

TESIS DOCTORAL

Diagnóstico Molecular y Genético de Inmunodeficiencias Primarias ligadas al X

Laura Martínez Martínez

Director: Óscar de la Calle Martín

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

Barcelona, 2011

***A mis abuelos,
a los que siempre llevo conmigo,
esté donde esté.***

Todo el que me conoce sabe que ésta es mi parte preferida de las Tesis, porque refleja algo más que el componente intelectual del doctorando. Creo que es la más difícil de escribir, porque tratar de comprimir en unas pocas líneas todo el agradecimiento no es tarea fácil, o al menos para mí.

Muchas cosas han pasado desde que empezara a formar parte de Inmuno en junio del 2003. Y muchas también han cambiado: mi paso de becaria a residente, el traslado al nuevo hospital, la división espacial entre la asistencia y la investigación... Pero lo que nunca ha cambiado es la sensación de formar parte de una gran familia, la familia de Inmuno. Porque todos los que hemos tenido la suerte de formar parte de ella sabemos que Inmuno es diferente. Podría explicar mil y una razones, pero necesitaría otras doscientas páginas más para hacerlo, así que, sin más preámbulos, pasaré a los agradecimientos individuales.

Al Dr. Óscar de la Calle, mi jefe y director de esta Tesis Doctoral. Por ser mi mentor, por enseñarme cada día, pero sobretodo, por confiar siempre en mí. Por ser más que un jefe, un amigo con quién contar y una mente a la que admirar. Mil gracias.

A la Dra. Cecilia González, mi compañera de fatigas. Por compartir tantos momentos dentro y fuera del laboratorio, por ser mi amiga y por estar ahí cuando te necesito. Te echo de menos todos los días.

A todas y cada una de las personas que forman y han formado parte del Servicio de Inmunología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Al Dr. Cándido Juárez, jefe del servicio, por su sabiduría y su paciencia infinita. A las Dras. Carmen Gelpí y Esther Moga, por sus consejos. A todas las técnicas, auxiliares, secretarias y administrativas. A Nenuca, por ser tan grande pero sobretodo, por ser mi madrina; a Elena, por su confianza ciega en mí y por defenderme siempre; a Mariví, por mostrarme que se pueden hacer mil cosas a la vez y además, bien; a Conchi, porque ser leonesa se lleva en el alma y hay que demostrarlo todos los días; a Manuela, por su particular manera de ver la vida; a Tere, por aguantarme y facilitarme las cosas siempre que lo he necesitado; a Meritxell, por escucharme y enseñarme que en la vida todo llega; a Carmen Hayles, por incentivarme a que llegara este momento; a Gemma, por llevar a Inmuno en el corazón y por ser una gran amiga; a Yolanda, Eli, Carmen Hernández, Montse, Bea, Esther Owono, Herminia, Rosa, Antonia, Carles, Isabel Fernández, Eva, Gemma Agudo, Marta Simón... y al Dr. José Luis Rodríguez, por su colaboración y por todos los ratos que hemos compartido y vivido. Y por supuesto, a mis compañeros residentes: a mis Rs mayores, Juan, Carlos y Diego, y a mis Rs pequeños, Mila, Maite y Felipe, porque sé que no es fácil soportarme todos los días y vosotros lo habéis hecho estoicamente.

A toda la Ciencia, recientemente rebautizada como Inmunología Experimental. A todos los doctores y no doctores, a los investigadores y becarios, a los másters y estudiantes, y en especial, a aquéllos que sufrieron siguiendo mis carreras por el laboratorio. A la Dra. Silvia Vidal, por ser el espejo en el que mirarme cada día; a la Dra. Bet Cantó, por sus valiosas enseñanzas y sus mejores consejos; a Consol, por ser mi primera máster, porque para mí verte cada día en el laboratorio es motivo de orgullo y satisfacción, y por ser mi amiga; a Eder, por escucharme, animarme, entenderme; a Juan, por ser un hombro en el que llorar y alguien en quien confiar; a Carlos Z, por las risas que nos pasamos todos los días. A mis chicos y chicas del máster y de prácticas: Marc, Isaac, Orlando, Albert, Marta Pradas, Marta López, Jose y, sobretodo, Chiara, porque siempre he intentado enseñaros todo lo que sé, pero ante todo, impregnaros de este amor que siento por lo que hago, por mi trabajo. Al resto de personal investigador, a los que están y a los que se fueron: M^a Àngels, Cristina, Bea, Mari Paz, Mónica, Luis, Ignasi... por acogerme tan bien y sentir que soy de la Ciencia; y al resto de chicos del máster, por preguntarme y confiar en mis consejos, en particular a Tere.

A todo el personal del hospital que me ha ayudado en la realización de esta Tesis Doctoral y muy en especial a la Dra. Isabel Badell, a la que admiro profundamente. A los facultativos de otros hospitales que han confiado en nosotros para diagnosticar a sus pacientes. Y por supuesto, a ellos, a los pacientes y sus familiares, todo mi agradecimiento.

Y finalmente, pero no por ello menos importante, a mi familia, a mis padres y mi hermana, por estar siempre ahí, por todo el amor que me han dado y todos los valores que me han inculcado, porque si he llegado hasta aquí es gracias a ellos, que bien saben que esto lo estoy diciendo con lágrimas en los ojos. Y a mis amigos, que aunque a veces no dé señales de vida, me acuerdo siempre de ellos y estoy ahí para lo que necesiten.

Gracias

Las Inmunodeficiencias Primarias (IDPs) son enfermedades congénitas del sistema inmune que tienen en común una susceptibilidad incrementada a las infecciones. Se han descrito más de 200 entidades englobadas bajo esta definición. Algunas de ellas tienen una herencia ligada al X, lo que les confiere ciertas peculiaridades.

En esta Tesis presentamos los resultados concernientes a 28 pacientes, casi todos varones, con sospecha de IDP en base a una elevada frecuencia y severidad de infecciones. A cada uno de ellos se les evaluó inmunológicamente, lo que permitió, junto con las manifestaciones clínicas y los antecedentes familiares, establecer un diagnóstico presuntivo de IDP. A partir de aquí, realizamos estudios funcionales, moleculares y genéticos específicos para la IDP sospechada. Estos análisis permitieron identificar la causa genética de la enfermedad, así como ver el grado de afectación de la proteína mutada. Además, se estudió la presencia de la mutación en la familia para determinar portadoras de la patología y posibles pacientes no diagnosticados. En paralelo a estos estudios, los pacientes fueron tratados, siendo muchos de ellos sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). En este trabajo también se evaluó la recuperación post-TPH repitiendo algunas de las pruebas realizadas durante el diagnóstico.

En primer lugar, se estudiaron 6 pacientes con sospecha de Inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID). Tras el análisis inmunológico y funcional se analizaron los genes candidatos y se establecieron las mutaciones responsables. Dos de ellos presentaban la forma ligada al X (X-SCID), con alteraciones en *IL-2GR*: p.Lys120fsX46 y p.Arg222Cys. El caso clínico 3 resultó tener una deficiencia en JAK-3 con una mutación no descrita (p.Thr456fsX520). El caso clínico 4 se diagnosticó de Disgenesia Reticular tras encontrar una mutación en *AK2* (c.A1T). Aunque los casos clínicos 5 y 6 presentaban manifestaciones clínicas bastante diferentes, establecimos que ambos hermanos padecían un SCID-Omenn causado por la mutación c.631delT en *RAG-2*. En el análisis de los dos hermanos con sospecha de Síndrome de hiper-IgM ligado al X encontramos una gran deleción que impedía la expresión de CD40L. Asimismo, estudiamos dos pacientes con Agammaglobulinemia ligada al X: el caso clínico 9 mostró la mutación c.557dupA, mientras que el caso clínico 10, la p.Arg288Gln. A los 4 pacientes con sospecha de Síndrome de Wiskott-Aldrich se les encontró una mutación en el gen *WAS*: IVS6+5G>A, IVS3+2-3insT, p.Arg34STOP y IVS8+1G>A. El estudio del gen *WAS* también nos permitió establecer el diagnóstico de Neutropenia ligada al X en el caso clínico 15 (p.Ile294Thr). Se estudiaron 4 pacientes de 2 familias distintas con posible Síndrome Linfoproliferativo ligado al X. Una de las familias presentaba la mutación p.Val102Gly en el gen *SH2D1A* en los tres hermanos, a pesar de que el menor no había presentado sintomatología. En el otro paciente hallamos una deleción completa del gen. La prueba para la determinación de la capacidad oxidativa de los granulocitos nos permitió diagnosticar a 8 pacientes de Enfermedad Granulomatosa Crónica. Posteriormente, analizamos los genes responsables hasta encontrar el defecto genético. Los casos clínicos 20 y 21 presentaron mutaciones en el gen

CYBB: p.Cys59Arg y p.Lys247fsX7, respectivamente. Los casos clínicos 22, 23 y 24 son 3 hermanos a los que les determinamos la presencia de la recombinación homóloga entre el gen *NCF1* y su pseudogen. El análisis del caso clínico 25 mostró que era un heterocigoto compuesto para dos mutaciones en *NCF2*: p.Lys161STOP y una duplicación génica que incluye los exones 9 y 10. Mientras que los casos clínicos 26 y 27 también revelaron una alteración en *NCF2*, pero en este caso en homocigosis (p.Arg77STOP). Por último, el estudio del caso clínico 28 mostró la mutación más prevalente responsable de Incontinencia Pigmenti.

I. Introducción	1
1.- El sistema inmune	3
1.1.- La respuesta inmunitaria	3
1.2.- Las células del sistema inmune	4
2.- Inmunodeficiencias Primarias	6
2.1.- Definición de Inmunodeficiencia Primaria	6
2.2.- Herencia genética de las IDPs	6
2.3.- Clasificación de las IDPs	7
2.4.- Manifestaciones clínicas de las IDPs	8
2.5.- Diagnóstico y Tratamiento de las IDPs	10
2.6.- IDPs ligadas al X	14
3.- Inmunodeficiencias Severas Combinadas	16
3.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de las SCID	17
3.2.- Vías de señalización a través de IL-2R γ	18
3.3.- Bases moleculares del X-SCID y la Deficiencia en JAK3	19
3.4.- Análisis mutacional del gen <i>IL-2RG</i>	20
3.5.- Análisis mutacional del gen <i>JAK3</i>	21
3.6.- Bases moleculares de la Disgenesia Reticular	21
3.7.- Análisis mutacional del gen <i>AK2</i>	21
3.8.- Bases moleculares del SCID T-B- y OS	22
3.9.- Análisis mutacional de los genes <i>RAG-1</i> y <i>RAG-2</i>	22
3.10.- Diagnóstico de las SCID.....	23
3.11.- Tratamiento y pronóstico de las SCID	24
4.- Síndromes de hiper-IgM	25
4.1.- Generación del repertorio de anticuerpos	25
4.2.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de los Síndromes HIGM	27
4.3.- Bases moleculares del XHIM.....	28
4.4.- Análisis mutacional del gen <i>TNFSF5</i>	29
4.5.- Diagnóstico del XHIM	29
4.6.- Tratamiento y pronóstico del XHIM.....	30
5.- Agammaglobulinemia ligada al X.....	31
5.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de la XLA.....	31
5.2.- Bases moleculares de la XLA	32
5.3.- Aspectos funcionales de BTK	33
5.4.- Análisis mutacional del gen <i>BTK</i>	34
5.5.- Diagnóstico de la XLA.....	35
5.6.- Tratamiento y pronóstico de la XLA	35
6.- Síndrome de Wiskott-Aldrich.....	36
6.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas del WAS y XLT	36
6.2.- Bases moleculares del WAS/XLT	38
6.3.- Análisis mutacional del gen <i>WAS</i>	39

6.4.- Correlación fenotipo-genotipo en WAS y XLT.....	40
6.5.- Diagnóstico de WAS y XLT.....	41
6.6.- Tratamiento y pronóstico del WAS y XLT	41
6.7.- Neutropenia ligada al X	42
7.- Disqueratosis Congénita	43
7.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de la DKC.....	43
7.2.- El complejo de la telomerasa.....	44
7.3.- Bases moleculares de la DKC	44
7.4.- Análisis mutacional del gen <i>DKC1</i>	46
7.5.- Tratamiento y pronóstico de la DKC.....	46
8.- Síndrome Linfoproliferativo ligado al X.....	47
8.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas del XLP.....	47
8.2.- Bases moleculares del XLP	48
8.3.- Papel de SAP en la respuesta inmunitaria.....	49
8.4.- Análisis mutacional del gen <i>SAP/SH2D1A</i>	50
8.5.- Diagnóstico del XLP.....	50
8.6.- Tratamiento y pronóstico del XLP	51
9.- Síndrome de Inmunedisregulación, Poliendocrinopatía y Enteropatía de herencia ligada al X	52
9.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas del IPEX	52
9.2.- Bases moleculares del IPEX.....	53
9.3.- Células T reguladoras CD4+ CD25+	54
9.4.- Análisis mutacional del gen <i>FOXP3</i>	55
9.5.- Diagnóstico del IPEX.....	55
9.6.- Tratamiento y pronóstico del IPEX.....	56
10.- Enfermedad Granulomatosa Crónica.....	57
10.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de la CGD.....	58
10.2.- Complejo enzimático NADPH oxidasa.....	59
10.3.- Bases moleculares de la CGD	59
10.4.- Análisis mutacional de los genes <i>CYBB, CYBA, NCF1, NCF2 y NCF4</i>	61
10.5.- Correlación fenotipo-genotipo en CGD	62
10.6.- Diagnóstico de la CGD.....	63
10.7.- Tratamiento y pronóstico de la CGD	63
11.- Displasia Ectodérmica Anhidrótica con Inmunodeficiencia	64
11.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de EDA-ID/IP	64
11.2.- La vía NF-κB en las EDA	66
11.3.- Bases moleculares de EDA-ID/IP.....	67
11.4.- Análisis mutacional del gen <i>NEMO</i>	67
11.5.- Diagnóstico de EDA-ID e IP.....	68
11.6.- Tratamiento y pronóstico de EDA-ID e IP	68
12.- Deficiencia en Properdina.....	69
12.1.- El sistema del complemento	69
12.2.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de las deficiencias de complemento.....	70
12.3.- Deficiencia en Properdina	71
12.4.- Diagnóstico y tratamiento de las deficiencias de complemento	72
12.5.- Tratamiento y pronóstico de las deficiencias de complemento	72
II. Hipótesis de trabajo y Objetivos	73
III. Material y Métodos.....	77
1.- Pacientes	79

2.- Líneas celulares	79
3.- Determinación de los niveles de inmunoglobulinas.....	79
4.- Separación de poblaciones celulares de la sangre	79
4.1.- Obtención de leucocitos (<i>buffy coat</i>)	79
4.2.- Obtención de células mononucleares	80
4.3.- Obtención de neutrófilos.....	80
5.- Fenotipado celular mediante citometría de flujo	81
5.1.- Análisis de la expresión de proteínas de superficie	81
5.2.- Análisis de la expresión de proteínas intracelulares	83
6.- Análisis de la expresión proteica	84
6.1.- Obtención de extractos celulares	84
6.2.- <i>Western blot</i>	84
6.3.- <i>Stripping</i> : reutilización de las membranas	85
6.4.- <i>Western blot</i> para la proteína β -actina.....	86
6.5.- <i>Western blot</i> para la proteína Btk.....	86
6.6.- <i>Western blot</i> para la proteína WASP	86
6.7.- <i>Western blot</i> para la proteína gp91 ^{phox}	86
6.8.- <i>Western blot</i> para la proteína p47 ^{phox}	86
6.9.- <i>Western blot</i> para la proteína p67 ^{phox}	86
7.- Análisis de funciones leucocitarias	87
7.1.- Determinación de la señalización vía IL-2	87
7.2.- Estimulación policlonal de linfocitos T con PHA + IL-2	88
7.3.- Evaluación de la expresión de CD40L y otras moléculas de activación	88
7.4.- Estudio de la capacidad proliferativa de los linfocitos T.....	89
7.5.- Estudio de la movilización de gránulos citotóxicos en células NK	91
7.6.- Determinación de la capacidad oxidativa de los granulocitos.....	92
8.- Análisis de la expresión génica.....	93
8.1.- Extracción de RNA.....	93
8.2.- Síntesis de cDNA	94
8.3.- Amplificación de cDNA.....	94
8.4.- <i>Primers</i> para RT-PCR	95
9.- Análisis de la secuencia génica.....	96
9.1.- Extracción de DNA	96
9.2.- Amplificación por PCR.....	97
9.3.- <i>Primers</i> para PCR genómica	97
9.4.- Detección de DNA/cDNA amplificado.....	101
9.5.- Secuenciación de un producto de PCR o RT-PCR	102
9.6.- Cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR).....	103
9.7.- Digestión de un producto de PCR con enzimas de restricción.....	103
9.8.- Clonaje de productos de PCR o RT-PCR	104
IV. Resultados	107
1.- Inmunodeficiencias Severas Combinadas	109
1.1.- X-SCID: Caso clínico 1.....	109
1.2.- X-SCID: Caso clínico 2.....	113
1.3.- AR-SCID: Caso clínico 3	116
1.4.- Disgenesia Reticular: Caso clínico 4.....	119
1.5.- Síndrome de Omenn: Casos clínicos 5 y 6.....	122
2.- Síndromes de hiper-IgM	129

2.1.- XHIM: Casos clínicos 7 y 8	129
3.- Agammaglobulinemia ligada al X.....	138
3.1.- XLA: Caso clínico 9.....	138
3.2.- XLA: Caso clínico 10.....	142
4.- Síndrome de Wiskott-Aldrich.....	146
4.1.- WAS: Caso clínico 11.....	146
4.1.2.- Datos inmunológicos	146
4.2.- WAS: Caso clínico 12.....	154
4.3.- WAS: Caso clínico 13.....	157
4.4.- WAS: Caso clínico 14.....	160
4.5.- XLN: Caso clínico 15.....	163
4.5.4.- Estudio de individuos portadores.....	164
5.- Síndrome linfoproliferativo ligado al X.....	165
5.1.- XLP: Casos clínicos 16, 17 y 18	165
5.2.- XLP: Caso clínico 19.....	167
6.- Enfermedad Granulomatosa Crónica.....	171
6.1.- X-CGD: Caso clínico 20	171
6.2.- X-CGD: Caso clínico 21	177
6.3.- AR-CGD: Casos clínicos 22, 23 y 24	180
6.4.- AR-CGD: Caso clínico 25	184
6.5.- AR-CGD: Casos clínicos 26 y 27	191
7.- Incontinencia Pigmenti.....	194
7.1.- IP: Caso clínico 28	194
V. Discusión	197
1.- Inmunodeficiencias Primarias	199
2.- Inmunodeficiencias Severas Combinadas	200
3.- Síndromes de hiper-IgM.....	203
4.- Agammaglobulinemia ligada al X.....	205
5.- Síndrome de Wiskott-Aldrich.....	206
6.- Síndrome linfoproliferativo ligado al X.....	208
7.- Enfermedad Granulomatosa Crónica.....	209
8.- Incontinencia Pigmenti.....	212
VI. Conclusiones.....	215
VII. Abreviaturas	219
VIII. Bibliografía	225

I. Introducción

1.- El sistema inmune

1.1.- La respuesta inmunitaria

Inmunidad significa protección contra la enfermedad. El sistema inmune está formado por las células y moléculas responsables de la inmunidad que interactúan para dar lugar a la respuesta inmunitaria, una respuesta colectiva y coordinada de todas ellas frente a sustancias extrañas. Por tanto, la función fisiológica del sistema inmune, que es la respuesta inmunitaria, es la defensa contra sustancias extrañas. Esta defensa está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa. Ambas respuestas son componentes de un sistema integrado en que numerosas células y moléculas funcionan de forma cooperativa. La respuesta innata estimula la inmunidad adaptativa e influye en la naturaleza de las respuestas adaptativas a los microorganismos; y las respuestas adaptativas utilizan muchos mecanismos efectores de la inmunidad innata para eliminar los microorganismos, aumentando la actividad antimicrobiana de éstos (Abbas, 2007).

La **inmunidad innata**, también denominada inmunidad natural, proporciona la primera línea de defensa frente a los microorganismos. Comprende los mecanismos presentes antes de que se produzca la infección y que están preparados para responder con rapidez ante ésta. Son específicos frente a estructuras compartidas por grupos de microorganismos relacionados, como los PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), y responden de la misma manera frente a infecciones repetidas. Los principales componentes de la inmunidad innata son las barreras fisicoquímicas que constituyen los epitelios y sus sustancias antimicrobianas, las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), los linfocitos citotóxicos naturales (NK, *natural killer*), el sistema del complemento y las citocinas, que actúan coordinando y regulando las actividades de las células de la inmunidad innata.

La **inmunidad adaptativa**, también denominada inmunidad específica o adquirida, es la respuesta inmunitaria generada frente a sustancias extrañas, los antígenos, que aumenta en magnitud y capacidad de defensa con cada exposición sucesiva. Existe una especificidad precisa contra distintos antígenos pudiendo distinguir entre moléculas y microorganismos diferentes, incluso estrechamente relacionados y una capacidad de memoria para responder con más intensidad y rapidez a posteriores exposiciones. Los componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos T y B y sus productos. Dentro de la respuesta adaptativa se diferencian la inmunidad humoral y la inmunidad celular. La inmunidad humoral está mediada por los anticuerpos, o inmunoglobulinas, que son producidos por los linfocitos B. La unión antígeno-anticuerpo neutraliza la capacidad infecciosa de los microorganismos extracelulares permitiendo su eliminación mediante diferentes mecanismos. Aunque todas las células nucleadas del organismo tienen la capacidad de presentar moléculas de origen intracelular, existen células presentadoras de antígeno profesionales que presentan moléculas de origen extracelular. Si estas moléculas son de origen extraño serán reconocidos por los linfocitos T y se desencadenará la respuesta de la inmunidad celular que consistirá en destruir las células infectadas por microorganismos intracelulares y sintetizar citocinas para estimular el cambio de isotipo de inmunoglobulinas, potenciar la fagocitosis y, en síntesis, controlar la respuesta inmunitaria.

Las principales características de las respuestas inmunitarias adaptativas son la especificidad, que garantiza que los distintos antígenos desencadenen respuestas concretas; la diversidad, que capacita al sistema inmune para responder a una amplia variedad de antígenos; la memoria, que conduce a una amplificación de la respuesta ante la exposición repetida al mismo antígeno; la especialización, que genera respuestas adecuadas para defenderse contra distintos tipos de microorganismos; y el reconocimiento de lo propio, que evita la lesión del huésped durante la respuesta frente a antígenos extraños (Paul, 2008).

1.2.- Las células del sistema inmune

Las células del sistema inmune son los leucocitos. Junto con los eritrocitos y las plaquetas constituyen la fracción celular de la sangre. Todas ellas derivan de una célula madre pluripotencial hematopoyética que se origina y se desarrolla en la médula ósea. Esta célula madre da lugar a un progenitor mielóide, que acaba diferenciándose en eritrocitos, plaquetas, monocitos-macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos o células dendríticas; y a un progenitor linfóide, a partir del cual se formarán los linfocitos T, B y NK (Figura I.1).

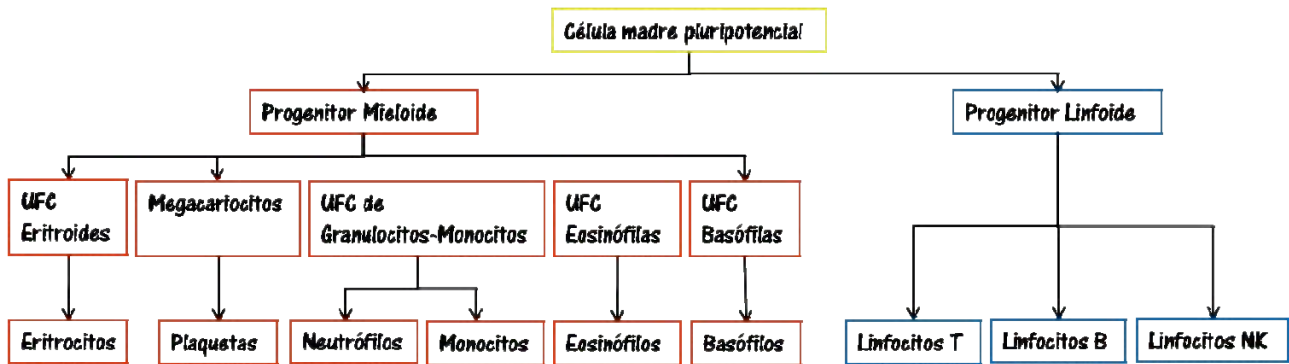


Figura I.1. Esquema de la diferenciación de las células sanguíneas.

Los monocitos son células circulantes de la sangre que continuamente migran a los tejidos donde se diferencian a macrófagos y otras células especializadas, como las células de Kupffer del hígado. Tanto los monocitos como los macrófagos son fagocitos. Los macrófagos son células con una vida media larga que tienen como función principal engullir y destruir a los microorganismos: actúan como primera línea de defensa en la respuesta innata y posteriormente, eliminan patógenos y células infectadas marcadas por la respuesta adaptativa. Además, los macrófagos orquestan las respuestas inmunitarias: inducen inflamación que es necesaria para una respuesta exitosa, y secretan proteínas señalizadoras que activan y reclutan a otras células del sistema inmune. Por otro lado, los macrófagos actúan limpiando las células muertas después de la eliminación de la infección.

