytic Activity", *The Journal of Immunology* December 1, 2003, 171 (11) 5988-5996; DOI: 10.4049/jimmunol.171.11.5988..

51. Gaspar HB, Lester T, Levinsky RJ, Kinnon C. Bruton's tyrosine kinase expression and activity in X-linked agammaglobulinaemia (XLA): the use of protein analysis as a diagnostic indicator of XLA. *Clinical and Experimental Immunology*. 1998;111(2):334-338. doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00503.x.