Los granulocitos reciben su nombre por sus densos gránulos citoplasmáticos. También se llaman polimorfonucleares, debido a la forma irregular de su núcleo. Existen tres tipos de granulocitos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los neutrófilos son las células más numerosas del sistema inmune y las más importantes en la respuesta innata: fagocitan una gran variedad de microorganismos y los destruyen eficientemente en sus vesículas intracelulares gracias a sus enzimas y sustancias antimicrobianas. Tanto eosinófilos como basófilos juegan un papel importante en la defensa contra parásitos, ya que estos microorganismos son demasiado

grandes para ser ingeridos por macrófagos o neutrófilos. No obstante, su principal importancia en el ámbito de la medicina son las reacciones alérgicas, donde sus efectos son más nocivos que protectores. Pero son los mastocitos los que dirigen la respuesta alérgica y también están involucrados en la defensa frente a parásitos, principalmente pluricelulares.

Las células dendríticas internalizan activamente partículas durante su estadio inmaduro en muchos órganos no linfoides. Posteriormente, migran a las áreas que ocupan los linfocitos T en los órganos linfoides secundarios donde madurarán y presentarán los antígenos procesados a los linfocitos T para activarlos. Debido a esta función, estas células son denominadas células presentadoras de antígeno (APCs). Estas células son la clave de la unión entre la respuesta innata y la adaptativa. Los macrófagos también pueden actuar como APCs.

Los linfocitos NK derivan del progenitor linfoide, pero a diferencia de los linfocitos T y B, son linfocitos que responden a la infección de manera inespecífica, por lo que forman parte del sistema inmune innato. Los linfocitos o células NK reconocen y eliminan células tumorales y células infectadas por virus. Son filogenéticamente más antiguos que los linfocitos antígeno-específicos, ya que existen en animales que no presentan diversidad en la generación del repertorio de receptores.

Los linfocitos antígeno-específicos, los linfocitos T y B, responden a una gran variedad de patógenos gracias a receptores de antígeno altamente variables presentes en su superficie, a través de los cuales reconocen y unen péptidos. Cada linfocito madura llevando una única variante del prototipo de receptor, por lo que cada población de linfocitos expresa un enorme repertorio de receptores que son muy diversos en las regiones de reconocimiento antigénico. En ausencia de infección, la mayoría de los linfocitos circulantes son inactivos porque todavía no han encontrado el antígeno que los active. Estos linfocitos, denominados *naïve*, son mayoritarios en los primeros meses de vida. Una vez han encontrado el antígeno se activan y se diferencian a linfocitos funcionales denominados linfocitos efectores.

Los linfocitos B poseen en su superficie el BCR (*B-cell receptor*). Tras la unión del antígeno se diferencian a células plasmáticas, su forma efectora, que secretaran anticuerpos, la forma secretada del BCR con idéntica especificidad antigénica. Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas (Ig), pueden ser de diferente isotipo: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Cada uno de ellos ejerce diferentes papeles en la respuesta inmunitaria humoral: estimulación de la fagocitosis, opsonización, liberación de citocinas, activación del complemento, entre otros.

Los linfocitos T tienen en superficie el TCR (*T-cell receptor*), relacionado con las inmunoglobulinas, pero muy diferente en cuanto a estructura y propiedades de reconocimiento. Existen dos tipos principales de linfocitos T según su función efectora: los linfocitos T citotóxicos (Tc o T CD8+), que destruyen células infectadas por virus u otros patógenos intracelulares; y los linfocitos T colaboradores (Th o T CD4+), que secretan citocinas que activan los linfocitos B, provocando su diferenciación y la producción de anticuerpos, y también a los macrófagos, para ser más eficientes en la eliminación de patógenos, entre otros papeles.

Durante el curso de la respuesta inmunitaria, algunas células T y B activadas por el antígeno pueden diferenciarse a células memoria, que son los linfocitos responsables de la inmunidad a largo plazo que prosigue a la exposición a la infección o vacunación. Estas células memoria rápidamente se diferenciarán a células efectoras en una segunda exposición al antígeno específico (Janeway, 2001).

2.- Inmunodeficiencias Primarias

2.1.- Definición de Inmunodeficiencia Primaria

Las Inmunodeficiencias Primarias (IDPs) son defectos congénitos del sistema inmune cuya principal característica es la susceptibilidad incrementada a infecciones. En algunas de estas enfermedades el componente defectuoso sólo se expresa en los leucocitos, siendo el defecto inherente a este linaje. Sin embargo, en otros casos el gen se expresa también en otras células dando lugar a otras manifestaciones clínicas asociadas (Ochs, 2007).

Las IDPs se caracterizan por infecciones severas y recurrentes. Paradójicamente, en algunos de estos síndromes también se dan enfermedades autoinmunes, niveles elevados de IgE y riesgo incrementado a tumores (Stiehm, 2004). Se desconoce si esto último es debido a una susceptibilidad incrementada a la infección por agentes que predisponen al cáncer o a defectos en la inmunovigilancia.

Con la excepción de la Deficiencia Selectiva de IgA, que afecta a 1 de cada 700 individuos, las IDPs son enfermedades poco frecuentes. Se estima que la incidencia de todas las demás IDPs juntas es de 1 por cada 10.000 nacimientos. Sin embargo, se desconoce la incidencia y la prevalencia real de estas enfermedades ya que no existen pruebas de despistaje para ninguna de estas patologías (Notarangelo, 2010).

2.2.- Herencia genética de las IDPs

Las IDPs son enfermedades de base genética, mayoritariamente mendelianas, es decir, que están causadas por mutaciones en un único gen, aunque existen algunas con herencia poligénica, como la Inmunodeficiencia Común Variable o la Deficiencia Selectiva de IgA. Dentro de las IDPs monogénicas distinguimos tres tipos de herencia: la autosómica recesiva (AR), la autosómica dominante (AD) y la herencia ligada al X, también denominada herencia ligada al sexo.

Las enfermedades AR ocurren cuando un individuo hereda dos copias defectuosas del mismo gen autosómico. Si las dos copias defectuosas son idénticas, hablaremos de un homocigoto y si son diferentes, de un heterocigoto compuesto. Los padres suelen ser heterocigotos sanos portadores de una copia nativa y una mutada. Suele darse en familias consanguíneas o poblaciones aisladas genéticamente donde los progenitores derivan de un ancestro común. Estas enfermedades son consecuencia de una falta de función del gen cuyo producto suele estar en exceso, razón por la cual, los portadores de la enfermedad no están afectados a pesar de tener sólo un alelo nativo (no existe haploinsuficiencia).

En la herencia AD sólo es necesaria una copia alterada del gen para que aparezca la enfermedad. Las mutaciones pueden ser espontáneas en ese individuo (mutación *de novo*) o heredadas de un progenitor, que puede estar enfermo o no. Esto suele ser debido a que este tipo de enfermedades presentan una penetrancia incompleta. Las mutaciones que provocan enfermedades con herencia AD actúan a través de diferentes mecanismos. Puede ser debido a que la cantidad de producto genético producido por una sola copia del gen sea insuficiente, hablando así de haploinsuficiencia. Otro mecanismo patogénico es la ganancia de función, por la cual la proteína mutada adquiere nuevas funciones que son nocivas. Otras mutaciones tienen un efecto dominante negativo, que consiste en impedir que la proteína nativa ejerza sus funciones normales debido a la interacción con la mutada.

Las enfermedades con un patrón de herencia ligado al sexo están causadas por mutaciones en los genes codificados en el cromosoma X y tienen consecuencias muy diferentes en hombres y mujeres. Esto es debido al diferente número de cromosomas X en hombres y mujeres, y a las propiedades únicas del cromosoma X en los mamíferos. Un hombre portador de una copia defectuosa de un gen ligado al X está enfermo, puesto que su única copia del gen está alterada. Esta hemicigosidad para el cromosoma X que se da en los varones explica el gran número de IDPs ligadas al X, y el mayor porcentaje de varones afectados por estas enfermedades. En las mujeres con defectos en genes codificados por el cromosoma X la situación es más compleja. Las mujeres tienen dos copias del cromosoma X, por lo que existe una necesidad de compensación de dosis respecto a los varones. Esta se consigue mediante la inactivación de uno de los cromosomas X. Esta inactivación, que es aleatoria, total e irreversible, tiene lugar en todas las células somáticas durante el periodo embrionario (Lyon, 1963). Es decir, que los tejidos somáticos de las mujeres son una mezcla de células, en unas hay un cromosoma X inactivado y en otras el otro, en una proporción aproximada del 50%. Cuando hablamos de mujeres portadoras de una mutación en un gen ligado al X, la fracción de células que contiene el cromosoma X activo con la secuencia nativa del gen es suficiente para mantener las funciones del tejido. Por ello, las mujeres heterocigotas para las enfermedades ligadas al X suelen ser portadoras silentes. Si, por el contrario, y al azar, predominan las que tienen activo el cromosoma X con la copia mutada, pueden ser sintomáticas. Sin embargo, existen situaciones en las que las mutaciones influyen en el desarrollo de algún tipo celular y entonces hay una inactivación sesgada del cromosoma X en ese tipo celular concreto.

2.3.- Clasificación de las IDPs

Las Inmunodeficiencias Primarias (IDPs) son un grupo de enfermedades heterogéneas genéticamente que afectan a uno o más componentes del sistema inmune: fagocitos, proteínas del complemento, células NK y linfocitos T y B. Se han identificado más de 120 genes cuyas alteraciones dan lugar a más de 200 entidades de IDPs. Esto es debido a que mutaciones localizadas en el mismo gen pueden causar diferentes entidades médicas, ya que son enfermedades con diferentes manifestaciones o fenotipos. Este fenómeno se denomina heterogeneidad alélica.

La complejidad de las características genéticas, inmunológicas y clínicas de las IDPs establecieron la necesidad de su clasificación. Con el último objetivo de facilitar el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades, un comité internacional de expertos se reúne cada 2 años desde 1970 para elaborar esta clasificación. La última actualización data del año 2009 y en ella las IDPs se agrupan en 8 categorías, aunque algunas inmunodeficiencias se encuadran en más de una de ellas (Notarangelo, 2009):

I. Inmunodeficiencias combinadas de células T y B. Se caracterizan por una alteración de las células T que puede ir acompañada de defectos en otros linajes linfocitarios (células B o NKs). Incluye todas las Inmunodeficiencias Severas Combinadas (SCID), el Síndrome de Omenn (OS), la Deficiencia en DNA ligasa IV, el Déficit de CD40 y CD40L, los Déficits de CD3, CD8 y Zap70 y las Deficiencias de MHC de clase I y II, entre otros.

II. Deficiencias predominantemente de anticuerpos. Se caracterizan por alteraciones en los niveles séricos de las inmunoglobulinas. Engloba las Agammaglobulinemias Congénitas, la

Inmunodeficiencia Común Variable (CVID), los Síndromes de hiper-IgM, la Deficiencia Selectiva de IgA y de Subclases y la Hipogammaglobulinemia Transitoria de la Infancia.

III. Otras inmunodeficiencias bien definidas. Pertenecen a este grupo el Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), la Ataxia Telangiectasia (AT), el Síndrome de DiGeorge (DGS), el Síndrome de hiper-IgE (HIES), la Disqueratosis Congénita (DKC) y la Candidiasis Mucocutánea Crónica (CMC), entre otras.

IV. Enfermedades de disregulación inmune. Se caracterizan por alteraciones en la homeostasis del sistema inmune. Agrupa el Síndrome de Chediak-Higashi (CHS), el Síndrome de Griscelli (GS), los Síndromes Hematofagocíticos Linfocitocíticos Familiares (FHL), los Síndromes Linfoproliferativos ligados al X (XLP), los Síndromes Linfoproliferativos Autoinmunes (ALPS), el APECED (Poliendocrinopatía Autoinmune con Candidiasis y Distrofia Ectodérmica) y el IPEX (Inmunedisregulación, Poliendocrinopatía y Enteropatía ligadas al X), entre otros.

V. Deficiencias congénitas en el número y/o función de los fagocitos. Encontramos las Neutropenias Congénitas, la Enfermedad Granulomatosa Crónica (CGD), los Déficits de Adhesión Leucocitaria (LAD), el Síndrome de Shwachman-Diamond (SBDS), las alteraciones en la secreción/señalización del IFN- γ y algunos Síndromes de hiper-IgE.

VI. Defectos en la inmunidad innata. Algunos ejemplos son la Displasia Ectodérmica Anhidrótica con Inmunodeficiencia (EDA-ID), los Déficits de IRAK-4 y MyD88 y la Encefalitis del Herpes Simplex (HSE).

VII. Enfermedades autoinflamatorias. Se caracterizan por brotes febriles. Agrupa a la Fiebre Mediterránea Familiar, al Síndrome de Hiper-IgD y otros relacionados.

VIII. Deficiencias de complemento. Son deficiencias de los distintos miembros de la vía del complemento: C1-C9, C1 inhibidor esterasa, properdina, factor H, MBP o MASP.

2.4.- Manifestaciones clínicas de las IDPs

Las observaciones clínicas son el arma más importante para la sospecha y diagnóstico de pacientes inmunodeficientes. La severidad, la edad de presentación y el patrón de infecciones (microorganismo responsable y localización) se correlacionan con la naturaleza del defecto inmune y pueden orientar el diagnóstico (Slatter, 2008).

Así, durante el periodo neonatal se pueden determinar los Defectos de Adhesión Leucocitaria (LAD), debido al retraso en la caída del cordón umbilical; el Síndrome de Omenn (OS), por la eritrodermia; o el Síndrome de DiGeorge (DGS), por los defectos cardíacos, la hipocalcemia y el dimorfismo facial asociados. En cambio, los defectos en los linfocitos T, como las Inmunodeficiencias Severas Combinadas (SCID) o el defecto en CD40L (Síndrome de Hiper-IgM ligado al X o XHIM), suelen desarrollarse un poco más tarde, durante los 6 primeros meses de vida. De los 6 meses a los 5 años se presentan los defectos de anticuerpos, debido a la desaparición de las IgG maternas, y déficits de complemento y neutrófilos, como la Enfermedad Granulomatosa Crónica (CGD). También se diagnostican en esta época las IDPs asociadas a alteraciones neurológicas, como la Ataxia Telangiectasia (AT). En niños mayores de 5 años encontramos la Inmunodeficiencia Común Variable (CVID) y los Déficits de Subclases de Anticuerpos.

La presentación de la infección en determinados órganos y sistemas puede orientar hacia una IDP específica. De este modo, infecciones respiratorias tipo bronquitis persistentes y recurrentes son sugestivas de Inmunodeficiencias Combinadas, como el SCID; sin embargo

infecciones sinobacterianas lo son de Inmunodeficiencias humorales, como la Agammaglobulinemia ligada al X (XLA). Si las infecciones pulmonares por *Staphylococcus* van acompañadas de eczema, tendremos un Síndrome de Hiper-IgE (HIES), pero si las infecciones respiratorias recurrentes se combinan con neumonías fúngicas pensaremos en una CGD. Las presentaciones gastrointestinales tipo diarreas incoercibles se dan en los defectos en células T y si van acompañadas de eczema e infecciones respiratorias recurrentes nos plantearíamos el diagnóstico de IPEX (Inmunedisregulación, Poliendocrinopatía y Enteropatía ligadas al X). Si hay abscesos hepáticos por *Staphylococcus* y clínica parecida a la Enfermedad de Chron podría tratarse de una CGD. En el Síndrome de Schwann-Diamond (SBDS) se da insuficiencia pancreática exocrina y neutropenia. Una enteritis crónica por *Cryptosporidium* es sugestiva de un defecto de células T, y si coexiste con colangitis esclerosante se trataría de un XHIM. Las alteraciones dermatológicas son frecuentes en las IDPs. La triada de infecciones pulmonares, eczema y petequias es sinónimo de Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS). El rash eczematoso y los abscesos torácicos y abdominales aparecen en la CGD; la ulceración perianal en recién nacidos en el LAD y la pioderma en los defectos de anticuerpos. La candidiasis aparece en las SCID, la Candidiasis Mucocutánea Crónica (CMC) y el HIES. El albinismo es característico del Síndrome de Griscelli (GS) y del Síndrome de Chediak-Higashi (CHS). También se encuentran úlceras en la Deficiencia en HLA de clase I. La telangiectasia y la fotosensibilidad con infecciones recurrentes son sugestivas de defectos en la reparación del DNA como la AT. Los retrasos en el desarrollo neurológico también se asocian a algunas IDPs: displasia y disartria en el SCID por Deficiencia en la Fosforilasa de Nucleótidos Purinas (PNP), la propia telangiectasia en AT o retraso mental y en el habla en el Síndrome de DiGeorge o en el CHS. En cuanto a las alteraciones hematológicas, muchos de los pacientes con SCID son linfopénicos. En el Síndrome Linfoproliferativo ligado al X (XLP), el CHS, el GS y los Síndromes Hematofagocíticos Linfocitocíticos Familiares (FHL) se da el fenómeno de la hematofagocitosis. La neutropenia acompañada de fiebre es característica de la Neutropenia Cíclica, pero también del WAS, del XHIM y del XLA. Las citopenias autoinmunes aparecen en el DGS, el IPEX, el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (ALPS) y en el WAS, aunque en esta última sólo en forma de trombocitopenia. La mielodisplasia es otra manifestación hematológica del XLP. Las deficiencias esqueléticas y del tejido conectivo aparecen en las SCID por Deficiencia en Adenosín Deaminasa (ADA) y en el SBDS. En el HIES los huesos son hipodensos e hiperextensibles, dándose algunos casos de fracturas patológicas y alteraciones en la dentición. Los pacientes con deficiencia en NEMO también tienen alteraciones en los dientes y osteopetrosis.

El cáncer es común en las IDPs y puede desarrollarse en cualquiera de ellas. Los linfomas son frecuentes en los defectos de reparación de DNA como la AT y los asociados a EBV están particularmente descritos en pacientes con XLP y WAS. Los linfomas no Hodgkin aparecen en ALPS y el cáncer linfocítico y gástrico en CVID. En cambio, los hepatomas asociados a infección por *Cryptosporidium* son una complicación típica del XHIM.

A pesar de que las IDPs han sido tradicionalmente descritas como una predisposición a infecciones por un amplio espectro de patógenos, cada vez se están identificando más enfermedades en las que ésta susceptibilidad es selectiva a un patógeno o grupo de patógenos concretos. *Meningococcus* es característico de déficits del complemento y *Mycoplasma* spp de deficiencias de anticuerpos; *Pneumococcus* y *Haemophilus influenzae* se dan tanto en deficiencias de anticuerpos como del complemento; *Staphylococcus*, *Aspergillus* spp y bacterias

gram negativas de alteraciones en neutrófilos; *Cryptosporidium*, Herpesvirus y virus en general por defectos en linfocitos T, al igual que *Giardia lamblia* y Enterovirus, que también se asocian a defectos de anticuerpos; *Candida albicans* está implicada en alteraciones en los linfocitos T, neutrófilos y monocitos; y *Micobacteria* y *Salmonella* en alteraciones en la inmunidad celular mediada específicamente por citocinas tipo 1, como el IFN- γ .

La evaluación cuidadosa de la historia familiar puede ser de mucha ayuda en el diagnóstico de las IDPs. La consanguinidad es sugestiva de una IDPs con herencia autosómica recesiva, mientras que una historia de infecciones en varones o de muertes en la infancia en la rama materna lo es de una IDP ligada al X. Por ejemplo, si existe una historia de linfomas en parientes varones podríamos sospechar de XLP o WAS pero las muertes en la infancia son características en las SCID. No obstante, muchos de éstos pacientes no tienen historia familiar positiva porque se trata de mutaciones *de novo* o de la primera manifestación de una enfermedad autosómica recesiva o dominante con penetrancia incompleta.

2.5.- Diagnóstico y Tratamiento de las IDPs

Como los pacientes con IDPs tienen un aumento en la susceptibilidad a infecciones, el diagnóstico precoz y la terapia efectiva son las mejores opciones para disminuir la morbilidad asociada a estas enfermedades. Es el laboratorio de inmunología el que debe proporcionar la información necesaria para determinar el defecto inmunológico responsable (Oliveira, 2010).

Sospecha de IDPs con inmunodeficiencias de células T o combinadas de células T y B: estos pacientes presentan infecciones recurrentes desde edades muy tempranas por patógenos oportunistas como *Candida albicans* (aftas), *Pneumocystis jiroveci* o citomegalovirus. También padecen diarreas crónicas, infecciones bacterianas recurrentes de localización múltiple e infecciones persistentes a pesar del tratamiento convencional. Las erupciones de la piel son comunes, especialmente en el OS y el WAS. Se trata de emergencias pediátricas, ya que un diagnóstico precoz puede mejorar dramáticamente la progresión clínica.

La herramienta más importante para evaluar estos pacientes es un análisis cuidadoso del conteo diferencial de los leucocitos, que debe ser comparado con controles de la misma edad. La linfopenia severa ($<3.000 \cdot 10^6/L$) nos indicará la necesidad de un análisis inmunológico más exhaustivo, descartando en primer lugar la infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV).

El siguiente paso es analizar la inmunidad celular: inmunofenotipo de células T mediante citometría de flujo y tests funcionales (proliferación y producción de citocinas). Los ensayos de proliferación a mitógenos, antígenos y/o aloantígenos son una parte importante de la evaluación de la función celular. Típicamente los defectos en moléculas de señalización de citocinas dan un fenotipo T-B+NK-, mientras que las mutaciones en las proteínas implicadas en la generación del TCR y BCR es T-B-NK+, y en los defectos metabólicos severos hay una afectación de todos los linfocitos (T-B-NK-). En este último caso podremos analizar la función de estas enzimas.

Un número normal de linfocitos T circulantes no es suficiente para descartar las deficiencias en células T, ya que puede ser debido a la presencia de células de origen materno: estas células T maternas son mayoritariamente de memoria (CD45RO+), comparadas con las mayoritariamente *naive* CD45RA+ que se encuentran en un niño sano. Estas células pueden ser causantes de fenómenos de rechazo (*graft versus host disease*), al igual que las procedentes

de transfusiones no irradiadas, lo que enfatiza la necesidad de su irradiación. Sin embargo, el análisis de los linfocitos no permite identificar a los pacientes con OS, ya que existe un número normal o incrementado de linfocitos T propios debido a una expansión oligoclonal en periferia. La cuantificación de los TRECs (círculos de escisión del TCR) da información adicional sobre el estado del sistema inmune: los TRECs se forman durante la maduración tímica y permanecen como episomas y se van diluyendo a medida que van proliferando, de manera que las células T *naive* recién emigradas del timo tienen un elevado porcentaje de TRECs comparado con las células que han respondido al antígeno. La determinación de TRECs en neonatos se está planteando como un posible diagnóstico neonatal para identificar a estos pacientes nada más nacer (Chan, 2005).

En sospecha de DGS se debe analizar la microdelección 22q11, ya que es responsable de la mayoría de los casos. Si existe sospecha de WAS, hay que determinar la expresión de la proteína responsable (WASP) mediante citometría de flujo intracelular.

Sospecha de IDPs con deficiencia de anticuerpos: la mayoría de estos pacientes presentan infecciones bacterianas recurrentes del tracto sinopulmonar, incluyendo otitis media, sinusitis y neumonía (Conley, 2009). Los patógenos responsables son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus sp* y *Pseudomonas sp*. Las diarreas afectan a un 25% de estos pacientes y suelen estar asociadas a infecciones por *Giardia lamblia*, pero también por rotavirus, enterovirus, *Campylobacter sp*, *Salmonella sp* y *Shigella sp*. Además, suelen tener manifestaciones autoinmunes, como anemia hemolítica autoinmune o trombocitopenia autoinmune, y granulomas. Si además existen infecciones oportunistas, se debe sospechar de un defecto celular que también afecte a la producción de anticuerpos, como la deficiencia en CD40/CD40L o en NEMO. Las deficiencias de complemento y los defectos de fagocitos pueden tener una presentación similar, por lo que se puede confundir su clínica.

El primer análisis clínico de estos pacientes debe incluir una determinación de los niveles de IgG, IgA, IgM e IgE, que deben ser comparados con los rangos de normalidad en función de la edad. Además, se deben determinar los niveles de subclases de IgG, de anticuerpos específicos frente a los grupos sanguíneos (isohemaglutininas) o en respuesta a vacunaciones. Los test basados en la citometría de flujo permiten determinar la presencia o ausencia de células B, marcador de las Agammaglobulinemias Congénitas, y la caracterización de las células B *naive* y memoria, de especial interés en la CVID (Wehr, 2008). Si existe sospecha de XLA, se puede determinar la expresión de la proteína responsable (BTK) mediante citometría de flujo intracelular.

Sospecha de IDPs con enfermedades de disregulación inmune: los pacientes con ALPS presentan linfadenopatías y hepatoesplenomegalia persistente no malignas acompañadas de trombocitopenia, anemia o ambas. El IPEX se presenta ya en la época neonatal con diarrea severa, eczema y diabetes tipo 1. El APECED se caracteriza por autoinmunidad dirigida contra órganos endocrinos (hipotiroidismo e insuficiencia adrenal) y candidiasis mucocutánea crónica; estos pacientes pueden presentar diabetes tipo 1, fallo gonadal, hepatitis autoinmune y manifestaciones cutáneas. El diagnóstico de ALPS requiere síntomas clínicos compatibles y la presencia de células T doble negativas (TCR $\alpha\beta$ CD4⁻ CD8⁻) en un porcentaje superior al 1%. Otras características son elevados niveles de IL-10 y vitamina B12. El diagnóstico de IPEX se basa en la demostración de una ausencia de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ en periferia mediante citometría de flujo.

Los defectos tanto en la función de las NK como en los linfocitos T citotóxicos causan una respuesta inflamatoria incontrolada a una infección que acaba produciendo infiltración y daño en múltiples órganos, que se conoce como Linfohistiocitosis Hematofagocítica (HLH). Una de estas enfermedades es el XLP, donde la respuesta incontrolada al EBV puede ser letal. Las manifestaciones clínicas de los FHL no son específicas: fiebre, hepatoesplenomegalia, síntomas neurológicos, linfadenopatías y erupciones. Las patologías con defecto en el tráfico intracelular de vesículas, como el CHS o el GS tipo 2, suelen manifestarse como un HLH secundario. En estos pacientes se debe testar la función de las NK, incluyendo su fenotipado por citometría de flujo y la citotoxicidad *in vitro*. En el caso del XLP podemos detectar las proteínas responsables (SAP y XIAP) mediante citometría de flujo intracelular. La baja expresión de perforina intracelular por citometría de flujo puede usarse en el diagnóstico de FHL-2 y un descenso en la expresión en superficie de CD107a en células NK puede predecir la presencia de alteraciones en MUNC13-4 (FHL-3), sintaxina 11 (FHL-4) o MUNC18-2 (FHL-5).

Sospecha de IDPs con disfunción de los fagocitos: estos pacientes presentan infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes de la piel, nódulos linfáticos, pulmones, hígado, huesos y, en algunos casos, tejidos periodónticos (Rosenzweig, 2004). El patrón de infecciones puede ayudar a discriminar el problema responsable. Así, los pacientes con neutropenia y aquellos con LAD tienden a tener celulitis recurrente, enfermedad periodontal, otitis media, neumonías e infecciones gastrointestinales con poca inflamación y ausencia de pus. El retraso en la caída del cordón umbilical es sugestivo de LAD, aunque muchos de los niños en los que persiste el cordón hasta un mes están sanos. Los pacientes con neutropenia cíclica sufren cortos periodos de fiebre, úlceras bucales e infecciones recurrentes a intervalos de 18-21 días coincidiendo con el descenso en los neutrófilos. En contraste, los pacientes con CGD tiene problemas graves debido a los abscesos en hígado y huesos y por las neumonías causadas por un grupo reducido de patógenos, que incluye *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *Nocardia sp* y *Aspergillus sp*. Sin embargo, la frecuencia de infecciones por *Escherichia coli* y *Streptococcus sp* es mucho menor que en los pacientes con neutropenia o LAD. Los pacientes con HIES tienen abscesos recurrentes en la piel, neumonías causadas por *Staphylococcus aureus* y otras bacterias piógenas y candidiasis mucocutánea crónica. Además, tienen otros rasgos no inmunológicos destacables como las alteraciones faciales, escoliosis, riesgo incrementado a las fracturas óseas o fallo en la dentición primaria.

Los análisis del laboratorio deben incluir un contaje diferencial de los leucocitos, así como una revisión morfológica de los mismos. El estudio de la médula ósea permitirá descartar otras causas de neutropenia, como neoplasias. El diagnóstico de LAD incluye la determinación por citometría de flujo de las moléculas de adhesión CD11 y CD18, que están ausentes en los pacientes con LAD-1 y CD15, deficiente en LAD-2. El test diagnóstico de la CGD es el análisis de la capacidad oxidativa de los neutrófilos, mediante la oxidación del nitroazul de tetrazolium (NBT) o de la Dihidrorodamina 123 (DHR). En el HIES existen niveles muy elevados de IgE (>2.000 UI/mL) y ausencia de células T_H17 (Milner, 2008).

Sospecha de IDPs con defectos en la inmunidad innata: los pacientes con infecciones invasivas severas por cepas de baja virulencia de *Mycobacteria sp* y *Salmonella sp* tienen defectos en los componentes de la vía IL-12/23-IFN γ . Las infecciones recurrentes por *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus sp* están asociadas a defectos en la vía de las moléculas TLR (receptor *Toll-like*): IRAK-4, MyD88 y NEMO. Los pacientes con deficiencia en IRAK-4 y MyD88 tienen respuestas inflamatorias muy disminuidas sin fiebre ni reactantes de

la fase aguda. La deficiencia en NEMO tiene un amplio espectro clínico con mucha variación en las alteraciones inmunológicas. Recientemente se ha descrito que la susceptibilidad a encefalitis por *Herpes simplex* está relacionada con mutaciones en TLR3 y UNC-93B, proteína accesoria de éste.

Podemos determinar varios de los componentes de estas vías por citometría de flujo. Además, debemos analizar la respuesta *ex vivo* de las células de los pacientes en respuesta a diferentes estímulos: IFN- γ *versus* fosforilación STAT1 y producción de IL-12; ligandos de TLR *versus* regulación a la baja de CD62L.

Sospecha de IDPs con defectos del complemento: los defectos en los primeros componentes de la vía clásica del complemento (C1, C2 y C4) causan manifestaciones similares a las del Lupus Eritomatoso Sistémico, pero con infecciones sinopulmonares recurrentes. Los déficits en C3 causan un fenotipo indistinguible de las deficiencias de anticuerpos. Las alteraciones en los componentes tardíos que causan defectos en la generación del complejo de ataque a la membrana (C5-C9) dan lugar a una susceptibilidad incrementada a las infecciones por *Neisseria sp*: meningitis, sepsis o artritis gonocócica. Los defectos en la vía alternativa (properdina, factor B y factor D) causan infecciones severas por *Neisseria sp* y otras bacterias. La deficiencia en factor H se asocia al Síndrome Urémico Hemolítico Atípico o glomerulonefritis y asociado a una deficiencia en C3 secundaria, a infecciones piogénicas recurrentes. Finalmente el defecto en C1 inhibidor esterasa causa Angioedema Hereditario, mientras que los defectos en DAF y CD59 se dan en pacientes con Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.

El mejor test para determinar los defectos en la vía clásica es el ensayo de la actividad hemolítica del complemento (CH50), mientras que para la vía alternativa lo es el AH50. Defectos en ambos test son indicativos de deficiencias en los elementos comunes de las dos vías (C3-C9).

El diagnóstico definitivo de todas las IDPs se establece con la identificación del defecto genético responsable siempre y cuando sea posible, ya que todavía existen algunas en que se desconoce el gen implicado. Una vez identificada la mutación, el análisis genético también nos permite estudiar a la familia para identificar a los individuos portadores de la enfermedad y realizar diagnósticos prenatales a partir de DNA obtenido por muestreo de vellosidades coriónicas o amniocentesis.

El tratamiento de las IDPs depende del tipo de enfermedad, pero todos se basan en evitar las infecciones y paliar los síntomas relacionados. En los déficits de anticuerpos se administran inmunoglobulinas, bien sean intravenosas (IVIG) o subcutáneas (SGID) como tratamiento sustitutivo, siendo ambas efectivas en la reducción de la incidencia de infecciones. Los defectos de neutrófilos requieren profilaxis sostenida con antibióticos y antifúngicos. Se ha visto que la administración de IFN- γ puede reducir la incidencia de las infecciones severas en algunos de estos pacientes. En las IDPs con afectación de los linfocitos T el uso profiláctico de antifúngicos, terapia sustitutiva con inmunoglobulinas y el tratamiento agresivo contra cualquier infección son las armas más efectivas para evitar las temidas infecciones por microorganismos oportunistas.

Pero el único tratamiento curativo disponible de las IDPs es el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), ya sean de médula ósea o de sangre de cordón umbilical. Su éxito dependerá del grado de identidad HLA del donante, del tratamiento acondicionador previo y de

la precocidad del propio trasplante. La mejor opción siempre es un hermano HLA idéntico. El tratamiento acondicionador depende de la enfermedad de base y está regulado por criterios especializados. En cuanto al tiempo, la precocidad es el mayor aliado y por ello se han llegado a realizar trasplantes intrauterinos (Touraine, 1989).

La terapia génica es también una terapia curativa, pero los inconvenientes surgidos en pacientes con X-SCID sometidos a este tratamiento han frenado el desarrollo de esta potente herramienta terapéutica. En la actualidad existen ensayos en marcha en SCIDs, pero también en WAS y CGD (Hacein-Bey-Abina, 2010).

2.6.- IDPs ligadas al X

En la última clasificación de las IDPs (Notarangelo, 2009) se describen 11 entidades con herencia ligada al X:

- X-SCID (Inmunodeficiencia Severa Combinada ligada al X), causada por mutaciones en la cadena gamma común del receptor de la IL-2 (gen *IL-2RG*).
- XHIM (Hiper IgM ligado al X), por alteraciones en CD40L (gen *TNFSF5*).
- XLA (Agammaglobulinemia ligada al X), por deficiencias en Btk (gen *BTK*).
- WAS (Síndrome de Wiskott-Aldrich), por mutaciones en WASP (gen *WAS*).
- X-DKC (Disqueratosis Congénita ligada al X), por defectos en la disquerina (gen *DKC1*).
- XLP (Síndromes linfoproliferativos ligados al X), causados por mutaciones en SAP, gen *SAP/SH2D1A* (XLP-1) y XIAP, gen *XIAP* (XLP-2).
- IPEX (Inmunedisregulación, Poliendocrinopatía y Enteropatía ligadas al X), por alteraciones en FOXP3 (gen *FOXP3*).
- XLN (Neutropenia ligada al X), también por mutaciones en WASP (gen *WAS*).
- X-CGD (Enfermedad Granulomatosa Crónica ligada al X), por alteraciones en gp91^{phox} (gen *CYBB*).
- EDA-ID (Displasia Ectodérmica Anhidrótica con Inmunodeficiencia), por defectos en NEMO-IKK γ (gen *NEMO*).
- Deficiencia en Properdina, por déficit en el factor del complemento properdina (gen *CFP*).

Todos estos genes se distribuyen a lo largo de ambos brazos del cromosoma X (Figura I.2).

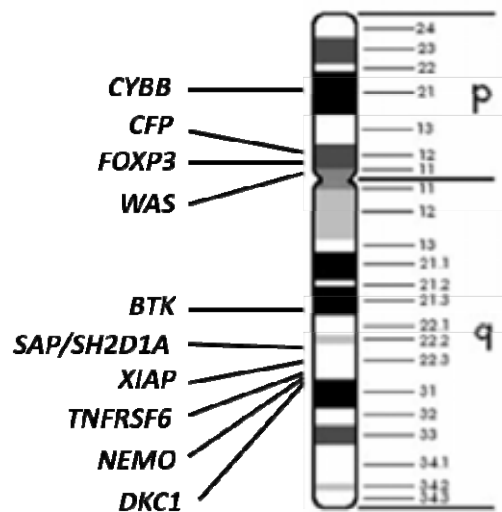


Figura I.2. Ideograma del cromosoma X dónde se indican los locus de los genes implicados en IDPs.

Tal y cómo se ha mencionado anteriormente, las mutaciones en los genes codificados en el cromosoma X tienen consecuencias muy diferentes en hombres y mujeres: un varón portador de una copia defectuosa de un gen ligado al X está enfermo, mientras que una mujer con defectos en genes codificados por el cromosoma X, al tener una de las 2 copias inactivadas es un mosaico en el cual la fracción de células que contiene el cromosoma X activo con la secuencia nativa del gen es suficiente para mantener las funciones del tejido. Por ello, las mujeres heterocigotas para las enfermedades ligadas al X suelen ser portadoras silentes. Sin embargo, si por azar predominan las que tienen activo el cromosoma X con la copia mutada, pueden ser sintomáticas.

En el caso de algunas IDPs ligadas al X, la situación es aún más compleja. Las mujeres portadoras de algunas enfermedades ligadas al X, como la Agammaglobulinemia ligada al X (XLA), no presentan una inactivación aleatoria del cromosoma X en las células B pero sí en el resto de tipos celulares. Una mujer portadora de XLA no posee linfocitos B cuyo cromosoma X activo tenga la copia mutada del gen *BTK* porque la fracción de precursores que contenía el cromosoma X activo con la copia mutada no pudo desarrollarse y diferenciarse normalmente. Este fenómeno se denomina inactivación sesgada del cromosoma X. Si el producto del gen afectado no es imprescindible para el desarrollo de una población celular, la inactivación será aleatoria. En el caso de las mujeres portadoras de XLA, los monocitos presentan un patrón de inactivación aleatorio del cromosoma X a pesar de expresar la proteína BTK.

Lo mismo sucede en los linfocitos T CD4⁺ de las portadoras del Síndrome de hiper-IgM ligado al X (XHIM) o de los linfocitos T de las portadoras de Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), pero no de Trombocitopenia ligada al X (XLT), a pesar de estar producidas ambas por mutaciones en el gen *WAS*. El porqué hay que buscarlo en el grado de afectación de la proteína WASP: si la proteína está gravemente alterada o ausente, los pacientes presentan fenotipo WAS y en las mujeres portadoras los linfocitos T con la copia mutada no llegan a periferia porque tienen una gran desventaja frente a los que expresan la copia nativa; si existe una función residual de la proteína WASP, los pacientes presentan un fenotipo XLT y en las mujeres portadoras se encuentran en periferia linfocitos T que expresan el cromosoma con la copia mutada porque no tienen desventaja en su desarrollo.

3.- Inmunodeficiencias Severas Combinadas

Las Inmunodeficiencias Severas Combinadas (SCID) son un grupo heterogéneo de inmunodeficiencias en las que está afectada tanto la inmunidad celular como la humoral. Tienen una incidencia estimada de 1 de cada 100.000 nacimientos y se caracterizan por una severa depleción de los linfocitos T, ya que están provocadas por defectos en su desarrollo y/o función y, según la entidad, pueden estar afectados también los linfocitos B y/o las células NK. Los pacientes con SCID sufren infecciones de aparición temprana que suelen estar causadas por organismos oportunistas como *Pneumocystis jiroveci*, *Aspergillus sp* o *Herpesviradae*. La migración trasplacentar de linfocitos T maternos aloreactivos es un fenómeno común que provoca la enfermedad del injerto contra el huésped (*graft versus host disease*, GVHD).

La forma más frecuente de SCID es la ligada al sexo (X-SCID; MIM: 300400) con 1 afectado por cada 200.000 nacimientos, la mitad de todas las SCID. Se caracteriza por una ausencia de linfocitos T y NK e hipogammaglobulinemia, a pesar de la presencia en números normales e incluso elevados de linfocitos B (T-B+NK-). Está causada por alteraciones en la cadena gamma común del receptor de la IL-2 (IL-2R γ) que está codificada en Xq12-13.1 (Noguchi, 1993b; Puck, 1993). Este receptor está constitutivamente expresado en los linfocitos T, B y las células NK, así como en las células mieloides y eritroblastos. La IL-2R γ forma parte del receptor de la IL-2, pero también de los receptores de la IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, participando en su señalización intracelular.

Otras formas de SCID pueden presentar un fenotipo similar pero una herencia autosómica recesiva, como la deficiencia en JAK3 (MIM: 600802; T-B+NK-) (Notarangelo, 2000). JAK3 es un miembro de la familia de las proteínas kinasa asociadas a *Janus* que juega un papel crucial en la señalización de las citocinas hematopoyéticas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 ya que es la única enzima asociada a la molécula IL-2R γ . En el Déficit en la cadena alfa de la IL-7 (IL-7R α) (MIM: 608971) las manifestaciones clínicas son similares pero tienen un número normal de células NK (T-B+NK+), ya que este receptor no está implicado en el desarrollo de estas células.

La Disgenesia Reticular (MIM: 267500) es la forma de SCID más severa ya que están afectados tanto el linaje mielóide como el linfóide. Está causada por mutaciones en la adenilato kinasa AK2 (Lagresle-Peyrou, 2009; Pannicke, 2009) que dan lugar a niveles indetectables de granulocitos y células T y normales de células B y monocitos con hipogammaglobulinemia y sordera bilateral neurosensorial.

Existen SCID T-B-NK+ que tienen una radiosensibilidad celular incrementada y están causadas por mutaciones en Artemis (MIM: 602450), una proteína implicada en la reparación del DNA. Además, está la Deficiencia en Adenosín Deaminasa (ADA; MIM: 102700) y la Deficiencia en la Fosforilasa de Nucleótidos Purinas (PNP; MIM: 613179) que causan SCID en la que están ausentes tanto los linfocitos T, como los B y las NK. Las SCID causadas por alteraciones en los genes RAG (MIM: 601457) tienen las manifestaciones clínicas típicas de las SCID con ausencia de linfocitos T y B, pero no de NK (T-B-NK+). Las recombinasas RAG-1 y RAG-2 están implicadas en el reordenamiento de los segmentos V(D)J de los genes de los receptores de la célula T (TCR) y de la célula B (BCR o Ig) y por ello sólo están afectadas estas líneas linfoides.

El Síndrome de Omenn (OS; MIM: 603554) es una SCID autosómica recesiva caracterizada por la temprana aparición de erupciones cutáneas generalizadas, eritrodermia exudativa, nódulos

linfáticos aumentados, hepatoesplenomegalia, infecciones respiratorias graves y/o diarrea, hiponatremia con edema, eosinofilia y niveles elevados de IgE. El Síndrome de Omenn fue descrito en 1965 pero no fue hasta 1998 cuando se descubrió que estaba causado por mutaciones en los genes *RAG* (Villa, 1998). En estos pacientes las recombinasas *RAG* tienen una expresión y función parcial que permite algún reordenamiento de TCR y con ello la generación de linfocitos T oligoclonales con expansión periférica y de carácter autoreactivo (Rieux-Laucat, 1998). En total, un 20% de los pacientes con SCID tienen mutaciones en los genes *RAG*. La misma mutación en los genes *RAG* puede dar lugar a un SCID T-B-NK+ o a un OS, incluso dentro de la misma familia (de Saint Basile, 1991), por lo que otros elementos como los factores epigenéticos deben de ser necesarios para generar el fenotipo Omenn. Recientemente se han descrito mutaciones hipomórficas en otros genes responsables de SCID, como *ADA*, *Artemis*, *IL7RA*, que dan lugar a fenotipo Omenn (Giliani, 2006). La explicación tendría los mismos argumentos que en el caso de las mutaciones en *RAG*.

3.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de las SCID

Los pacientes con X-SCID desarrollan durante el primer año de vida candidiasis oral, diarreas crónicas y/o neumonías intersticiales. Los patógenos responsables suelen ser *Pneumocystis jiroveci*, *Candida albicans*, *Pseudomonas sp* y otras bacterias gram negativas y gram positivas, así como el virus respiratorio sincitial, herpesvirus y hongos. Estos niños tienen un timo extremadamente pequeño (atrofia tímica) y también están menguados los órganos linfoides secundarios como las amígdalas. A nivel inmunológico, existe una grave linfopenia, con bajos niveles de linfocitos T y células NK y normales o elevados de linfocitos B. Estas células B son inmaduras y poseen características fenotípicas de las células B del cordón umbilical. Los niveles séricos de inmunoglobulinas reflejan la presencia de IgG maternas y una ausencia de IgM, IgA e IgE. A menudo estos pacientes tienen linfocitos de origen materno que alteran el conteo linfocitario. Si estos linfocitos T maternos están activados pueden provocar exantemas, exfoliaciones cutáneas y eosinofilia. De todas formas, el número de linfocitos T, B y NK no es uniforme en todos los pacientes, estando sujeto a modificaciones por la naturaleza de la alteración genética en *IL-2RG* y otros factores genéticos y medioambientales. Se han descrito pacientes X-SCID con niveles bajos de linfocitos B o normales de células NKs (Pepper, 1995) y con presencia de timo (Poliani, 2009).

Los pacientes con deficiencia en *JAK3* son indistinguibles de los pacientes con X-SCID en cuanto a manifestaciones clínicas e inmunológicas se refiere. La diferencia radica en que estos pacientes además de niños pueden ser niñas debido a la herencia autosómica recesiva.

Los pacientes con Disgenesia Reticular presentan una profunda neutropenia asociada a una linfopenia de células T, mientras que el linaje B no está afectado. El número de monocitos es normal, así como el de plaquetas y eritrocitos. Además, los pacientes sufren sordera bilateral neurosensorial. Se observa una depleción del tejido linfóide, donde hay una escasez de células en los órganos hematopoyéticos primarios y secundarios, que deja ver el tejido reticular prominente, del cual deriva el nombre de la enfermedad (de, 1959). La falta de neutrófilos en estos pacientes es la responsable de la incidencia de infecciones severas mucho más tempranas, si cabe, que en otras formas de SCID, ya que además de la inmunidad adaptativa, tanto la celular como la humoral, está comprometida la inmunidad innata.

La presentación clínica de los pacientes con SCID por deficiencia en RAG son infecciones respiratorias graves, diarreas crónicas, candidiasis oral y dermatitis eczematoide. Los parásitos intracelulares como *Listeria sp* y *Legionella sp*, y el virus de Epstein-Barr y el citomegalovirus pueden causar complicaciones letales. Estos pacientes presentan linfopenia con ausencia de linfocitos T y B propios, de manera que casi todas las células circulantes son NK. Tras la desaparición de las Igs maternas, se da una profunda hipogammaglobulinemia. La persistencia de los linfocitos T maternos es común y puede llevar a manifestaciones clínicas de GVHD. Hay una ausencia de órganos linfoides secundarios.

Los pacientes con OS desarrollan poco después del nacimiento eritrodermia generalizada con descamación. Los infiltrados masivos de las capas superiores de la dermis le dan un aspecto característico (paquidermia) que se acompaña de alopecia. Posteriormente, tienen las típicas infecciones de las SCID, acompañadas de linfadenopatías, hepatoesplenomegalia, anemia e hipoproteinemia. La linfopenia no es habitual. A pesar de tener nódulos linfáticos grandes, su arquitectura está alterada. Los linfocitos T tienen niveles normales o elevados y el cociente CD4/CD8 está alterado. Estos linfocitos T circulantes expresan marcadores de activación y/o memoria (HLA-DR, CD45RO, CD25, CD95, CD30) pero las respuestas proliferativas a mitógenos y antígenos están muy disminuidas, ya que son células T funcionalmente defectuosas. Por ello, a pesar de tener células T son extremadamente inmunodeficientes y son susceptibles a infecciones bacterianas, virales y fúngicas. Las manifestaciones clínicas pueden confundirse con las de un SCID con linfocitos T maternos autoreactivos, por ello debe determinarse que los linfocitos T sean propios del paciente. Un dato diferencial importante es que no se detectan linfocitos B ni en sangre periférica ni en órganos linfoides. También presentan eosinofilia y niveles elevados de IgE pero ausentes de los otros isotipos. Existe un sesgo hacia Th2, que lleva a la producción incrementada de IL-4 y la IL-5, que se supone son responsables de la elevada síntesis de IgE y de la eosinofilia, respectivamente. Algunos pacientes presentan un fenotipo intermedio entre SCID y OS.

3.2.- Vías de señalización a través de IL-2R γ

El receptor de la IL-2 está formado por la cadena γ , que es común a otros receptores, la cadena β , que se expresa constitutivamente en linfocitos T, y la cadena α , que se expresa en linfocitos T tras su activación, incrementando la afinidad del receptor por la IL-2 unas 100 veces. Además, IL-2-R γ forma parte de los receptores de la IL-4 (Kondo, 1993), IL-7 (Noguchi, 1993a), IL-9 (Kimura, 1995), IL-15 (Giri, 1994) e IL-21 (Habib, 2002). El papel que ejerce en cada uno de ellos varía. Así, en el IL-7R es imprescindible para que se generen señales para el desarrollo de los progenitores linfocíticos a partir de las células hematopoyéticas indiferenciadas, por ejemplo, promoviendo la expresión de las recombinasas RAG-1 y RAG-2 (Muegge, 1993). En el IL-15R es necesario para generar señales requeridas para el desarrollo de las células NK. En la señalización a través de IL-21R es importante tanto para la inmunidad innata como la adaptativa, bien incrementando las funciones efectoras de las células NK, aumentando la producción de IFN- γ o potenciando la respuesta de los linfocitos T y B frente a antígenos específicos. En el caso del IL-4R y del IL-9R se desconoce cuál es su papel fisiológico. Tras la activación a través de cualquiera de estas citocinas en la superficie celular, IL-2-R γ transmite una señal de activación intracelular gracias a su asociación con JAK3, un miembro de la familia *Janus* de tirosinas kinasa (Johnston, 1994). Residuos específicos de JAK3 son

fosforilados activando así a proteínas de la familia STAT, STAT3 y STAT5, que dimerizarán y migrarán al núcleo donde ejercerán su función como factores de transcripción (Figura I.3).

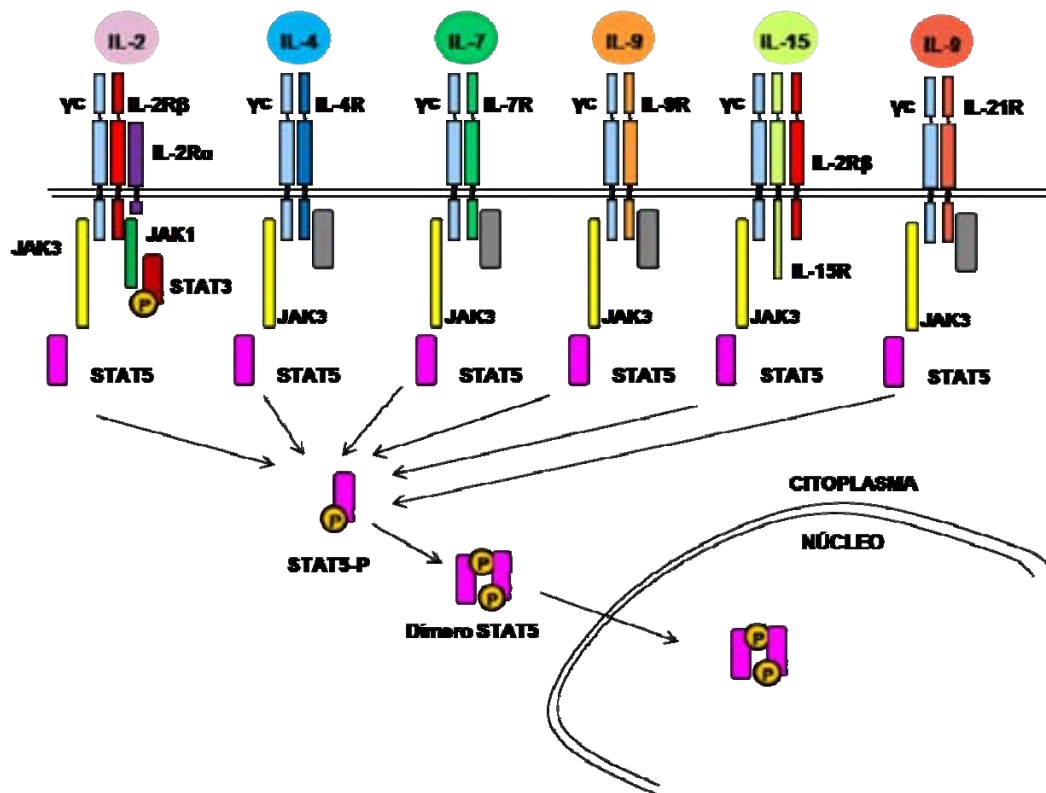


Figura I.3. Esquema de la unión de IL-2R γ c a las citocinas y receptores con los que interactúa y de su señalización a través de JAK3 y STAT5.

3.3.- Bases moleculares del X-SCID y la Deficiencia en JAK3

El locus responsable de X-SCID fue mapeado por análisis de ligamiento en la parte proximal del brazo largo del cromosoma X en 1987 (de Saint Basile, 1987). Ese mismo año se descubrió que las mujeres que eran portadoras obligadas de la enfermedad sólo expresaban el cromosoma X no mutado en sus linfocitos T. Esta inactivación sesgada refleja una desventaja selectiva en la proliferación, diferenciación o supervivencia de progenitores linfocitarios que no contienen el producto normal del gen. Esta inactivación es sesgada tanto en los linfocitos T y B como en las células NK, pero es aleatoria en granulocitos, monocitos y otros tejidos (Puck, 1987). Por tanto, el producto de ese locus es necesario para el desarrollo linfoide de las células pluripotenciales de la médula ósea, pero no para el mieloide. Pero no fue hasta 1993 cuando 2 grupos (Noguchi, 1993b; Puck, 1993) demostraron que el gen que codifica la cadena gamma común del receptor de la IL-2 (*IL-2RG*), que había sido clonado el año anterior (Takeshita, 1992), estaba localizado en el locus del X-SCID. Se encontraron mutaciones deletéreas en este gen en pacientes con X-SCID, demostrando así que *IL-2RG* es el gen afectado en esta patología.

IL-2RG codifica la cadena gamma común del receptor de la IL-2 (IL-2-R γ c). Este gen está localizado en Xq13.1 y se expande a lo largo de 4,14 Kb agrupado en 8 exones (Figura I.4). Su transcripción genera un mRNA de 1.451 nucleótidos que se traduce en una proteína de 369

aminoácidos y 42 KDa de peso molecular. Es una proteína tipo I que forma parte de la familia de los receptores de citocinas. Contiene 4 cisteínas conservadas en el extremo extracelular (N-terminal), la caja WSXWS típica de los receptores de citocinas, un gran dominio hidrofóbico transmembrana y una parte intracelular con secuencias homólogas a SH2 en su extremo C-terminal.



Figura I.4. Esquema del gen *IL-2RG*, que codifica IL-2-Ryc (www.ensembl.org).

La correspondencia uno a uno existente entre IL-2-Ryc y JAK3 hizo sospechar que los pacientes con fenotipo clínico de X-SCID pero con una herencia autosómica recesiva podían tener mutaciones en *JAK3* (Macchi, 1995). El gen *JAK3* está codificado en el cromosoma 19 (19p13.1) y se expande a lo largo de 23,25 Kb distribuido en 24 exones (Figura I.5)

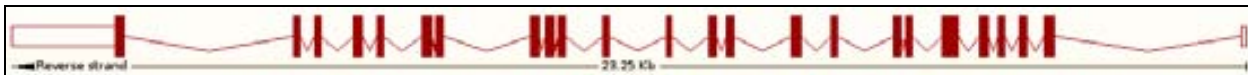


Figura I.5. Esquema del gen *JAK3* (www.ensembl.org).

Se transcribe en un mRNA de 5.432 nucleótidos que se traduce en una proteína de 1.124 aminoácidos y 125 KDa de peso molecular, perteneciente a la familia *Janus* de tirosinas kinasas. Esta familia está formada por 4 miembros: JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2. Todos ellos comparten una estructura similar, con un dominio kinasa C-terminal, denominado JH1, un dominio tipo kinasa más proximal (JH2) y otras 5 regiones homólogas en N-terminal (JH3-JH7). La expresión de JAK3 está restringida a células hematopoyéticas, y está implicada en la diferenciación linfoide.

3.4.- Análisis mutacional del gen *IL-2RG*

Se han reportado mutaciones en *IL-2RG* responsables de X-SCID en todos los grupos raciales. Existen bases de datos de mutaciones en *IL-2RG* disponibles en internet, como por ejemplo <http://www.genome.gov/DIR/GMBB/SCID>. Se han descrito tanto mutaciones *nonsense* (cambio a codón STOP) como mutaciones *missense* (sustitución de aminoácido). Las mutaciones *missense* pueden alterar dominios esenciales de la proteína, como las cisteínas extracelulares o el motivo WSXWS entre otros. En algunos pacientes se han detectado inserciones, deleciones o mutaciones de *splicing* responsables de la patología, ya que alteran la pauta de lectura de la proteína.

Las mutaciones en este gen no están uniformemente distribuidas, sino que existen *hot spots* mutacionales (puntos calientes donde la frecuencia de mutaciones es mayor de lo esperado), cinco de ellos relacionados con dinucleótidos CpG y situados en los exones 5 y 6. Todos son sustituciones de diferentes Argininas: p.Arg224Trp, p.Arg226Cys, p.Arg226His, p.Arg285Gln y p.Arg289STOP.

La mayoría de las mutaciones reportadas comprometen severamente la expresión de IL-2-Ryc, y si la permiten, la molécula no es funcional. Existen casos excepcionales en los que la

proteína conserva parte de su función y da lugar a una sintomatología más leve con números normales de linfocitos T (DiSanto, 1994).

3.5.- Análisis mutacional del gen *JAK3*

La identificación de mutaciones en el gen *JAK3* como responsables de SCID T-B+NK- se basó en el análisis de genes candidatos. Se han descrito todo tipo de mutaciones en homocigosis y en heterocigosis compuesta, que se extienden a lo largo de todo el gen: mutaciones *missense*, *nonsense*, deleciones, inserciones y alteraciones de *splicing*. Las mutaciones *missense* y las pequeñas deleciones que conservan la pauta de lectura han permitido analizar la función de los diferentes dominios de *JAK3*. Existen bases de estas mutaciones disponibles en internet, como la <http://bioinf.uta.fi/JAK3base> en las que están registradas todas ellas.

3.6.- Bases moleculares de la Disgenesia Reticular

En el año 2009 se describió que mutaciones en el gen que codifica la adenilato kinasa 2 (*AK2*) son las causantes de la Disgenesia Reticular (Lagresle-Peyrou, 2009; Pannicke, 2009). Se identificó gracias al análisis de desequilibrio de ligamiento en múltiples familias con individuos afectados, que delimitó una región en el cromosoma 1, 1p31-p34, que contenía dicho gen.

El gen *AK2* tiene casi 29 Kb (Figura I.6) y codifica 2 mRNAs diferentes por *splicing* alternativo, que dan lugar a dos proteínas que se diferencian en el extremo carboxiterminal:

- AK2A, de 239 aminoácidos y 26 KDa de peso molecular, que está codificada por los 6 primeros exones que generan un mRNA de 1.021 bp.
- AK2B, de 232 residuos y 25 KDa, en el que del sexto exón pasamos por un sitio de *splicing* crítico a un séptimo situado en 3', con un mRNA de 3.586 bp.



Figura I.6. Esquema del gen *AK2* (www.ensembl.org).

AK2 se expresa en el espacio intermembranoso mitocondrial de una gran variedad de tejidos, como hígado, riñón, bazo y corazón (Noma, 1998). *AK2* también se expresa en la *stria vascularis* de la cóclea del oído interno, de ahí la sordera bilateral neurosensorial asociada a la Disgenesia Reticular (Lagresle-Peyrou, 2009). La localización de *AK2* en el espacio intermembranoso mitocondrial sugiere un papel en el abastecimiento de la energía necesaria para la proliferación de los precursores hematopoyéticos y/o en el control de la apoptosis celular. Estudios en *Drosophila* y el pez zebra indican que *AK2* tiene un papel importante durante el desarrollo (Pannicke, 2009).

3.7.- Análisis mutacional del gen *AK2*

Hasta la fecha, sólo se han publicado las mutaciones descritas en los artículos originales donde se asociaban por primera vez las alteraciones en dicho gen con la Disgenesia Reticular (Lagresle-Peyrou, 2009; Pannicke, 2009). Se trata de mutaciones en homocigosis *missense*, *nonsense*, deleciones que van desde 1 base a 5Kb, mutaciones de *splicing* y heterocigotos compuestos de este tipo de mutaciones.

3.8.- Bases moleculares del SCID T-B- y OS

Tanto las inmunoglobulinas como los TCRs poseen 2 dominios estructurales: una región constante, que media las funciones efectoras, y una región variable, que forma el bolsillo de unión al antígeno. Estos dominios variables se generan mediante un fenómeno de recombinación dirigido denominado recombinación V(D)J que tiene lugar entre un grupo de segmentos génicos denominados V (variabilidad), D (diversidad) y J (unión, *joining*). Este mecanismo consiste en cortar y pegar fragmentos de DNA y es llevado a cabo por un complejo multiproteico del que forman parte, entre otros, las recombinasas RAG-1 y RAG-2 y Artemis. El dímero RAG es necesario y suficiente para iniciar el proceso (McBlane, 1995).

El conocimiento de estas proteínas llevo a pensar que los pacientes SCID con deficiencia en la recombinación V(D)J (SCID T-B-NK+) podrían tener mutaciones en los genes *RAG* (Schwarz, 1996). El descubrimiento de pacientes con SCID y OS dentro de la misma familia llevó a analizar los genes *RAG* en OS, mostrando que estos pacientes también tienen mutaciones en los genes *RAG* (Villa, 1998).

Los genes *RAG-1* y *RAG-2* están ambos localizados en 11p13, separados por unas 15 Kb. Ambos tienen 2 exones, aunque la región codificante está sólo en el segundo. El gen *RAG-1*, que abarca 11,75 Kb, se transcribe a un mRNA de 6.582 bp que se traduce a una proteína de 1.043 residuos y 119 KDa (Figura I.7a). El gen *RAG-2* con 6,32 Kb de longitud, da lugar a un mRNA de 2.412 bp y una proteína de 527 aminoácidos y 59 KDa (Figura I.7b).

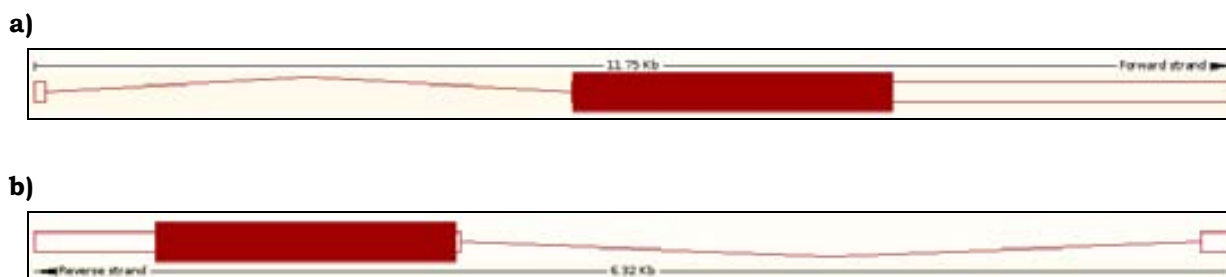


Figura I.7. Esquema de los genes *RAG-1* (a) y *RAG-2* (b) (www.ensembl.org).

Estas proteínas están muy conservadas a lo largo de la evolución. Ambas tienen secuencias de localización nuclear en el extremo N-terminal, un dominio de dimerización, un core catalítico y dominio de unión al DNA situado en C-terminal.

3.9.- Análisis mutacional de los genes *RAG-1* y *RAG-2*

Por tanto, las mutaciones en *RAG* son responsables del SCID T-B-NK+ pero también del OS. La diferencia clínica radica en el tipo de mutaciones. Este fenómeno ha sido descrito en otras IDPs como por ejemplo el Síndrome de Wiskott-Aldrich, la Trombocitopenia ligada al X y la Neutropenia ligada al X, que están causadas todas ellas por alteraciones en el gen *WAS*.

Existen bases de datos de mutaciones de los genes *RAG-1* y *RAG-2* disponibles en internet, como por ejemplo <http://bioinf.uta.fi/RAG1base> y <http://bioinf.uta.fi/RAG2base>, entre otras.

Las mutaciones en *RAG* que son responsables de SCID son alteraciones que anulan totalmente la capacidad recombinasa de estas proteínas, ya sean mutaciones *nonsense* (codón STOP), *missense* (cambio de aminoácido), inserciones o deleciones. Las células pre-B y pre-T

no sobreviven durante el desarrollo linfocitario si no reciben señales de supervivencia a través de sus receptores pre-B y pre-T, respectivamente. En el caso de una deficiencia completa en RAG, la recombinación V(D)J no puede iniciarse, por lo que las cadenas IgM y TCR no se sintetizan y no están disponibles para formar el receptor pre-B ni el pre-T. Estos precursores linfocitarios no recibirán señales de supervivencia y morirán. De ahí la linfopenia T y B de estos pacientes.

Sin embargo, el OS está causado por mutaciones hipomórficas, es decir, que las proteínas conservan parte de su actividad recombinasa. Por ello, estos pacientes presentan linfocitos T oligoclonales en periferia. Se trata principalmente de mutaciones *missense*. En general, los pacientes con SCID tienen 2 alelos nulos, mientras que los de OS pueden tener 2 alelos parciales o 1 parcial y 1 nulo.

Las mutaciones de los pacientes con SCID y OS han ayudado a dilucidar el papel de determinados residuos dentro de la proteína. Existen pacientes con OS que tienen una delección en el extremo 5' de *RAG-1* que llevan a un corrimiento en la pauta de lectura y la aparición de un STOP. Sin embargo, existe una recombinación V(D)J residual. Se ha visto que es debido a una proteína truncada que se genera a partir de una metionina intermedia que conserva parte de su actividad generando un repertorio restringido (Noordzij, 2000).

Se ha descrito un nuevo grupo de pacientes con deficiencia en RAG que tienen algunas, pero no todas, las características clínicas e inmunológicas del OS, por lo que son denominados SCID/OS atípicos o *Omenn-like*. Son portadores de al menos una mutación *missense*: existe una recombinación V(D)J parcial responsable del desarrollo de algunas células T e incluso B (de Villartay, 2005). Por tanto, se cree que la presencia de una actividad parcial de RAG debe de ser un pre-requisito para el OS, pero que otros factores epigenéticos son necesarios para que se desarrolle esta enfermedad (Corneo, 2001).

3.10.- Diagnóstico de las SCID

El diagnóstico de X-SCID debe de ser considerado en niños varones con una grave linfopenia, bajos niveles de linfocitos T y células NK, niveles normales o elevados de linfocitos B e hipogammaglobulinemia (con variabilidad de la IgG que es de origen materno). En la exploración por rayos X no debe existir sombra tímica. En la mitad de los casos se constata una historia familiar de herencia ligada al sexo. En un paciente con manifestaciones clínicas típicas de X-SCID pero con un elevado número de linfocitos T debe indagarse su origen, ya que podrían ser de origen materno y confundir el diagnóstico. Existen anticuerpos monoclonales contra la molécula IL-2R γ c, por lo que puede ser detectada en la superficie de linfocitos y monocitos por inmunofluorescencia, aunque la interpretación de los resultados es difícil debido a los bajos niveles de expresión de esta proteína. Además, la presencia de linfocitos T maternos puede interferir. Por otro lado, algunas formas mutadas de la proteína pueden expresarse a niveles equivalentes a las formas nativas, por lo que sólo el análisis genético confirmará el diagnóstico.

En niñas y en varones una vez descartada la forma ligada al X, se considerará el análisis de otros genes candidatos, como *JAK3* o *IL7RA*. En el caso de la deficiencia en *JAK3* se puede evaluar la fosforilación de STAT5 tras la activación con IL-2. En el caso de que la linfopenia vaya acompañada de neutropenia se debe plantear el diagnóstico de Disgenesia Reticular y el consecuente estudio del gen *AK2*.

El diagnóstico de SCID por deficiencia en RAG se considerará en pacientes, tanto niños como niñas, con una grave linfopenia, bajos niveles de linfocitos T y B pero normales de células NK, hipogammaglobulinemia y dermatitis eczemoide. También puede haber linfocitos T de origen materno. En el caso del OS, la eritrodermia generalizada, la eosinofilia, los niveles elevados de IgE en ausencia de linfocitos B, y los linfocitos T oligoclonales autoreactivos, serán claves para orientar el diagnóstico. Únicamente el estudio de los genes *RAG-1* y *RAG-2* confirmará estas entidades.

En las familias en las que se haya identificado la mutación responsable de estas patologías, se pueden realizar diagnósticos prenatales mediante el análisis de DNA obtenido en un muestreo de vellosidades coriónicas.

3.11.- Tratamiento y pronóstico de las SCID

Todas las SCID son enfermedades muy graves en la que la mayoría de los pacientes mueren en los primeros años de vida. Son enfermedades fatales a no ser que el sistema inmune sea reconstituido, bien mediante un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) de médula ósea o de sangre de cordón umbilical o por la corrección de células hematopoyéticas autólogas por terapia génica. Desde el diagnóstico hasta la recuperación total del TPH, se administran inmunoglobulinas intravenosas (IVIG) y tratamientos profilácticos con antibióticos, antifúngicos y antivirales para garantizar la cura total. Los pacientes que reciben el TPH poco después del nacimiento tienen una mejor evolución: un implante más rápido, pocas infecciones post-TPH y menos GVHD. En los pacientes con OS es especialmente importante el TPH precoz, ya que permanecen en estado crítico debido a los problemas cutáneos e intestinales relacionados con sus células T autoreactivas. Además, estas células T pueden evitar un implante correcto de las células del donante por lo que el acondicionamiento debe de ser muy agresivo.

La X-SCID fue la primera enfermedad que se curó con un TPH de médula ósea en el año 1968 (Gatti, 1968). Fue de un hermano HLA idéntico y marcó el inicio de estas terapias. También fue la primera en realizarse un TPH haploidéntico con células T deplecionadas (Shearer, 1985). El diagnóstico temprano, los nuevos antibióticos y los cuidados de soporte han hecho posible la evolución del X-SCID de fatal a curable. Un 90% de estos niños que reciben un TPH sobreviven (Buckley, 2004). Además, también fue la primera enfermedad tratada *exitosamente* con terapia génica (Cavazzana-Calvo, 2000). Se realizó en enfermos que no tenían un donante HLA compatible. El protocolo consistió en exponer *ex vivo* células de la médula ósea del paciente a retrovirus que contenían el cDNA de IL-2R γ c y reinfundirlas posteriormente. La terapia fue un éxito y se repitió en otras series. Pero un acontecimiento inesperado frenó esta terapia en seco: algunos de los pacientes tratados desarrollaron leucemias de los clones de células T que habían incorporado la construcción retroviral cerca de un oncogen. Uno de ellos murió como consecuencia de la leucemia (Hacein-Bey-Abina, 2003).

4.- Síndromes de hiper-IgM

Los Síndromes de hiper-IgM (HIGM) son enfermedades congénitas caracterizadas por infecciones recurrentes por gérmenes patógenos o saprófitos, con niveles séricos muy bajos de IgG, IgA e IgE y normales o elevados de IgM (Notarangelo, 1992). Son consecuencia de distintos defectos moleculares que llevan a un fallo en la generación del repertorio de anticuerpos (Figura I.8). La más común es la forma ligada al X (XHIM o HIGM-1; MIM: 308230) que está causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína CD40L que se expresa en la superficie de las células T CD4⁺ activadas (Aruffo, 1993). Las mutaciones en la molécula con la que interacciona CD40L, denominada CD40 y que se expresa constitutivamente en las células B, causan el HIGM-3 (Ferrari, 2001) (MIM: 606843). El HIGM-2 (MIM: 605258) y el HIGM-5 (MIM: 608106) están causados por mutaciones en las enzimas AID (Citosín deaminasa inducida por activación) (Revy, 2000) y UNG (Uracil DNA glicosilasa) (Imai, 2003b) respectivamente, y que están selectivamente expresadas en las células B de los centros germinales. Se desconoce cuál es la causa del HIGM-4 (MIM: 608184) aunque se supone que se trata de un defecto posterior a la actividad de la enzima AID en la generación de los anticuerpos y que está relacionado con la reparación del DNA (Peron, 2007). Todas estas otras formas de HIGM tienen una herencia autosómica recesiva.

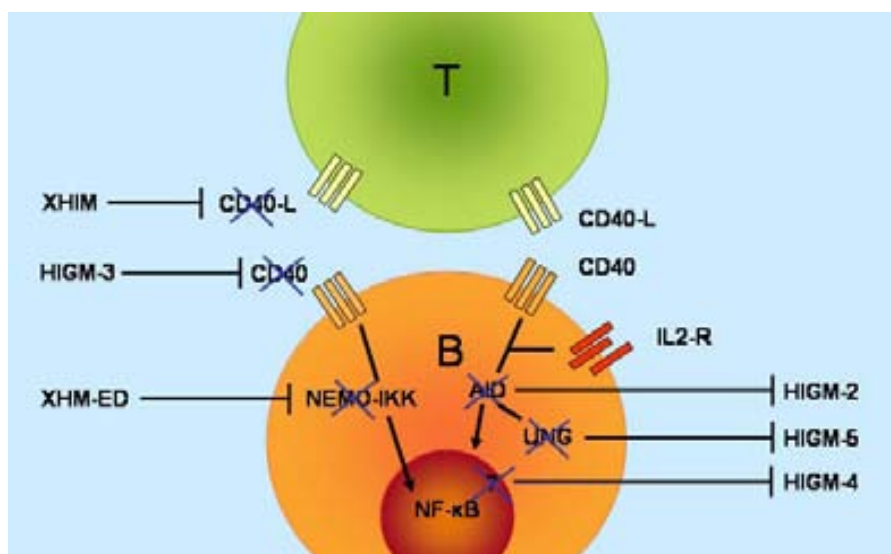


Figura I.8. Esquema sobre los diferentes tipos de hiper-IgM y el defecto molecular responsable.

Otra forma de hiper-IgM ligado al X es el que está asociado con la Displasia Anhidrótica Ectodérmica con Inmunodeficiencia (XHM-ED o EDA-ID; MIM: 300291) que está causada por mutaciones en el gen que codifica el modular esencial de NF-κB (NEMO), también denominado IKK γ . NEMO es un factor requerido en varias vías de transducción, entre ellas la que se activa por la interacción CD40-CD40L (Zonana, 2000).

4.1.- Generación del repertorio de anticuerpos

La generación del repertorio de anticuerpos requiere dos pasos sucesivos. El primer paso es independiente de la interacción antígeno-célula T y tiene lugar en la médula ósea. Allí, los

linfocitos B inmaduros reordenan los segmentos génicos V (variabilidad), D (diversidad) y J (unión, *joining*) de sus inmunoglobulinas gracias a lo cual se forma un segmento integrado funcional V(D)J que está separado de la región constante μ ($C\mu$) por un intrón. Un procedimiento similar ocurre con las cadenas ligeras κ y λ . Posteriormente se transcribe y el RNA se procesa para dar lugar a un mRNA funcional que se traducirá en la proteína IgM. De esta manera se genera un primer repertorio de anticuerpos formado exclusivamente por IgM.

El segundo paso es dependiente de la interacción antígeno-célula T y tiene lugar en los órganos linfoides secundarios. El antígeno es presentado por el linfocito B en un contexto de MHC II al linfocito T CD4+ que lo reconoce a través de su TCR. El reconocimiento del antígeno junto con la interacción de moléculas coestimuladoras provoca la activación del linfocito T CD4+ que pasa a expresar CD40L en su superficie. CD40L interacciona con CD40 que se expresa de forma constitutiva en la célula B. Esta interacción conduce a la proliferación de las células B, a su diferenciación y a la formación de centros germinales. Los linfocitos T CD4+ activados secretan citocinas para incrementar la proliferación y para determinar el isotipo de inmunoglobulinas que se van a generar. Es en los centros germinales donde se dan de forma exclusiva dos fenómenos genéticos que llevan a esta generación del segundo repertorio de anticuerpos. El primero de ellos es el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas (CSR o *class switch recombination*) que tiene lugar a través de un proceso de recombinación entre dos regiones S (*switch*) diferentes que están localizadas por encima de cada región C en el gen que codifica las inmunoglobulinas (Figura I.9). El cambio de la región $C\mu$ por una región constante de otro isotipo de inmunoglobulina ($C\gamma$, $C\alpha$, $C\epsilon$) es lo que conduce a la producción de IgG, IgA e IgE que contienen la misma región V específica (Kinoshita, 2000). En este proceso intervienen diferentes enzimas como por ejemplo AID y UNG.

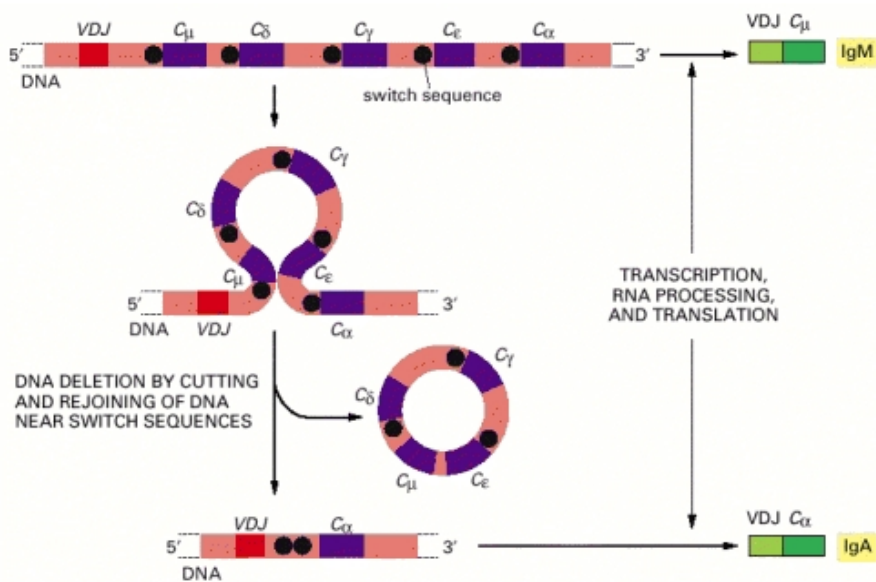


Figura I.9. Esquema simplificado del proceso de cambio de isotipo de las inmunoglobulinas (CSR), en este caso de IgA.

El segundo evento genético es la hipermutación somática (SHM), que consiste en generar mutaciones puntuales en las regiones V de las inmunoglobulinas para mejorar la afinidad de los anticuerpos (Jacobs, 2001). En este proceso también interviene AID, aunque con la participación de otros cofactores diferentes a UNG. Este paso precede a la selección de las

células B: selección positiva si tienen un receptor con alta afinidad por el antígeno o selección negativa si tienen un receptor con una baja afinidad por el antígeno o una especificidad para un auto-antígeno. Algunas de las células B activadas no secretarán inmunoglobulinas si no que se transformarán en células B memoria.

4.2.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de los Síndromes HIGM

Los Síndromes de hiper-IgM son inmunodeficiencias humorales. El XHIM y el HIGM-3 también son inmunodeficiencias combinadas ya que, además de estar comprometida la función de las células B, están afectadas las células T. Por ello, los pacientes con XHIM y HIGM-3 comparten características que los diferencian de los pacientes con HIGM-2, HIGM-4 y HIGM-5, y viceversa.

Los primeros síntomas de los pacientes con HIGM aparecen a edades muy tempranas. Son comunes las infecciones recurrentes en el oído y en todo el tracto respiratorio y gastrointestinal. En el XHIM y el HIGM-3 son frecuentes las infecciones por microorganismos oportunistas, como la neumonía causada por *Pneumocystis jiroveci* (Levitt, 1983) y la diarrea crónica asociada a *Cryptosporidium* (Stiehm, 1986), que también es el responsable de las colangitis esclerosantes que padecen estos pacientes (DiPalma, 1986). También se han reportado casos de hepatitis crónica e incluso cirrosis por infección del virus de la hepatitis B o C (Levy, 1997). Las infecciones oportunistas no suceden en los otros tipos de HIGM porque la inmunidad mediada por células está intacta (Revy, 1998).

La neutropenia es una alteración hematológica común en el XHIM y el HIGM-3. En la mayoría de los casos está causada por un bloqueo en la fase promielocito-mielocito en el desarrollo de los neutrófilos (Notarangelo, 1992). Las úlceras orales y las proctitis son habituales debido a la neutropenia crónica o cíclica. Además, los pacientes con XHIM tienen un elevado riesgo de padecer neoplasias, especialmente linfomas y cánceres del tracto gastrointestinal, sobretodo hepáticos (Hayward, 1997).

La hiperplasia linfoide (esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatías) distingue al HIGM-2 y al HIGM-5 de las otras formas de hipogammaglobulinemias primarias. Esta hiperplasia es consecuencia de los grandes centros germinales que surgen como resultado de una proliferación continua de células B que no son capaces de generar una respuesta de anticuerpos adecuada (Revy, 2000). Por el contrario, los nódulos linfáticos de los pacientes con XHIM e HIGM-3 carecen de centros germinales debido a la falta de interacción entre CD40 y CD40L en las áreas extrafoliculares, lo que lleva a un reclutamiento insuficiente de precursores en estos centros (Ferrari, 2001).

Todas las formas de hiper-IgM se caracterizan por tener niveles muy bajos de IgG, IgA e IgE, niveles normales o elevados de IgM y un número normal de células B circulantes. Los niveles elevados de IgM son resultado de una síntesis policlonal y se ven incrementados con la edad, sobretodo si se ha retrasado el inicio de la terapia sustitutiva con inmunoglobulinas intravenosas (Levy, 1997).

Los niveles de anticuerpos específicos del isotipo IgM son normales. La vacunación con antígenos T dependientes lleva a una disminución en la producción de IgM tanto en la respuesta primaria como en la secundaria, pero la producción de anticuerpos IgG específicos en una inmunización posterior es inexistente o muy baja (Nonoyama, 1993). También se ha observado que los fenómenos de hipermutación somática (SHM) y de reordenamiento génico

(CSR) tienen una menor frecuencia en estos pacientes (Chu, 1995), por lo que los anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación son de menor afinidad. La incapacidad que tienen estos pacientes para generar respuestas de anticuerpos de alta afinidad, así como de generar respuestas IgG e IgA específicas para antígenos T dependientes, es una consecuencia directa de su defecto genético, ya que la célula B no puede cambiar de isotipo ni transformarse en una célula B memoria.

Las células B de los pacientes con HIGM expresan en su superficie IgM y/o IgD, pero no otros isotipos, tanto en sangre periférica como en nódulos linfáticos (Levitt, 1983). En algunos casos hay una coexpresión de IgM e IgG que se atribuye a un procesamiento alternativo de los largos transcritos de mRNA generados en ausencia de recombinaciones para el cambio de isotipo (Akahori, 1990). Se ha demostrado que las células B de los pacientes con XHIM son íntegramente funcionales ya que son capaces de producir IgG, IgA e IgE en cultivos *in vitro* estimulados con anti-CD40 (o CD40L soluble) con la combinación adecuada de citoquinas.

4.3.- Bases moleculares del XHIM

El locus del XHIM fue localizado en Xq26.3-27 (Padayachee, 1992). Posteriormente se clonó el gen *CD40L* y se localizó en la misma región del cromosoma X (Graf, 1992). Estos hechos llevaron a la conclusión de que mutaciones en el gen *CD40L* causan el XHIM (Allen, 1993; Aruffo, 1993; DiSanto, 1993; Fuleihan, 1993; Korthauer, 1993). El gen *CD40L*, denominado actualmente *TNFSF5*, tiene unas 12 Kb y está organizado en 5 exones (Figura I.10).

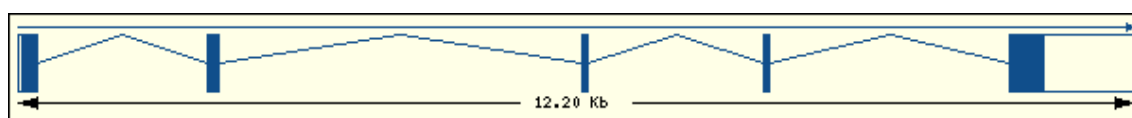


Figura I.10. Esquema del gen *TNFSF5*, que codifica *CD40L* (www.ensembl.org).

El mRNA tiene una pauta de lectura de 783 bp que codifican una proteína de membrana tipo II de 261 aminoácidos. El dominio extracelular tiene en total 215 residuos, el transmembrana 24 y el intracelular 22. Esta glicoproteína de 39 KDa forma parte de la familia de los TNF debido a que la parte extracelular contiene un dominio homólogo común a todos los miembros. El pertenecer a esta familia originó el cambio del nombre del gen a *TNFSF5*. La unidad funcional es un homotrímero (Karpusas, 1995) y los residuos 189-209 parecen ser críticos para su unión a CD40 (Peitsch, 1993).

Varios estudios han demostrado la importancia de la interacción CD40-CD40L en la inmunidad humoral. Se ha visto que CD40L recombinante mimetiza al anticuerpo monoclonal anti-CD40 siendo ambos capaces de estimular la proliferación de células B en presencia de PMA y de inducir la síntesis de inmunoglobulinas (Lane, 1993; Spriggs, 1992). Además, los anticuerpos contra CD40L pueden bloquear la activación T dependiente de las células B (Noelle, 1992).

CD40L también actúa como factor de crecimiento de las células T, siendo una molécula coestimuladora tanto para las células T $\alpha\beta$ como para las $\gamma\delta$ (Armitage, 1993). CD40L es también esencial para la activación de la función efectora de los macrófagos por parte de las células T (Stout, 1996).

TNFSF5 es un gen fuertemente inducible que se expresa principalmente en las células T CD4+. Los linfocitos T CD4+ en reposo no expresan CD40L. Para la expresión del gen *TNFSF5* es necesaria la activación de la PKC (proteína kinasa C) y el incremento del calcio intracelular (Fuleihan, 1994). Esto se consigue *in vitro* con la estimulación con PMA y ionomicina.

La expresión de CD40L está estrechamente regulada a lo largo de todo el desarrollo del individuo. Los timocitos humanos CD4+ CD8+ inmaduros de niños menores de 2 años no expresan CD40L después de la activación. Por el contrario, los timocitos maduros CD4+, pero no los CD8+, sí expresan CD40L. Las células tímicas epiteliales y las células dendríticas expresan CD40, sugiriendo que la interacción CD40-CD40L podría tener un papel en el desarrollo de las células T. De hecho, la selección negativa por antígenos y superantígenos expresados endógenamente es bloqueada con la administración de anticuerpos anti-CD40L, ilustrando el papel de CD40L en la selección tímica (Foy, 1995). La capacidad de las células T para expresar CD40L aparece en el primer mes de edad y alcanza su máximo en la adolescencia tardía (Brugnoni, 1994).

4.4.- Análisis mutacional del gen *TNFSF5*

Las mutaciones responsables del XHIM se distribuyen a lo largo de todo el gen *TNFSF5* y son muy heterogéneas. La mayoría están localizadas en el exón 5 que es donde está casi todo el dominio homólogo al TNF (Hollenbaugh et al., 1992). Existen bases de datos de mutaciones disponibles en internet, como por ejemplo <http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>.

Un amplio estudio de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) realizado en 53 familias con XHIM reveló que las alteraciones más comunes son las mutaciones *missense* (cambio de aminoácido), seguidas de las mutaciones *nonsense* (codón STOP), las deleciones, las inserciones y las mutaciones en las regiones de *splicing* (Notarangelo, 1996). Estudios posteriores han demostrado que la frecuencia de las mutaciones en las regiones de *splicing* es mayor que la de las deleciones e inserciones. Se ha observado que familias aparentemente no relacionadas comparten mutaciones, por lo que se cree que existen *hot spots* mutacionales, como por ejemplo los residuos 140 y 254.

Las mutaciones *missense* pueden afectar a la organización del monómero de CD40L, a la formación del homotrímero funcional o a su unión a CD40. El efecto de las sustituciones de aminoácidos en la expresión y función de CD40L se ha establecido mediante experimentos de mutagénesis dirigida y ha contribuido a definir el papel que juega cada residuo en el plegamiento y ensamblaje de la molécula y en su unión a CD40.

Las inserciones y deleciones son menos frecuentes que las otras mutaciones. En una familia se ha descrito una deleción de más de 10 Kb por delante del exón 4 (Seyama, 1998).

4.5.- Diagnóstico del XHIM

El diagnóstico de XHIM debe considerarse en niños con infecciones asociadas a bajos niveles séricos de IgG, IgA e IgE, pero elevados o normales de IgM. Las células T CD4+ activadas de estos pacientes no expresan moléculas funcionales de CD40L. Esto puede ser demostrado estimulando *in vitro* los linfocitos T con PMA y ionomicina y analizando su expresión con anticuerpos anti-CD40L. Existen una serie de factores críticos que se deben tener en cuenta cuando se hace un diagnóstico de XHIM mediante este ensayo. Primero, se deben incluir controles de activación de las células T, como CD69, para descartar la CVID puesto que un

subgrupo de estos pacientes tiene defectos en la expresión de CD40L porque está afectada toda la activación de las células T (Farrington, 1994). Segundo, puesto que CD40L se expresa en las células T CD4+ activadas se debe analizar la proporción de linfocitos T CD4+, ya que los pacientes con deficiencia en MHC de clase II fallan al expresar CD40L porque tienen una proporción disminuida de estas células (Callard, 1994). Y tercero, se debe tener en cuenta la edad del individuo ya que la expresión de CD40L en las células T neonatales activadas está fisiológicamente reducida (Brugnoni, 1994). Por este motivo, esta prueba es insuficiente para diagnosticar el XHIM en recién nacidos.

Esta técnica puede dar falsos negativos ya que los anticuerpos pueden llegar a reconocer formas mutadas de la proteína. La confirmación definitiva del diagnóstico de XHIM se alcanza a través de estudios genéticos. La búsqueda de mutaciones a nivel del gen *TNFSF5* permite diagnosticar incluso aquellos casos en los que la prueba funcional daba un resultado normal.

A diferencia de otras IDPs ligadas al X, las mujeres portadoras del XHIM tienen un patrón de inactivación del cromosoma X totalmente aleatorio. En estas portadoras existen dos subpoblaciones de linfocitos T circulantes, una que expresa el alelo CD40L normal y otra el mutado. Las portadoras del XHIM que tienen una menor proporción de células T con CD40L normal no tienen ninguna clínica ni ningún defecto inmunológico, lo que indica que la expresión limitada de CD40L es suficiente para inducir el cambio de isotipo y una normal generación de células B memoria (Hollenbaugh, 1994).

A pesar de que la identificación de estas dos subpoblaciones de células T CD4+ activadas (CD40L+ y CD40L-) podría ser utilizada para detectar mujeres portadoras de la enfermedad, la variabilidad de la inactivación aleatoria del cromosoma X limita la fiabilidad de este ensayo. Por este motivo, la detección de mujeres portadoras se debe llevar a cabo mediante el análisis de la secuencia del gen *TNFSF5*. En estas familias se pueden realizar diagnósticos prenatales mediante el análisis de dicho gen en el DNA obtenido en un muestreo de vellosidades coriónicas.

4.6.- Tratamiento y pronóstico del XHIM

El pronóstico a largo plazo de los pacientes con XHIM es peor que el de otras formas de hipogammaglobulinemias congénitas puesto que se trata de una inmunodeficiencia primaria combinada: además de la inmunidad humoral está comprometida la inmunidad celular.

Sólo un 20% de los pacientes alcanzan la tercera década de vida y el 75% de estos pacientes tienen complicaciones hepáticas. La infección por *Pneumocystis jiroveci* tiene un impacto muy importante en la morbilidad y mortalidad durante los cinco primeros años de vida, mientras que las afectaciones hepáticas contribuyen a la mortalidad tardía (Hayward, 1997; Levy, 1997).

El tratamiento común para todos estos pacientes es la infusión regular de inmunoglobulinas intravenosas. Con ello se reduce la severidad y frecuencia de las infecciones, se normalizan los niveles de IgM (en especial si el tratamiento se ha iniciado en una edad temprana) y puede llegar a corregirse la neutropenia. Si la neutropenia es muy severa se administra G-CSF recombinante (Wang, 1994).

Pero en ocasiones este tratamiento no es suficiente y se requiere el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), ya sean de médula ósea o de sangre de cordón umbilical (Thomas, 1995).

5.- Agammaglobulinemia ligada al X

La Agammaglobulinemia ligada al X (XLA; MIM: 300755) fue descrita en el año 1952 por el Dr. Odgen Bruton, motivo por el cual también se le conoce como Enfermedad de Bruton. Bruton describió el caso de un varón de 8 años de edad que desde los 4 era muy susceptible a las infecciones bacterianas, particularmente a las causadas por *Streptococcus pneumoniae*. El análisis del suero mediante electroforesis mostró una ausencia total de inmunoglobulinas (Bruton, 1952). Por ello Bruton la denominó agammaglobulinemia, aunque posteriormente se ha visto que algunos pacientes con XLA sí tienen niveles considerables de inmunoglobulinas. Además, Bruton inició el tratamiento sustitutivo con inmunoglobulinas subcutáneas, demostrando así su eficacia.

En los años 50 no estaba clara la relación entre los linfocitos y las células plasmáticas. Los estudios sobre la XLA fueron cruciales para desvelarla, ya que más de una década después se demostró que la XLA estaba causada por un bloqueo en la diferenciación de los linfocitos B que implicaba una ausencia de células plasmáticas (Smith, 1997).

La XLA está considerada el prototipo de inmunodeficiencia primaria y fue la primera enfermedad humana que afecta el sistema inmune en la que se identificó el defecto responsable. El gen implicado fue aislado simultáneamente por dos grupos en el año 1993 y codifica una tirosina kinasa citoplasmática que fue designada como tirosina kinasa de la Agammaglobulinemia de Bruton (BTK) (Tsukada, 1993; Vetrie, 1993).

A pesar de que la proteína Btk también se expresa en otros linajes hematopoyéticos aparte del de los linfocitos B, no existen evidencias demostradas de que defectos en estas otras células contribuyan al fenotipo XLA. La XLA es una enfermedad ligada al X típica, en la que los varones afectados heredan el gen mutado de su madre, que es una portadora sana de la enfermedad. Los linfocitos B de las mujeres portadoras de la enfermedad expresan mayoritariamente el cromosoma X con la copia nativa del gen *BTK*. Sin embargo, en los otros linajes hematopoyéticos la inactivación es aleatoria (Conley, 1998a). Este hecho demuestra que Btk es esencial para la diferenciación y supervivencia de los linfocitos B pero no para los otros linajes.

5.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de la XLA

La incidencia de la XLA es de 1 cada 200.000 varones. El debut de la enfermedad suele producirse durante el primer año de vida cuando la IgG de transferencia materna ha sido ya catabolizada. Algunos pocos pacientes permanecen asintomáticos hasta la adolescencia.

Al igual que sucede en otras inmunodeficiencias de anticuerpos, las manifestaciones clínicas predominantes de la XLA son infecciones bacterianas recurrentes del tracto respiratorio y gastrointestinal que pueden llegar a ser crónicas. Los síntomas más frecuentes son neumonía, otitis media y diarrea, así como sinusitis, conjuntivitis y pioderma, causadas principalmente por bacterias piógenas como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. La diseminación de la infección puede causar septicemia, meningitis, artritis séptica u osteomielitis (Sideras, 1995).

Lo que distingue la XLA de otros defectos humorales es la frecuencia incrementada de infecciones crónicas provocadas por enterovirus que causan meningoencefalitis. La encefalitis crónica progresiva causada por infecciones enterovirales es una complicación muy grave de la

XLA que puede ser letal; de hecho es la causa más frecuente de mortalidad en los pacientes con XLA. Las otras causas de mortalidad son enfermedad pulmonar crónica, amiloidosis, septicemia con osteomielitis y enfermedad inflamatoria intestinal (Ochs, 1996).

No son importantes otro tipo de infecciones víricas ni tampoco fúngicas ni protozoarias, lo que indica que la inmunidad celular no está comprometida. Por otro lado, no existe predisposición a enfermedades autoinmunes, reacciones alérgicas o tumores.

El defecto en el linaje B provoca una ausencia de linfocitos B y de células plasmáticas en todos los órganos. Los órganos linfoides secundarios están reducidos en tamaño y carecen de folículos y centros germinales. El análisis de la médula ósea en estos pacientes muestra la existencia de un bloqueo en la maduración entre la célula pre-B temprana C μ -negativa y la célula pre-B C μ -positiva (Nomura, 2000). La severidad en el bloqueo es variable por lo que algunos pacientes pueden tener células pre-B aunque su capacidad proliferativa esté comprometida (Campana, 1990).

Los datos de laboratorio característicos de la XLA reflejan el defecto en el linaje B: número muy reducido de linfocitos B y ausencia de todos los isotipos de inmunoglobulinas séricas. Los linfocitos T muestran un incremento relativo. Raramente los pacientes con XLA pueden tener un número normal o casi normal de linfocitos B y de inmunoglobulinas. En estos pacientes está recomendado el estudio del espectro de anticuerpos así como de las respuestas de anticuerpos antígeno-específicas.

5.2.- Bases moleculares de la XLA

El defecto genético de la XLA fue identificado a través de dos estrategias diferentes: el clonaje posicional de la región cromosómica implicada en la enfermedad y la investigación de nuevas proteínas tirosina kinasa expresadas en linfocitos B. Esta nueva proteína que fue denominada tirosina kinasa de la Agammaglobulinemia de Bruton (BTK) y que está codificada por el gen *BTK*, es la proteína alterada en la XLA. Fue la primera proteína tirosina kinasa citoplasmática implicada en enfermedad humana hereditaria.

El gen *BTK* está localizado en el brazo largo del cromosoma X en la región Xq22.1. Tiene 19 exones que se extienden a lo largo de 36,7 Kb (Figura I.11). Codifica un mRNA de 2.579 bp que se traduce en una proteína de 659 aminoácidos y un peso molecular de 77 KDa.

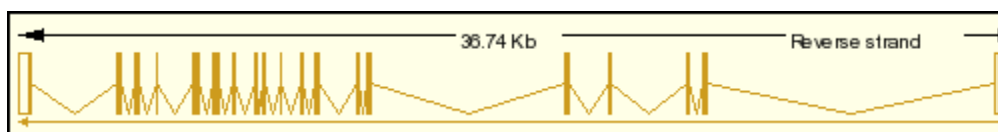


Figura I.11. Esquema del gen *BTK*, que codifica Btk (www.ensembl.org).

Btk forma parte de la familia de proteínas tirosina kinasa Tec. Contiene 5 dominios proteicos. Desde el extremo C terminal está SH1 (*Src homology 1*), dominio kinasa de unos 280 residuos; SH2, dominio de unos 100 aminoácidos que se une a residuos tirosina fosforilados; SH3, que interactúa con regiones ricas en prolina y que tiene 65 residuos; TH (*Tec homology*) de aproximadamente 80 aminoácidos que se une a iones Zinc²⁺; y PH (*Pleckstrin homology*) de 140 residuos que permite la localización de la proteína en membrana a través de su unión a grupos fosfatidil-inositol (Pawson, 1995).

Btk se expresa en todas las células hematopoyéticas a excepción de los linfocitos T y las células plasmáticas. Se ha observado que las células CD34+, que son las células precursoras hematopoyéticas, expresan BTK, indicando así que el gen *BTK* se activa durante la diferenciación temprana.

5.3.- Aspectos funcionales de BTK

En la maduración de los linfocitos B se distinguen diferentes etapas, siendo el linfocito pre-B una de ellas. Este linfocito pre-B tiene un receptor inmaduro, el pre-BCR, que debe ensamblarse adecuadamente para poder transmitir señales al interior de la célula. Estas señales permitirán la selección de la cadena pesada ($C\mu$) y el reordenamiento de las cadenas ligeras del receptor del linfocito B maduro (BCR) (Conley, 2000). La estimulación del pre-BCR provoca la formación de un complejo de señalización de membrana en el que está Btk (Guo, 2000). La activación de Btk lleva a un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular que provoca una progresión en el ciclo celular y con ello el avance hacia la siguiente etapa de maduración: la célula pre-B temprana $C\mu$ -negativa pasa a célula pre-B $C\mu$ -positiva. Btk es imprescindible para que tenga lugar este proceso.

Btk interacciona con multitud de receptores tanto en el linfocitos B como en las otras células hematopoyéticas donde se expresa, desarrollando gran variedad de funciones (Lindvall, 2005) (Figura I.12).

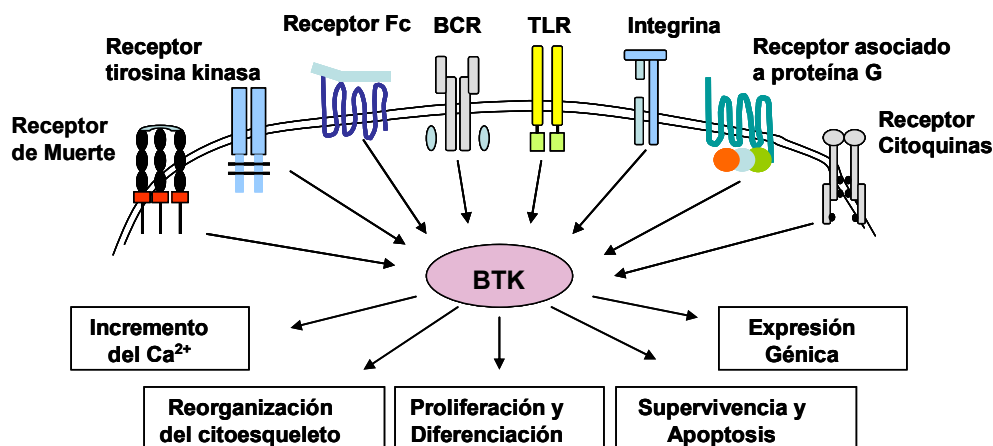


Figura I.12. Modelo esquemático de la señalización a través de Btk y de las funciones en las que está implicada.

Como ya se ha mencionado anteriormente, Btk es crítica en pasos clave del linaje B: proliferación, desarrollo, diferenciación, supervivencia y apoptosis. Btk forma parte del complejo de señalización del BCR del linfocito B maduro. Tras la estimulación del BCR, Btk incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular a través de la activación de la PLC γ . El incremento de Ca^{2+} provoca una serie de eventos celulares como la activación de factores de transcripción específicos y el reordenamiento del citoesqueleto para entrar en la fase S del ciclo celular. Para ello, Btk está unida directa o indirectamente a proteínas como WASP, Akt, Ras, JNK, Bcl-2 o Bcl-x que participan en vías tan diversas como la cascada de las MAPK, rutas antiapoptóticas o reguladoras del citoesqueleto. Además, Btk influye sobre procesos que suceden dentro del núcleo celular modificando factores de transcripción como STAT5 y TFI-II mediante fosforilación de sus tirosinas o uniéndose directamente a ellos para formar un

complejo que se localiza en el núcleo, que es lo que sucede con el factor de transcripción *Bright*. También participa en la vía del NF- κ B cuando hay estimulación a través del BCR y tras la unión del LPS a los TLRs. Es necesario que Btk mantenga una actividad y un tiempo de acción óptimos, por lo que existen mecanismos de retroalimentación negativos.

También se han descrito interacciones de Btk con otros receptores de membrana del linfocito B como el receptor de la IL-5 o el receptor de la IL-10.

Además, Btk interacciona con el receptor Fc ϵ de los mastocitos, el cual media la liberación de sus gránulos vía IgE en respuesta al alérgeno. De hecho, parece jugar un papel importante en la eficiencia de la respuesta. Y también participa en la activación de las plaquetas para su agregación.

5.4.- Análisis mutacional del gen *BTK*

Las primeras mutaciones identificadas en pacientes con XLA eran sustituciones de aminoácidos del dominio quinasa SH1 (Vetrie, 1993). Sin embargo, posteriormente se ha visto que las mutaciones están distribuidas a lo largo de todo el gen, afectando a todos los dominios de la proteína. En 1994 se creó una base de datos con todas las mutaciones descritas en el gen *BTK*, denominada *BTKbase* (<http://bioinf.uta.fi/BTKbase>). Esta base es accesible desde Internet y es actualizada constantemente.

Se han descrito todo tipo de mutaciones en el gen *BTK*: mutaciones *missense* (con cambio de aminoácido), *nonsense* (con aparición de un codón STOP), deleciones, inserciones y mutaciones que afectan al *splicing*.

Al igual que en otras IDPs ligadas al X, muchas de las mutaciones que afectan a un solo aminoácido incluyen una diana CpG (Lindvall, 2005). Las mutaciones *missense* se encuentran mayoritariamente en el dominio SH1 y especialmente en la región más C terminal. Este tipo de mutaciones también existen en los dominios PH y SH2, pero son muy minoritarias en TH y SH3. Sin embargo, las mutaciones *nonsense* están igualmente distribuidas a lo largo del gen.

La mayoría de inserciones y deleciones llevan a la pérdida de la pauta de lectura y con ella la aparición de un codón STOP. Las grandes deleciones pueden afectar a varios exones e intrones e incluso a genes vecinos, como el gen *TIMM8A*. La afectación de estos dos genes da lugar a pacientes con XLA que padecen manifestaciones sensoriales y neurológicas (Richter, 2001).

No se han podido establecer correlaciones entre el genotipo y el fenotipo de los pacientes con XLA. Existe incluso una variación fenotípica entre individuos pertenecientes a la misma familia y que tienen la misma mutación. Por eso se cree que hay otros factores genéticos y ambientales que contribuyen al fenotipo final.

Las mujeres portadoras de mutaciones en el gen *BTK* son sanas y no muestran signos de XLA. Esto es debido a una fuerte selección a favor de los linfocitos B que expresan el cromosoma X que contiene el gen *BTK* nativo (Conley, 1986). Estos linfocitos B tienen una ventaja en la selección pero también en la posterior diferenciación, lo que hace muy improbable que incluso en mujeres en los que el patrón de inactivación fue muy sesgado a favor de gen mutado estén afectadas. Sin embargo, se ha descrito el caso de una mujer con XLA con una mutación en heterocigosis heredada de su padre (Takada, 2004). Existen otras posibilidades teóricas que pueden dar lugar a mujeres con XLA como por ejemplo translocaciones del cromosoma X, Síndrome de Turner o disomía uniparental (Conley, 1992).

5.5.- Diagnóstico de la XLA

El diagnóstico de XLA es más que probable en varones con un número muy reducido de linfocitos B (<1% de linfocitos) y bajos niveles de inmunoglobulinas. Puede haber una herencia ligada al sexo con más de una generación afectada (2 de cada 3 casos) o ser esporádicos causados por una mutación *de novo* (1 de cada 3). Los niveles de proteína Btk se pueden analizar mediante técnicas de citometría de flujo y de *western blot*. Debido a la ausencia casi total de linfocitos B en los pacientes con sospecha diagnóstica de XLA, estas técnicas de detección de proteína deben realizarse sobre otros tipos celulares que contengan dicha proteína, como por ejemplo los monocitos. Estas técnicas también sirven para la detección de portadoras, ya que se observa una expresión bimodal de la proteína en los monocitos. El diagnóstico de XLA debe confirmarse por análisis del gen *BTK*.

En las formas menos graves de la enfermedad el número de linfocitos B y los niveles de inmunoglobulinas están parcialmente disminuidos, por lo que pueden confundirse con Síndrome de hiper-IgM (HIGM), Inmunodeficiencia Común Variable (CVID) o Síndrome Linfoproliferativo ligado al X (XLP).

En el diagnóstico prenatal en familias con la mutación ya identificada se puede analizar el DNA procedente de vellosidades coriónicas.

5.6.- Tratamiento y pronóstico de la XLA

Como en otras inmunodeficiencias de anticuerpos, la terapia sustitutiva con inmunoglobulinas es esencial (Roifman, 1985). Se pueden conseguir niveles normales de IgG en plasma con altas dosis de inmunoglobulinas intravenosas o subcutáneas. Es importante que estos pacientes reciban las dosis adecuadas ya que así pueden evitar las infecciones fatales por enterovirus, ya que una vez se ha adquirido meningoencefalitis enteroviral suele ser resistente a la terapia (Liese, 1992). Los pacientes que reciben un tratamiento adecuado permanecen libres de infección la mayor parte del tiempo. Cuando no es así, durante las infecciones bacterianas reciben antibióticos. Suele ser necesaria una administración prolongada, aunque en muchos casos no es posible erradicar el agente infeccioso completamente.

Otra opción real para los pacientes con XLA, no exenta de riesgos, es el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) de médula ósea o de sangre de cordón umbilical.

La terapia génica aparece como un posible tratamiento de futuro. En teoría es una enfermedad compatible con esta terapia ya que la adquisición de la proteína nativa comporta una ventaja evolutiva para el linfocito B. Sin embargo, podría ser peligroso debido a la actividad quinasa de Btk ya que se ha visto que la sobreexpresión de otras kinasas puede llevar a la formación de tumores (Heisterkamp, 1990).

Con todo, el pronóstico de los pacientes con XLA ha mejorado mucho en los últimos años con el uso de la terapia sustitutiva con inmunoglobulinas y el tratamiento antibiótico.

6.- Síndrome de Wiskott-Aldrich

La primera descripción del Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS; MIM: 301000) publicada en 1937 definía claramente el fenotipo clínico de esta enfermedad: 3 hermanos varones, pero no sus hermanas, presentaban poco después del nacimiento trombocitopenia, diarreas sanguinolentas, eczema e infecciones recurrentes del oído (Wiskott, 1937). Diecisiete años después, Aldrich describe una gran familia con múltiples varones afectados, demostrando así la herencia ligada al X de esta enfermedad (Aldrich, 1954). Posteriormente, se describió la progresiva linfopenia, la ausencia de hipersensibilidad retardada y la anómala producción de anticuerpos *in vivo* (Blaese, 1968; Cooper, 1968). Muchos estudios indicaban que se trataba de un defecto de los linfocitos T (Molina, 1993). Esta idea se vio reforzada con el descubrimiento de que la proteína WAS (WASP), proteína mutada en este síndrome, juega un papel esencial en la remodelación del citoesqueleto posterior a la activación a través del receptor de la célula T (TCR) (Barda-Saad, 2005), contribuyendo a la formación de la sinapsis inmunológica entre la célula T y las células presentadoras de antígeno (Dupre, 2002). Más tarde se vio que las mutaciones en WASP también afectan a la función de las células B (Park, 2005), de las NKs (Orange, 2002) e incluso de las células dendríticas (de Noronha, 2005). En la actualidad sabemos que WASP es una proteína reguladora del citoesqueleto que se expresa en las células CD34+, por lo que todas las células de origen hematopoyético tendrán afectada su funcionalidad.

Los pacientes con WAS tienen trombocitopenia con plaquetas pequeñas (Grøttum, 1969). Presentan eczema, probablemente de origen alérgico puesto que va acompañado de eosinofilia y de elevados niveles de IgE (Berglund, 1968). Además, existe un riesgo incrementado de enfermedades autoinmunes y tumores, principalmente linfomas (Kildeberg, 1961).

La Trombocitopenia ligada al X (XLT; MIM: 313900) es una entidad parecida al WAS pero mucho menos grave. La característica común es la trombocitopenia con plaquetas pequeñas (Villa, 1995), que puede ser intermitente (Notarangelo, 2002). El eczema, si lo presentan, es poco severo. Las funciones inmunológicas están menos alteradas, siendo incluso normales, y no hay ni alteraciones autoinmunes ni riesgo incrementado de tumores.

La Neutropenia ligada al X (XLN; MIM: 300299) es una enfermedad completamente distinta a las dos anteriores, que se caracteriza por neutropenia congénita severa acompañada de infecciones bacterianas recurrentes, pero al igual que ellas está causada por alteraciones en el gen WAS, que codifica la proteína WASP (Devriendt, 2001). En WAS y XLT hay una pérdida de función de la proteína, total en el primer caso y parcial en el segundo, mientras que en la XLN hay una ganancia de función.

6.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas del WAS y XLT

La incidencia de WAS se estima entre 1 y 10 casos por cada millón de individuos, aunque se cree que podría ser mayor. Se desconoce la incidencia real de la XLT, ya que muchos son diagnosticados de Trombocitopenia Idiopática (ITP).

Las manifestaciones del WAS y la XLT suelen estar presentes en el nacimiento en forma de petequias, contusiones y diarreas sanguinolentas. Debido a la pérdida de sangre, tienen anemia. El eczema, medio y localizado o severo y generalizado, es una manifestación temprana del WAS. Los pacientes con XLT tienen eczemas leves y transitorios o ausencia de ellos (Imai,

2004). Algunos pacientes con WAS desarrollan alergias a alimentos o fármacos que pueden causarles choques anafilácticos.

El hallazgo más persistente en el diagnóstico, tanto en el WAS como en la XLT, es la trombocitopenia con plaquetas pequeñas. El recuento de plaquetas es muy variable en estos pacientes ($5\text{-}50\cdot 10^9/\text{L}$). El volumen plaquetar medio es la mitad del de los individuos control (3,8-5 fl versus 7-10,5 fl) dando lugar a una disminución del plaquetocrito. La esplenectomía incrementa el número de plaquetas y su volumen, pero sin llegar a valores normales. Probablemente es porque, aunque se disminuye su destrucción, no se logra normalizar su vida media, que en el WAS y la XLT está muy disminuida. A pesar de todo, la incidencia de sangrados graves es relativamente baja teniendo en cuenta las pocas plaquetas que tienen, lo que sugiere que las que hay funcionan correctamente. Las mujeres portadoras de WAS tienen sus plaquetas totalmente normales. Este hecho se explica por la inactivación sesgada del cromosoma X (Fearon, 1988). En cambio, en la XLT la inactivación es aleatoria, por lo que algunas mujeres portadoras tienen trombocitopenia leve y son diagnosticadas de ITP (Inoue, 2002).

La inmunodeficiencia de los pacientes con WAS puede ser posterior a la observación de la trombocitopenia y el eczema. Debido a que la inmunodeficiencia del WAS es tanto celular como humoral, las infecciones son una manifestación muy común. Las más frecuentes son otitis media, sinusitis, neumonía, sepsis y diarreas de origen bacteriano. También son frecuentes, pero menos, las infecciones virales por varicela y herpes simplex, las fúngicas por *Candida sp* y las infestaciones por *Pneumocystis jiroveci*. En todas ellas encontramos niveles elevados de proteína C reactiva. Los pacientes con XLT carecen de infecciones severas y recurrentes.

El grado de inmunodeficiencia de los pacientes con WAS varía entre familias y depende mayoritariamente de la mutación y de su efecto en la expresión de WASP (Imai, 2004). Durante la infancia el número de linfocitos circulantes de estos pacientes puede ser normal, pero irá disminuyendo debido a un incremento en la muerte celular de las células T (Ochs, 1980). En los individuos con XLT no hay linfopenia (Rawlings, 1999). En los pacientes con WAS la función de las células T está comprometida debido a un defecto a la señalización vía TCR, aunque el grado depende de la dosis del estímulo y de la fuerza de coestimulación. Por ello, la respuesta a mitógenos no está muy afectada, pero la respuesta a aloantígenos está deprimida (Ochs, 2006). Además, las pruebas de hipersensibilidad retardada están alteradas en casi todos los pacientes con WAS. Por otro lado, las células T de estos pacientes tienen la morfología alterada, teniendo muy pocas proyecciones tipo microvilli en su superficie, y malformaciones intrínsecas, indicando que la regulación del citoesqueleto es crucial.

En los pacientes con WAS los niveles séricos de IgG son normales, los de IgM bajos y los de IgA e IgE elevados. La respuesta de anticuerpos es normal frente a algunos antígenos, pero insuficiente frente a otros. Los pacientes con XLT tienen una respuesta de anticuerpos equivalente a los individuos control.

En todos los pacientes con WAS y en muchos con XLT la citotoxicidad celular mediada por las células NK está comprometida debido a una capacidad reducida de estas células para formar conjugados con las células diana, localizar la perforina y señalar vía CD16. Sin embargo, el porcentaje de estas células NK es normal o incluso mayor que en la población sana para intentar compensar la función defectuosa (Gismondi, 2004).

Las mutaciones en WASP también afectan a macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células de Langerhans y otras células de origen mielóide como los osteoclastos.

La alteración en las células B contribuye tanto a la inmunodeficiencia como a la autoinmunidad, sobretodo de tipo hematológico. Las manifestaciones más comunes son anemia hemolítica autoinmune, vasculitis, nefropatía, púrpura, enfermedad inflamatoria intestinal y neutropenia.

En el WAS los tumores pueden aparecer durante la infancia pero son más habituales en la adolescencia y en la edad adulta. El más frecuente es el linfoma de células B EBV+, siendo su pronóstico muy malo. Es destacable señalar que hasta la fecha no se ha reportado ningún caso de tumores en pacientes con WAS que hayan sido sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH).

6.2.- Bases moleculares del WAS/XLT

El gen WAS se delimitó en la región Xp11.22-Xp11.3 a través del estudio de familias con múltiples miembros afectados de WAS (Kwan, 1991). Posteriormente se aisló por clonaje posicional y se demostró que mutaciones en este gen causaban WAS y XLT (Derry, 1994).

El gen WAS tiene 12 exones distribuidos a lo largo de 7,61 Kb de DNA genómico (Figura I.13). Se transcribe un mRNA de 1.821 bp que se traduce en una proteína de 502 aminoácidos y 54 KDa de peso molecular.

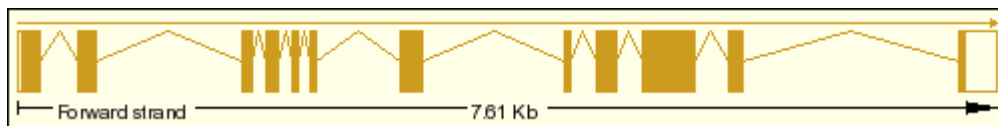


Figura I.13 Esquema del gen WAS, que codifica WASP (www.ensembl.org).

WASP se expresa constitutivamente en el citoplasma de todas las células hematopoyéticas, especialmente en las zonas próximas a la membrana celular, siendo responsable de funciones claves: es un importante regulador del citoesqueleto de actina. La importancia de WASP varía en los diferentes estadios de diferenciación de las células, siendo mayor en las fases más avanzadas. Se ha postulado que la inactivación totalmente sesgada del cromosoma X en las mujeres portadoras de WAS que se da en todas las células de origen hematopoyético podría ser debido a que las células con el cromosoma mutado activo no podrían migrar del hígado fetal a la médula ósea de manera adecuada, viéndose desplazadas por aquellas con el cromosoma nativo activo (Lacout, 2003).

WASP es un miembro de la familia de las proteínas que regulan la reorganización del citoesqueleto de actina (Fachetti, 1998). Contiene tres dominios claves: VCA, GBD y WH1. La polimerización de la actina es iniciada por las proteínas relacionadas con la actina (Arp, *actin related protein*). WASP interacciona a través de VCA con Arp2 y Arp3, que forman el complejo Arp2/3 y que provoca la nucleación de la actina y la consecuente formación de los filamentos. En el citoplasma WASP está autoinhibida debido al secuestro del dominio VCA por GBD (dominio de unión a GTPasa). Cuando CDC42 se une a GBD, la tirosina 291 se fosforila y VCA queda libre para que Arp2/3 se unan e inicien la nucleación de la actina (Figura I.14). De esta manera, se promueve la proliferación, la fagocitosis, la quimiotaxis y la formación de estructuras adherentes y sinapsis inmunológicas. WASP se une por su dominio WH1 a la proteína WIP (*WASP interacting-protein*) que la protege de su degradación. La importancia

clínica de WASP es muy elevada ya que se ha descrito una paciente con fenotipo WAS con mutaciones en el gen que codifica esta proteína (Thrasher, 2010).

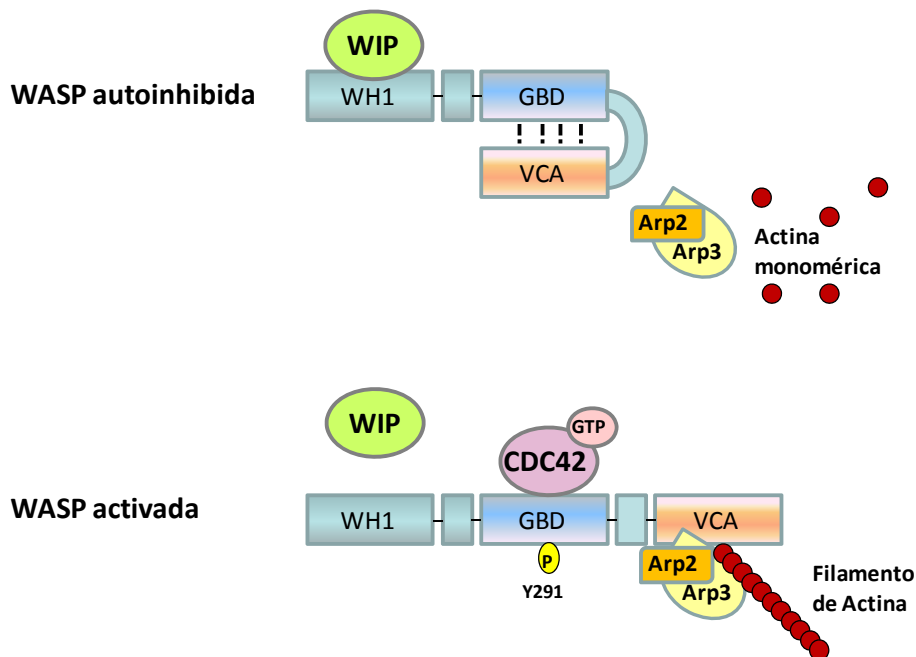


Figura I.14. Esquema de los dominios de la proteína WASP y la implicación en su autoinhibición y activación.

La reorganización de la actina es esencial para los cambios en la forma de la célula, su movimiento y la formación de sinapsis. La activación del TCR en la célula T reclutará a WASP para permitir la formación de la sinapsis inmunológica (Barda-Saad, 2005). Además, la defectuosa polimerización de la actina promueve la apoptosis de los linfocitos T de los pacientes con WAS. También los linfocitos B tienen alterada la morfología, la migración y la adhesión y en las NK hay defectos en la formación de la sinapsis con la célula diana.

Los monocitos, macrófagos, osteoclastos y células dendríticas de pacientes con WAS tienen defectos en la adhesión y orientación en gradientes quimiotácticos por carecer de podosomas y filpodios, ambas estructuras de filamentos de actina (Badolato, 1998). También está afectada la fagocitosis y la quimiotaxis.

Por otro lado, WASP inicia cascadas para la integración de señales que llevan a la translocación nuclear de factores de transcripción como NF-AT y NF- κ B durante el contacto célula-célula, lo cual podría ser independiente de su papel en la reorganización del citoesqueleto.

6.3.- Análisis mutacional del gen WAS

Se han realizado estudios mutacionales en grandes series de pacientes con WAS y XLT. Existen bases de datos con todas las mutaciones descritas hasta el momento, la más completa disponible en internet es <http://homepage.mac.com/kohsukeimai/wasp/waspbase.html>. Las alteraciones más comunes son mutaciones *missense*, con cambio de aminoácido, mutaciones que afectan al *splicing*, pequeñas deleciones y mutaciones *nonsense*, con aparición de un codón STOP. Inserciones, mutaciones complejas y largas deleciones completan el resto de los pacientes.

Las mutaciones *missense* se localizan principalmente en los exones 1-4. Las situadas en el dominio WHT1 provocan fenotipo XLT. En 2 familias no relacionadas, ambas con XLT, se ha descrito una mutación puntual que afecta al codón STOP (STOP503Ser). Las mutaciones de *splicing* son más frecuentes en los intrones 6-11 y dan lugar a múltiples productos que a menudo incluyen pequeñas cantidades de transcrito normal. Inserciones y deleciones suelen afectar a menos de 10 nucleótidos, comportando un cambio en la pauta de lectura y la aparición de un codón STOP prematuro. Las mutaciones complejas son raras y abarcan dobles mutaciones *missense*, mutaciones puntuales seguidas de una deleción o combinación de deleciones e inserciones. Las grandes deleciones pueden afectar a varios genes e incluso a toda la región codificante.

Existen 6 *hot spot* mutacionales. Tres son mutaciones puntuales en la región codificante que afectan a dinucleótidos CpG: 168C>T (que hace que la Treonina 45 sea sustituida por una Metionina), 290C>N/291G>N (que provoca que la Arginina 86 esté reemplazada por una Serina, Glicina, Cisteína, Histidina o Leucina) y 665C>T (que hace que aparezca un codón STOP en la Arginina 211). Los otros 3 son *hot spot* mutacionales en sitios de *splicing*: IVS6+5 g>a (que da lugar tanto a productos normales como alterados que incorporan 38 nucleótidos del intrón 6 apareciendo un codón STOP), IVS8+1 g>n (que da lugar a la deleción del exón 8 con la consiguiente pérdida de la pauta y la formación de un codón STOP prematuro) y IVS8+1 hasta +6 del gtga (con el mismo resultado que el anterior). Estas 6 mutaciones representan una cuarta parte de todas las familias incluidas en la base de datos. Tres de estas mutaciones (168C>T, 290C>N/291G>N y IVS6+5 g>a) permiten la síntesis de pequeñas cantidades de proteína WASP funcional, dando lugar al fenotipo XLT. Mientras que las otras 3 (665C>T, IVS8+1 g>n y IVS8+1 hasta +6 del gtga) no se encuentra WASP funcional, siendo responsables de WAS.

Estudios recientes han reportado mosaicismos somáticos debidos a reversiones espontáneas de las mutaciones o segundas mutaciones que reestablecen la función de WASP (Ariga, 1998). Estas reversiones afectan tanto a células B como T, pero sólo las alteraciones en las células T alcanzan valores significativos en sangre periférica. Esto demuestra que una copia normal del alelo WAS supone una ventaja en el crecimiento y supervivencia de las células T, pero no de las B. También se ha observado este fenómeno en células NK (Lutskiy, 2005). Estos datos sugieren que la terapia génica podría normalizar las poblaciones de células T y NK.

6.4.- Correlación fenotipo-genotipo en WAS y XLT

Las mutaciones en el gen WAS dan lugar a 3 fenotipos distintos:

- El clásico WAS, con la triada trombocitopenia con microplaquetas, infecciones recurrentes como resultado de inmunodeficiencia y eczema (Wiskott, 1937).
- La XLT, caracterizada principalmente por trombocitopenia con plaquetas pequeñas (Villa, 1995), que puede ser intermitente (Notarangelo, 2002).
- La XLN, sin características clínicas de WAS ni XLT y que se corresponde con mutaciones *missense* en el dominio de unión de GTPasa de WASP que implican una activación constitutiva de WASP (Devriendt, 2001).

Para distinguir los fenotipos clínicos WAS y XLT, existe un sistema de puntuación del 1 al 5, en orden de gravedad. La correlación fenotipo-genotipo más consistente se observa al dividir los pacientes en 2 categorías: aquéllos con mutaciones que permiten la expresión de WASP de

tamaño correcto, aunque sea en cantidades reducidas, desarrollan XLT; y aquéllos cuyos linfocitos no expresan WASP o sólo expresan formas truncadas, padecen WAS.

Existen excepciones a esta regla, lo que dificulta predecir el curso clínico de cada paciente basándose sólo en el tipo de mutación del gen WAS. Es importante considerar la complejidad de la enfermedad, las diferencias en el estilo de vida y los cuidados médicos, la exposición a microorganismos no habituales y la influencia de otros genes que afectan a la predisposición a alergias, autoinmunidad y tumores. La puntuación del fenotipo antes de los 2 años de edad no es significativa, ya que puede sugerir un fenotipo menos grave del que da lugar la mutación identificada.

6.5.- Diagnóstico de WAS y XLT

El diagnóstico de WAS/XLT debe considerarse en cualquier niño con petequias, hematomas y trombocitopenia con plaquetas pequeñas congénitas o que aparecen poco después del nacimiento. El eczema apoya el diagnóstico de WAS. Hay que tener en cuenta que las infecciones y las alteraciones inmunológicas pueden estar ausentes en un principio. La linfopenia, que es característica del WAS, puede aparecer o no durante la infancia, pero se desarrollará invariablemente durante la adolescencia.

La detección de alteraciones en WASP se puede realizar mediante citometría de flujo o *western blot*, pero los pacientes con cierta expresión de la proteína nativa pueden pasar inadvertidos. El análisis genético nos permite establecer el diagnóstico definitivo. Una vez identificada la mutación en la familia, las portadoras pueden detectarse por análisis genético mutacional. De igual forma se puede realizar el diagnóstico prenatal a partir de DNA extraído de vellosidades coriónicas o amniocitos (Giliani, 1999).

Los estudios sobre la inactivación del cromosoma X en mujeres portadoras de WAS indican que el cromosoma normal está preferentemente activo en todas las líneas hematopoyéticas, incluyendo las células CD34+ (Wengler, 1995). En familias con XLT la inactivación del cromosoma X suele ser aleatoria aunque se han identificado algunas mujeres con síntomas de WAS (Parolini, 1998) o XLT (Inoue, 2002) debido a una inactivación muy sesgada del cromosoma X a favor del que contenía el gen WAS mutado.

6.6.- Tratamiento y pronóstico del WAS y XLT

La esperanza y la calidad de vida de estos pacientes se ha visto mejorada gracias a los avances en la terapia antimicrobiana que incluye fármacos antivirales y antifúngicos, y el uso profiláctico de inmunoglobulinas intravenosas (IVIG). El diagnóstico temprano es lo más importante para una profilaxis y un tratamiento efectivos.

El eczema requiere una terapia agresiva con esteroides tópicos o puntualmente sistémicos. Para evitar posibles alergias, estos pacientes tienen una dieta muy controlada. Debido a la dieta restringida y a la pérdida de sangre necesitan tratamiento profiláctico con hierro para evitar la anemia crónica. Sólo en hemorragias severas se realizarán transfusiones de plaquetas. Las manifestaciones autoinmunes pueden requerir una inmunosupresión más fuerte de lo normal ya que pueden ser refractarias a las terapias convencionales.

La única terapia curativa para el WAS es el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). La opción preferente son los hermanos HLA idénticos. Los donantes no relacionados no son recomendados en pacientes con más de 8 años de edad (Filipovich, 2001).

La observación de que algunos pacientes mejoran debido a una reversión espontánea de la mutación del gen *WAS* en los linfocitos T, B y NK demuestra que un alelo *WAS* nativo confiere suficiente ventaja en la supervivencia y crecimiento celular (Ariga, 2001; Konno, 2004). Por ello, se piensa que este síndrome podría ser genéticamente corregido.

6.7.- Neutropenia ligada al X

Tal y como se ha mencionado anteriormente, existe una tercera entidad causada por mutaciones en el gen *WAS*, denominada Neutropenia ligada al X (XLN), que se caracteriza por una intensa neutropenia congénita que se acompaña de infecciones bacterianas recurrentes, mielodisplasia y/o otras citopenias (Devriendt, 2001).

Las mutaciones responsables de XLN están localizadas en el dominio de unión a GTPasa (GBD) de la proteína WASP e implican una ganancia de función: son mutaciones *missense* de carácter activador. Hasta la fecha se han descrito 4 mutaciones responsables de esta patología: p.Leu270Pro, p.Ser270Pro, p.Ile276Ser y p.Ile294Thr (Thrasher, 2010).

Estas mutaciones activarían de manera descontrolada la polimerización de la actina, que llevaría a una respuesta alterada del citoesqueleto y a una inestabilidad genómica de la célula (Westerberg, 2010). La XLN demuestra la importancia de una regulación estricta de WASP a través de su autoinhibición, ya que todas las mutaciones actúan impidiendo la interacción intramolecular normal con su extremo C terminal (Figura I.14). Como consecuencia, la autoinhibición de WASP está comprometida y la polimerización de actina está disregulada tanto en actividad como en localización celular (Ancliff, 2006).

La mielodisplasia es variable y se debe a un paro parcial en el desarrollo mieloide. La función mieloide se ve afectada porque el ensamblaje de podosomas y la polaridad celular están alterados y la fagocitosis de antígenos particulados está anulada. La neutropenia característica se da porque los neutrófilos son las células con un ritmo de renovación más elevado y por ello son los más afectados (Thrasher, 2010).

7.- Disqueratosis Congénita

La Disqueratosis Congénita (DKC) es un síndrome hereditario poco frecuente que presenta una marcada heterogeneidad clínica y genética. Se caracteriza por alteraciones mucocutáneas en forma de pigmentación anormal, distrofia de las uñas y leucoplaquia oral, fallo de la médula ósea y predisposición a cáncer (Dokal, 2000).

En los últimos diez años se ha demostrado que la DKC es un abanico de enfermedades causadas por defectos en el mantenimiento de los telómeros, y de hecho se la considera una enfermedad de inestabilidad cromosómica. Todos los pacientes con DKC se caracterizan por tener telómeros muy cortos. Los casos caracterizados genéticamente presentan mutaciones en genes que codifican para componentes del complejo de la telomerasa (*DKC1*, *TERC*, *TERT*, *NOP10* y *NHP2*) cuya función es elongar los telómeros, o en el complejo de la shelterina (*TINF2*) que se encarga de proteger los extremos teloméricos. El análisis mutacional de los genes que codifican proteínas implicadas en estos procesos ha llevado al reconocimiento de formas crípticas de la enfermedad con presentaciones de anemia aplásica y mielodisplasia.

La DKC presenta diferentes tipos de herencia genética. La forma ligada al X (X-DKC; MIM: 305000), también denominada Síndrome de Zinsser-Cole-Engman, está causada por mutaciones en el gen *DKC1* que codifica la proteína disquerina (Heiss, 1998). También existen formas autosómicas dominantes (AD-DKC; MIM: 127550) y recesivas (AR-DKC; MIM: 224230), donde el fenotipo asociado es extremadamente variado (Drachtman, 1995).

7.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de la DKC

La primera descripción de la DKC fue realizada en 1910 por Zinsser (Zinsser, 1910) y desde entonces multitud de enfermedades han sido englobadas bajo este nombre. La triada clásica de la DKC son pigmentación anormal de la piel, distrofia de las uñas y leucoplaquia oral. Además, existe un fallo progresivo de la médula ósea que provoca inmunodeficiencia y una predisposición a cáncer. Con el paso de los años se ha observado que no todos los pacientes con DKC presentan manifestaciones mucocutáneas como presentación inicial y que el fallo de la médula ósea y las alteraciones en otros sistemas pueden presentarse antes de las manifestaciones mucocutáneas más clásicas. Normalmente hay una progresión de alteraciones desde la distrofia del ectodermo hasta alteraciones hematopoyéticas (hipoplasia de la médula ósea y displasia). Sin embargo, los pacientes con AD-DKC presentan anemia aplásica antes de las alteraciones mucocutáneas mientras que la presentación es más clásica en la X-DKC. Existe mucha variabilidad en cuanto a las manifestaciones clínicas, la edad de aparición y la severidad de la enfermedad, incluso dentro de una misma familia (Walne, 2009). Las principales causas de mortalidad en estos pacientes son la inmunodeficiencia causada por el fallo en la médula ósea, complicaciones pulmonares y cáncer.

El rasgo universal de la DKC es que los pacientes tienen los telómeros cortos en comparación con individuos control de su misma edad (Vulliamy, 2001b). Pero los telómeros cortos no son exclusivos de la DKC, ya que otros síndromes como la Ataxia Telangiectasia, el síndrome de Bloom o el de Werner también pueden tenerlos acortados (Blasco, 2007). Sin embargo, los pacientes con DKC tienden a tener los telómeros más cortos que los pacientes con otras alteraciones en el contexto de fallo de la médula ósea (Du, 2009).

7.2.- El complejo de la telomerasa

Los telómeros son las regiones terminales de los cromosomas que están formados por largas repeticiones de la secuencia TTAGGG. Para preservar su integridad, están protegidos por complejos proteicos, entre los que están la telomerasa, el complejo ribonucleoproteico H/ACA y la shelterina (Figura I.15). Sin esta actividad protectora los telómeros estarían incorrectamente procesados por las vías de reparación del DNA (Chan, 2002).

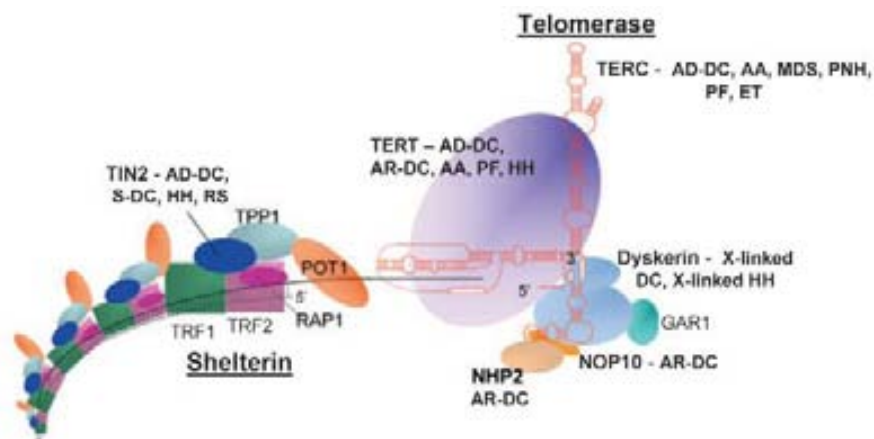


Figura I.15. Esquema del complejo de la telomerasa, donde se indican los componentes y las patologías consecuencia de su alteración (Walne, 2009).

La telomerasa es una polimerasa especializada que añade repeticiones teloméricas (TTAGGG) al extremo 3' de la cadena de DNA después de cada ciclo de replicación. Debido a la naturaleza semiconservativa de la replicación del DNA, la telomerasa es esencial para mantener la longitud de los telómeros en las células en división continua. La telomerasa está muy restringida a ciertos tipos celulares, como las líneas germinales, las células madre y su progenie inmediata y las células T activadas y los monocitos. En aquellas células en las que la telomerasa no está presente, el acortamiento de los telómeros forma parte del proceso normal de envejecimiento celular ya que sin la telomerasa, los telómeros se acortan en cada ronda de replicación hasta alcanzar una longitud crítica donde las células entran en senescencia (Blasco, 2007). La telomerasa es una ribonucleoproteína formada por 2 componentes principales: TERT y TERC. TERT, la transcriptasa reversa de la telomerasa, es el componente catalítico que añade las repeticiones y TERC, el RNA de la telomerasa, es su molde.

El complejo ribonucleoproteico H/ACA está formado por 1 molécula de RNA y 4 proteínas: disquerina, GAR1, NOP10 y NHP2. Estas proteínas están altamente conservadas y se asocian a la conservación de los telómeros, a la biogénesis del ribosoma y al *splicing* del pre-mRNA (Meier, 2005).

La shelterina determina la estructura terminal de los telómeros, ya que está implicada en la generación de los *t-loops* y controla la síntesis de DNA telomérico por parte de la telomerasa. Está formada por 6 proteínas: TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TINT1 y POT1 (de Lange, 2005).

7.3.- Bases moleculares de la DKC

Hasta 1998 se desconocía que genes estaban implicados en la patología de la DKC. A partir de entonces, se han identificado 6 genes causantes de esta enfermedad, pero aún así, se desconoce la causa genética de la mitad de los pacientes con esta patología.

En 1986 la DKC fue mapeada en el cromosoma X, en Xq28, mediante técnicas de análisis de desequilibrio de ligamiento (Connor, 1986); pero no fue hasta 1998 cuando por análisis de genes candidatos en esta región, se identificó que mutaciones en el gen *DKC1*, que codifica la disquerina, son responsable de esta enfermedad (Heiss, 1998).

El gen *DKC1* se extiende a lo largo de casi 15 Kb y está formado por 15 exones que se transcriben a un mRNA de 2.577 bp. Éste se traduce a una proteína de 514 aminoácidos y 57 KDa de peso molecular (Figura I.16).



Figura I.16. Esquema del gen *DKC1*, que codifica la disquerina (www.ensembl.org).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la disquerina es una proteína extremadamente conservada que forma parte del complejo ribonucleoproteico H/ACA que está implicado en la biosíntesis del rRNA, el ensamblaje de los ribosomas y el mantenimiento de los telómeros.

Al igual que sucede en otras enfermedades ligadas al sexo, las mujeres portadoras del alelo *DKC1* mutante presentan una inactivación sesgada del cromosoma X, ya que las células que expresan el defecto genético presentan una desventaja en la proliferación y/o supervivencia.

La búsqueda de mutaciones en *DKC1* demostró que la DKC no es una enfermedad homogénea y que otros síndromes con presentación superpuesta podían compartir el mismo tipo de alteraciones genéticas. El Síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson (HH) es una enfermedad severa multisistémica que afecta principalmente a varones y que se caracteriza por retraso en el crecimiento prenatal, microcefalia, hipoplasia cerebelar y anemia aplásica (Horyerad, 1970; Hreidersson, 1988). Se vio que estos pacientes presentan mutaciones en *DKC1*, demostrando que el HH es una variante severa de la DKC (Knight, 1999). En muchos casos los pacientes con HH no viven lo suficiente para presentar las alteraciones mucocutáneas de la DKC. Sin embargo, no sólo las mutaciones en *DKC1* causan HH.

Posteriormente, se describió que mutaciones en *TERC*, el componente RNA de la telomerasa, dan lugar a formas autosómicas dominantes de DKC (Vulliamy, 2001a); también se han identificado mutaciones en este gen como responsable de anemia aplásica y mielodisplasia.

La identificación de mutaciones en *DKC1* y *TERC* como causantes de DKC estableció que la principal causa de esta enfermedad es la deficiencia en la vía del mantenimiento de los telómeros. Por ello, a partir de ese momento se estudiaron otros componentes del complejo de la telomerasa para determinar las bases genéticas de los pacientes sin caracterizar.

El siguiente gen con mutaciones fue *TERT*, el componente enzimático de la telomerasa, que da lugar a una forma autosómica dominante de la enfermedad. Al igual que en el caso de *TERC*, la presentación clínica no es necesariamente de DKC, sino que muchos pacientes presentan anemia aplásica, a pesar de que otros presentan un fenotipo puro de DKC. Las mutaciones en *TERC* y *TERT* también se ha determinado en otros síndromes como la Fibrosis Pulmonar Idiopática (Armanios, 2007), lo que sugiere que esta enfermedad podría ser también una enfermedad por alteraciones en el mantenimiento de los telómeros (Cronkhite, 2008).

La primera forma autosómica recesiva de la DKC caracterizada genéticamente fue la deficiencia en *NOP10*, un componente del complejo ribonucleoproteico H/ACA. Sólo se ha descrito una mutación en el gen *NOP10* en una única familia de Arabia Saudí (Walne, 2007).

Posteriormente se identificaron mutaciones en el gen *NHP2* como responsables de AR-DKC (Vulliamy, 2008).

Ese mismo año se describió que mutaciones en el gen *TINF2*, que codifica la proteína TIN2 del complejo de la shelterina, son responsables de AR-DKC, HH, Anémia Aplásica y Síndrome de Revesz (Savage, 2008). Este síndrome se superpone en muchas de sus manifestaciones a la DKC y se caracteriza por retinopatía exudativa bilateral, hipoplasia de la médula ósea, distrofia de las uñas, cabello ralo, hipoplasia cerebelar y retraso en el crecimiento (Revesz, 1992).

En un estudio publicado en el año 2009 se estableció que un 30% de los pacientes con DKC presentaban mutaciones en *DKC1*, un 10-15% en *TINF2*, un 5-10% en *TERC*, un 5% en *TERT*, <2% en *NHP2* y <1% en *NOP10* (Walne, 2009).

7.4.- Análisis mutacional del gen *DKC1*

Se han descrito diferentes tipos de mutaciones en el gen *DKC1*. En la web <http://telomerase.asu.edu/diseases.html> se encuentran detalladas todas ellas, ya que además del tipo de mutación está indicada la presentación clínica asociada y la referencia del artículo en la que se describió. En esta web también está el análisis mutacional de los otros genes implicados en DKC.

En *DKC1* se han identificado mutaciones *missense* (cambio de aminoácido), pequeñas inserciones y deleciones y mutaciones que afectan al *splicing*. Sin embargo, no hay descritas mutaciones *nonsense* (generación de codón STOP). Se postula que las mutaciones *missense* se toleran mejor que las alteraciones en la pauta de lectura, bien por deleciones, inserciones o mutaciones de *splicing*, ya que limitan pero no abolen la actividad de la telomerasa.

La tolerancia a la reducción y pérdida de la función de la telomerasa disminuye con cada generación. Esta anticipación, o progresión de los síntomas con la próxima generación, es característica de las enfermedades por deficiencia en la telomerasa y es debida a que los telómeros parentales están ya erosionados y cuando pasan a su descendencia ésta ya empieza con los telómeros más cortos. El incremento en la severidad de los síntomas está ligado al descenso progresivo de la longitud de los telómeros.

Las mutaciones causan una reducción en la actividad de la telomerasa llevando a una limitación en la capacidad proliferativa de las células madre. Esta reducción en la capacidad proliferativa de las células con un grado de renovación alto lleva a las alteraciones mucocutáneas y a bajos contajes en las células de la sangre, tanto hematíes como leucocitos, dando lugar a la anemia aplásica.

7.5.- Tratamiento y pronóstico de la DKC

Actualmente no existe tratamiento curativo para la DKC. La variabilidad en la presentación clínica dificulta el diagnóstico y el fallo en la médula ósea que causa inmunodeficiencia es la principal causa de mortalidad prematura. Se han usado esteroides y factores de crecimiento para mejorar la función hematopoyética, pero el único tratamiento curativo a largo plazo de estas alteraciones es el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). La mortalidad asociada en los pacientes trasplantados de DKC mucho mayor si la comparamos con la asociada a otros síndromes con fallo en médula ósea (Walne, 2009).

8.- Síndrome Linfoproliferativo ligado al X

El Síndrome Linfoproliferativo ligado al X (XLP) es una inmunodeficiencia de disregulación del sistema inmune en la que hay una respuesta inadecuada al virus de Epstein Barr (EBV), que provoca mononucleosis infecciosa fulminante, disgammaglobulinemia y linfomas malignos. También se conoce como Enfermedad de Duncan, y fue descrita por primera vez en 1975 (Purtilo, 1975). Posteriormente, se descubrió que algunos de estos pacientes tenían alteraciones en el gen *SH2D1A*, que codifica la proteína SAP (Coffey, 1998). En el año 2006 se identificó como responsable de esta patología mutaciones en otro gen diferente denominado *XIAP*, que codifica un inhibidor de la apoptosis (Rigaud, 2006). A partir de este momento el XLP se subdividió en dos entidades, el XLP-1 (MIM: 308240) causado por alteraciones en SAP y el XLP-2 (MIM: 300635), debido a mutaciones en XIAP. Aún así, entre un 30-50% de los pacientes con manifestaciones clínicas de XLP no tiene mutaciones en ninguno de estos 2 genes. En el año 2009 se describieron 2 niñas con fenotipo XLP que tenían mutaciones en una kinasa relacionada con SAP, denominada ITK (Huck, 2009).

El EBV es el agente causante de la mononucleosis infecciosa, que suele ser una enfermedad linfoproliferativa policlonal autolimitada con un pronóstico bueno en individuos sanos. El EBV también se ha asociado a cánceres como el linfoma de Burkitt o el carcinoma nasofaríngeo (Ott, 1992; zur Hausen, 1970), siendo su incidencia mucho mayor en individuos inmunocomprometidos. Antes de la infección por el EBV la mayoría de los individuos con XLP son clínicamente sanos. La infección primaria por este virus lleva a una proliferación incontrolada de linfocitos que puede provocar mononucleosis infecciosas severas y frecuentemente fatales, disgammaglobulinemia y/o trastornos linfoproliferativos (mayoritariamente de células B). No obstante, la disgammaglobulinemia y los linfomas malignos se pueden desarrollar en los individuos con XLP aunque nunca hayan estado expuestos al EBV (Grierson, 1993; Strahm, 2000). Esto indica que estas manifestaciones clínicas del XLP no son específicas del EBV y que este virus puede actuar solamente como un potente activador de las manifestaciones más tempranas y serias, como por ejemplo la mononucleosis infecciosa fatal. Hasta la fecha ninguno de los pacientes con XLP-2 ha desarrollado linfomas.

8.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas del XLP

Las manifestaciones clínicas clásicas del XLP-1 son mononucleosis infecciosa fulminante, disgammaglobulinemia y linfomas de células B. No son fenómenos excluyentes y suelen darse en este orden. Además pueden desarrollar anemia aplásica, vasculitis linfoide necrotizante y granulomatosis linfomatoide pulmonar (Seemayer, 1995).

La mononucleosis infecciosa fulminante es la forma más grave de la mononucleosis infecciosa aguda. Muchos de estos pacientes fallecen durante el primer mes de la infección por el EBV (Coffey, 1998). Los signos y síntomas son similares, aunque mucho más severos, que en la infección en adolescentes y adultos sanos (Markin, 1987). Las células B transformadas por el EBV, junto con los linfocitos T CD4+ y los CD8+, invaden numerosos órganos llegando a la infiltración y a la destrucción de órganos hematopoyéticos, hígado, timo, cerebro, corazón y otros tejidos (Sullivan, 1989). La destrucción del hígado suele llevar a una hepatitis fulminante y la de la médula ósea al síndrome hemofagocítico asociado al virus. Este conjunto de síntomas

se conoce como Síndrome Hematofagocítico Linfocítico (HLH). La incapacidad de los pacientes con XLP para eliminar las células infectadas por el EBV lleva a una activación prolongada de las células citotóxicas que secretan gran cantidad de citocinas proinflamatorias que a su vez, activan a los macrófagos, llevando al escenario del síndrome HLH.

La disgammaglobulinemia ocurre frecuentemente después de la infección por el EBV. Existen varios grados, aunque habitualmente se presenta como una reducción progresiva del nivel de inmunoglobulinas con la edad (Grierson, 1991).

Los linfomas malignos se dan aproximadamente en un 30% de los pacientes con XLP-1, a menudo en combinación con disgammaglobulinemia y/o mononucleosis fulminante. La edad media a la que se les diagnostica el linfoma es 4-6 años (Grierson, 1987). La mayoría de los linfomas malignos son linfomas de células B no Hodgkin extra-nodales, normalmente de tipo Burkitt, y muchos de ellos situados en la región ileocecal (Harrington, 1987). La prevalencia de linfomas malignos en el XLP-1 es mayor que en cualquier otra inmunodeficiencia primaria y 200 veces mayor que en la población general (Grierson, 1987).

En la infección aguda por el EBV hay una gran respuesta de linfocitos T CD8+ frente a las células B transformadas por el virus. Más del 10% del total de células B pueden estar infectadas y ser transformadas por el EBV durante esta fase. En esta situación muchas células T CD8+ circulantes se convierten en células T citotóxicas efectoras activadas, que se pueden detectar en sangre periférica. Por ello, en la mayoría de los pacientes con XLP hay una disminución de la relación entre las células T CD4+ y las CD8+, o ratio T4/T8, debido a un mayor número de estas últimas. Los pacientes con XLP son más vulnerables al EBV pero no a otros herpesvirus como el citomegalovirus, el virus del herpes simple o el virus de la varicela-zoster.

Los primeros pacientes descritos con mutaciones en *XIAP* presentaban manifestaciones clínicas muy similares a las anteriormente descritas, a excepción de los linfomas (Rigaud, 2006). Sin embargo, series posteriores reportan pacientes deficientes en *XIAP* con una clínica de HLH familiar recurrente y esplenomegalia, en muchos casos no asociada a infección por el EBV. Pueden desarrollar o no disgammaglobulinemia y no se ha descrito ningún caso de linfoma. Por ello, algunos autores proponen la deficiencia en *XIAP* como una forma de HLH ligada al sexo y no como una forma de XLP (Marsh, 2010).

8.2.- Bases moleculares del XLP

El locus del XLP-1 fue localizado en Xq25 (Skare, 1987) mucho antes de saber que el gen que estaba alterado era *SH2D1A*, que posteriormente pasó a denominarse *SAP* (Coffey, 1998). El gen *SAP/SH2D1A* tiene 4 exones que se extienden a lo largo de más de 26 Kb (Figura I.17) y su transcripción da lugar a un mRNA de 2.450 bp.

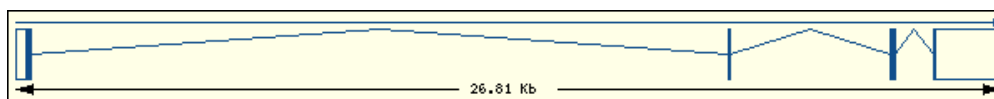


Figura I.17 Esquema del gen *SAP/SH2D1A* (www.ensembl.org).

Codifica una proteína de 15 KDa denominada SAP (*SLAM associated protein*) que está relacionada con los receptores transmembrana de los linfocitos denominados SLAM (*signaling lymphocytic-activation molecule*). SAP es una proteína intracelular de 128 aminoácidos formada

por un dominio SH2 y una corta cola de 24 aminoácidos (Morra, 2001). SAP se expresa ya durante el desarrollo inmunológico temprano y se encuentra en las células NK, NKT y linfocitos T CD4+ y CD8+. Pero sólo las células NKT están ausentes en las deficiencias en SAP.

El gen *XIAP* también está localizado en Xq25. Se extiende a lo largo de 54 Kb agrupadas en 7 exones (Figura I.18), que se transcribe en un mRNA de 8.591 bp, y se traduce en una proteína de 497 residuos y 57 KDa de peso molecular.



Figura I.18. Esquema del gen *XIAP* (www.ensembl.org).

XIAP, también denominado BIRC4, pertenece a la familia de inhibidores de la apoptosis (IAP) que se caracteriza por la presencia de dominios baculovirus IAP repetidos (BIR). Los dominios BIR tienen unos 70 aminoácidos y contienen una secuencia conservada de cisteínas e histidinas que coordinan un átomo de Zinc²⁺. XIAP presenta 3 dominios BIR: BIR-2 inhibe las caspasas 3 y 7 y BIR-3 la caspasa 9. XIAP también tiene un dominio RING en C terminal que posee una función ligasa de la ubiquitina E3. XIAP se expresa en muchas células humanas, incluidas todas las células hematopoyéticas.

8.3.- Papel de SAP en la respuesta inmunitaria

SAP es una molécula adaptadora que controla la señalización a través de la familia de receptores transmembrana SLAM, cuya expresión es diferencial en las diferentes poblaciones de células hematopoyéticas: SLAM (CD150), 2B4 (CD244), Ly-9 (CD229), CD84 y NTB-A. A su vez, estos receptores pertenecen a la familia de receptores CD2.

La interacción de SAP con SLAM es constitutiva, pero las interacciones con los otros receptores dependen de la estimulación del propio receptor, que viene determinada por la fosforilación de sus motivos tirosina de la cola citoplasmática. A su vez, SAP interacciona con kinasas de la familia Src (Fyn, Lck), que fosforilan a los receptores SLAM y a otras moléculas señalizadoras. Tanto SAP como algunos receptores SLAM se localizan en la sinapsis inmunológica durante la activación de la célula T (Figura I.19).

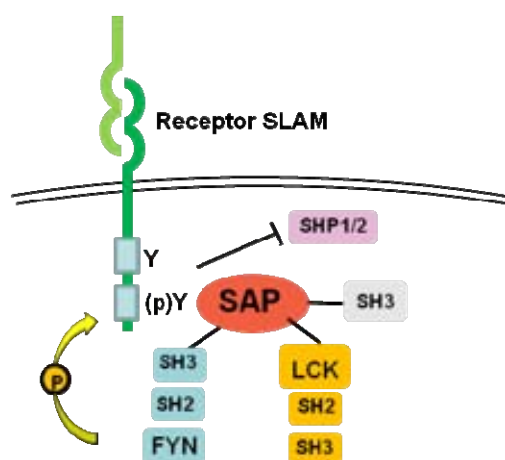


Figura I.19. Vías de señalización en las que participa SAP.

Además, SAP puede potenciar la señalización a través del TCR y de los receptores NK desplazando fosfatasa inhibidoras como SHP-1 y SHP-2 (Figura I.19).

A través de la interacción con los receptores SLAM, SAP potencia el desarrollo de las células NKT, ayuda a la célula T en su desarrollo en los centros germinales para permitir una producción de anticuerpos eficientes y mata las células B transformadas por EBV por la acción de las células T citotóxicas y NKs. También es necesario para el mantenimiento de la homeostasis de la célula T a través del mecanismo de muerte celular inducida por reactivación (RICD). El RICD es un mecanismo autoregulador de apoptosis que mantiene la homeostasis inmune restringiendo el *pool* de células T efectoras.

Las células NKT son células que coexpresan marcadores de células NK y de células T, así como un TCR invariante consistente en la cadena TCRV α 24 y la TCRV β 11, que reconoce glicoesfingolípidos presentados por la molécula CD1d. Estas células secretan una gran variedad de citocinas y se cree que juegan un papel importante en la respuesta antitumoral y antimicrobiana, así como una función reguladora en los procesos autoinmunes. La deficiencia en SAP bloquea la ontogenia de estas células (Pasquier, 2005). Los pacientes con XLP-1 carecen de estas células y las portadoras muestran una inactivación sesgada del cromosoma X en las células NKT, pero no en las otras células (Tabata, 2005). Los primeros pacientes descritos con XLP-2 tampoco tenían NKT, pero los casos clínicos más recientemente publicados sí las presentan (Marsh, 2009).

SAP no se expresa en linfocitos B, no obstante, su expresión en las células T CD4+ es absolutamente necesaria para la maduración de la célula B, la formación del centro germinal y la producción efectiva de anticuerpos.

8.4.- Análisis mutacional del gen SAP/SH2D1A

Se han identificado diferentes tipos de mutaciones en el gen *SAP/SH2D1A*: macro y micro deleciones, que pueden afectar a algunos nucleótidos o a todo el gen; mutaciones que interfieren en la transcripción o el *splicing* del mRNA; mutaciones *nonsense* (codón STOP), siendo p.Arg55STOP la más frecuente; y mutaciones *missense* (sustituciones aminoacídicas), que pueden alterar la estabilidad de SAP, causando una disminución en la expresión, o bien interferir en las interacciones específicas con las proteínas diana (Sumegi, 2002).

No se ha establecido una correlación entre el tipo de mutación y el fenotipo clínico de la enfermedad. Mutaciones idénticas muestran diferentes fenotipos dentro de la misma familia y no se han detectado diferencias significativas en los fenotipos o la severidad de la enfermedad basadas en el tipo o la localización de la mutación (Sumegi, 2002). Esto implica que otros factores genéticos y ambientales, además de la infección por el EBV, son importantes para determinar las manifestaciones de la enfermedad.

8.5.- Diagnóstico del XLP

El diagnóstico del XLP debe considerarse en varones con una respuesta inadecuada a la infección por EBV. Se basa en el análisis mutacional de los genes *SAP/SH2D1A* y *XIAP*, aunque la citometría de flujo o el *western blot* para estas proteínas pueden acelerar el diagnóstico. Hay que tener en cuenta que la mitad de los pacientes con manifestaciones clínicas e inmunológicas de esta enfermedad carecen de mutaciones en estos genes.

También se ha descrito el análisis de las células NKT en sangre periférica como aproximación en el XLP-1, pero no es válida para el XLP-2.

Las mujeres portadoras del XLP no tienen ninguna clínica asociada, por lo que su detección debe llevarse a cabo mediante el análisis de la secuencia genética. En estas familias se pueden realizar diagnósticos prenatales mediante el análisis de dicho gen en el DNA obtenido en un muestreo de vellosidades coriónicas.

8.6.- Tratamiento y pronóstico del XLP

Los pacientes con disgammaglobulinemia son tratados con inmunoglobulinas intravenosas, mientras que las otras manifestaciones clínicas del XLP-1 sólo se pueden prevenir con un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) de médula ósea (Williams, 1993) o de sangre cordón umbilical (Vowels, 1993). La edad a la que se realice el trasplante es crítica y debe hacerse antes de los 10 años (Gross, 1996). No existe experiencia suficiente para avalar el TPH en pacientes con XLP-2 (Filipovich, 2010).

9.- Síndrome de Inmunedisregulación, Poliendocrinopatía y Enteropatía de herencia ligada al X

En 1982, Powell y colaboradores describieron una gran familia de 5 generaciones con muchos varones afectados que presentaban desde edades muy tempranas múltiples endocrinopatías, enteropatías crónicas severas, dermatitis, anemia hemolítica autoinmune, neutropenia y trombocitopenia por autoanticuerpos. Muchos de estos niños morían antes de los 3 años por mala absorción y retraso en el desarrollo, infecciones y otras complicaciones. La autopsia de estos pacientes mostraba infiltrados linfocitarios en pulmones, órganos endocrinos como páncreas y tiroides, e hiperplasia linfocitaria en nódulos linfáticos y bazo. Este síndrome fue denominado Inmunedisregulación, Poliendocrinopatía y Enteropatía con herencia ligada al X (IPEX; MIM: 304790) (Powell, 1982; Wildin, 2002).

Más de 20 años antes de la descripción inicial de esta enfermedad, se describió la cepa de ratones *scurfy*, que se había obtenido por mutación espontánea, en la que los machos presentaban características fenotípicas muy similares al IPEX (Russell, 1959).

El gen responsable del IPEX fue mapeado en Xp11.23-Xq13.3 por análisis de ligamiento (Bennett, 2000). Por otro lado, a través de técnicas de clonaje posicional se descubrió que el gen mutado en la cepa *scurfy* era el factor de transcripción Foxp3 (Brunkow, 2001). Como consecuencia, el ortólogo humano *FOXP3*, que está en Xp11.23, fue reconocido como el gen responsable del IPEX (Bennett, 2001b).

El análisis del modelo murino *scurfy* ha permitido demostrar que FOXP3 juega un papel esencial en la generación de las células T reguladoras CD4+ CD25+, dando pruebas de que la falta de estas células es la causa directa de la temprana aparición de múltiples enfermedades autoinmunes en la ratón *scurfy* y en los pacientes con IPEX (Fontenot, 2003; Hori, 2003; Khattri, 2003).

9.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas del IPEX

Se desconoce cuál es la incidencia real del IPEX. La manifestación clínica más prominente en estos pacientes es la diarrea severa de aparición temprana provocada por la atrofia de los microvilllis y el infiltrado linfocitario en la mucosa del intestino delgado (Powell, 1982). Estos síntomas gastrointestinales no remiten con manipulación de la dieta.

Otra manifestación de temprana aparición es la diabetes insulino-dependiente, que incluso aparece durante el periodo neonatal (Powell, 1982). En estos pacientes no se detecta insulina en suero y suelen presentar autoanticuerpos contra los islotes de Langerhans. En las autopsias se observa una inflamación intersticial crónica con infiltrados linfocitarios y ausencia de células en dichos islotes. Las enfermedades tiroideas son una complicación común y pueden asociarse a autoanticuerpos contra la tiroglobulina o la fracción microsomal del tiroide (Powell, 1982). También son frecuentes la anemia hemolítica Coombs positiva, la trombocitopenia autoinmune o la neutropenia de debut temprano o tardío con autoanticuerpos específicos en suero.

Los pacientes con IPEX pueden presentar durante el crecimiento lesiones eritomasas en todo el cuerpo y posteriormente eczemas o dermatitis psoriasiforme localizada con infiltrado linfocitario. Además, se han descrito alteraciones renales como glomerulonefritis y nefritis

intersticial; y hepatoesplenomegalia y linfadenopatías debido a los extensos infiltrados linfocitarios.

Los pacientes con IPEX presentan susceptibilidad a infecciones graves como sepsis, meningitis, pneumonitis y osteomielitis, incluso antes del tratamiento inmunosupresor (Gambineri, 2008). Los patógenos más comúnmente identificados son *Enterococcus sp*, *Staphylococcus sp*, citomegalovirus y *Candida sp*. Presentan reacciones agudas y severas a las vacunaciones rutinarias.

La evaluación inmunológica de los pacientes con IPEX no muestra alteraciones ni el conteo ni en las subpoblaciones linfocitarias ni tampoco en los ensayos de proliferación. Los niveles de IgG e IgM son normales, pero los de IgA e IgE están incrementados y van acompañados de eosinofilia.

El punto clave de esta patología es la presencia de autoanticuerpos. Muchos de los pacientes presentan autoanticuerpos contra los islotes pancreáticos, la insulina o la descarboxilasa del ácido glutámico, la tiroglobulina o la fracción microsomal, el músculo liso, etc.

Aunque los linfocitos de estos pacientes expresan CD4 y CD25, carecen completamente de las células T reguladoras CD4+ CD25+ que expresan FOXP3, aunque tengan una mutación que permita expresión de la proteína mutada (Gavin, 2006).

9.2.- Bases moleculares del IPEX

Después de identificar una inserción de 2 bp en el gen *Foxp3* del ratón *scurfy* (Brunkow, 2001), diferentes laboratorios reportaron que los pacientes con IPEX tenían una mutación en el gen humano *FOXP3* (Bennett, 2001b; Chatila, 2000; Wildin, 2001).

El gen *FOXP3* está localizado en el brazo corto del cromosoma X (Xp11.23), se extiende a lo largo de 14 Kb y consiste en 12 exones (Figura I.20). Se transcribe a un mRNA de 2.382 bp que se traduce en una proteína de 431 aminoácidos y 48 KDa de peso molecular. FOXP3 tiene un 86% de homología con la proteína murina.



Figura I.20. Esquema del gen *FOXP3* (www.ensembl.org).

El gen *FOXP3* se expresa predominantemente en tejido linfoide (timo, bazo y nódulos linfáticos), particularmente en las células T reguladoras CD4+ CD25+ (Roncador, 2005).

FOXP3 es un miembro de la familia de factores de transcripción FOX que se caracterizan por la presencia de un dominio de unión al DNA altamente conservado, cuya función es potenciar o inhibir la transcripción de genes. FOXP3 contiene en N terminal un dominio rico en prolina, luego un dominio dedo de Zinc y uno de cremallera de leucinas en la porción central, implicados ambos en interacciones proteicas y en C terminal el dominio de unión al DNA. En este último también se encuentra la señal de localización nuclear.

Las funciones esenciales de todo factor de transcripción son el paso a núcleo y la unión al DNA. FOXP3 posee ambas funciones en su dominio de unión al DNA, por lo que la integridad de este dominio es muy importante, ya que su alteración abolirá ambas funciones. Para ser funcionalmente activo, FOXP3 debe formar un homodímero y lo hace a través de la cremallera de leucinas, por lo que mutaciones en esta región impiden la homodimerización.

Sin embargo, el IPEX podría ser más heterogéneo genéticamente de lo que se presumía, ya que algunos pacientes con IPEX no presentan mutaciones en FOXP3 y además, en una familia se ha descrito una paciente con IPEX, sugiriendo la presencia de un locus autosómico responsable de la patología (Owen, 2003; Wildin, 2002).

9.3.- Células T reguladoras CD4+ CD25+

En el año 2001 se describió por primera vez que un subgrupo de células T CD4+ que expresaban abundantemente el receptor α de baja afinidad para la IL-2 (CD25) estaban asociadas a una supresión antígeno-específica de respuestas de células T (Sakaguchi, 2001). Estas células T reguladoras CD4+ CD25+ (T regs) representan entre un 5-10% de las células T CD4+ que se desarrollan en el timo. Además de por la expresión de CD25, se caracterizan por las moléculas CTLA-4 y GITR, aunque el marcador más específico es FOXP3. FOXP3 es el mediador clave del desarrollo de las células T regs en el timo y si está alterado las células T regs no se desarrollan.

Tanto en las células T convencionales como en las células T regs, la activación a través del TCR lleva a la inducción del factor de transcripción NFAT. En el caso de las células T convencionales, NFAT se unirá a AP-1 induciendo la transcripción de genes implicados en la activación de la célula T. Sin embargo en las T regs, NFAT se une a FOXP3 de manera que se transcriben otros genes que están implicados en la supresión inmunológica (Figura I.21) (Wu, 2006).

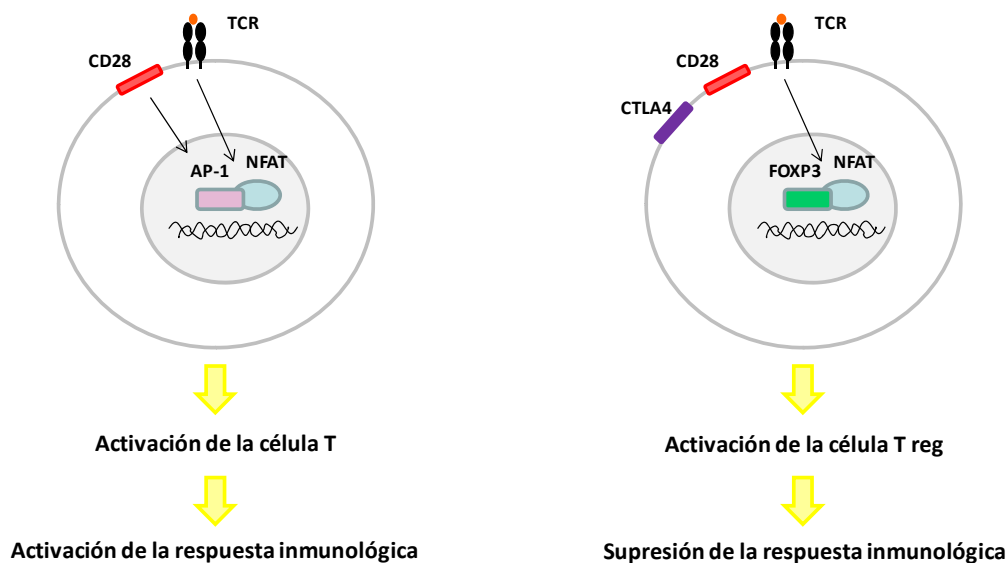


Figura I.21. Unión diferencial de NFAT a AP-1 en células T convencionales y a FOXP3 en células T regs.

Los mecanismos exactos por los cuales estas células T regs ejercen su papel inmunosupresor no están totalmente esclarecidos. Algunos estudios sugieren una interacción dependiente de contacto célula-célula, mientras que otros demuestran que pueden ser independientes de este contacto, por ejemplo a través de la producción de citocinas inmunosupresoras como la IL-10 y el TGF- β . Las T regs actúan en trans de manera dominante, suprimiendo activamente la activación inmune, por lo que juegan un papel muy importante en el establecimiento y

mantenimiento de la tolerancia a lo propio y la homeostasis inmune (Fontenot, 2005). Por ello, la falta de estas células está asociada a enfermedad autoinmune (Wei, 2004). Estas T regs son esenciales en el control de las enfermedades crónicas y juegan un papel muy destacado en la tolerancia a los trasplantes y parecen mantenerse en bajos niveles en los pacientes con rechazo (Zorn, 2005).

Las T regs son las guardianes de la tolerancia inmunológica a lo propio y FOXP3 es el mediador del mecanismo genético de la tolerancia dominante. Las mutaciones en FOXP3 interfieren en este proceso, generando linfocitos T autoreactivos responsables directos de las manifestaciones autoinmunes del IPEX (van der Vliet, 2007).

9.4.- Análisis mutacional del gen FOXP3

La familia inicialmente descrita por Powell en 1982 presentaba una mutación puntual en la región de poliadenilación (AAUAAA→AAUGAA), situada entre las posiciones 878-883 y después del codón STOP, que impide una correcta traducción de la proteína (Bennett, 2001a).

Existen bases de datos con las mutaciones del gen *FOXP3* disponibles en internet, como por ejemplo <http://bioinf.uta.fi/FOXP3base>. Están descritas mutaciones *missense* en sus dominios funcionales de cremallera de leucinas, de unión a DNA y del rico en prolinas, así como mutaciones *nonsense*, deleciones y mutaciones que afectan al *splicing*. Una de estas deleciones empieza antes del exón 1, con lo que no se puede iniciar el procesamiento del transcrito.

9.5.- Diagnóstico del IPEX

Debido al amplio espectro de manifestaciones clínicas, el diagnóstico de IPEX debe ser considerado en cualquier varón joven que presente diarreas intratables, atrofia en los microvilllis intestinales y retraso en el crecimiento. La presencia de rash eritomatoso o eczemoide o una dermatitis psoriática apoya el diagnóstico. La diabetes insulino-dependiente de aparición temprana y/o hipotiroidismo en un paciente con síntomas gastrointestinales y eczema es patognomónica de IPEX. La anemia hemolítica autoinmune, la neutropenia y la trombocitopenia no están siempre presentes. Una historia familiar positiva basada en la triada de diarreas severas y retraso en el crecimiento por atrofia intestinal, enfermedad de la piel tipo eczema y diabetes de debut temprano permite un diagnóstico más precoz.

El diagnóstico de IPEX se confirma demostrando la ausencia de células T reguladoras CD4+ CD25+ y por análisis mutacional del gen *FOXP3*. El análisis de este gen también permite la detección de mujeres portadoras y el diagnóstico prenatal en muestreos de vellosidades coriónicas. La evaluación inmunológica complementaria dependerá del tipo de presentación clínica: el tipo de autoanticuerpo a analizar y el lugar de los infiltrados linfocitarios.

Hay que tener en cuenta el diagnóstico diferencial con otras inmunodeficiencias, como el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (ALPS), en la que hay infiltrados linfocitarios y procesos autoinmunes hematopoyéticos; los APECED (Autoinmune Poliendocrinopatía, Candidiasis y Displasia Ectodérmica); el Síndrome de Omenn (OS) que presenta rash eritomatoso combinado con inmunodeficiencia y elevados niveles de IgE y eosinofilia; y el Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) que también presenta diarreas sanguinolentas, infecciones bacterianas, eczema y trombocitopenia congénita. Sin embargo, existen otras manifestaciones clínicas que los diferencian que se deben tener en cuenta al establecer la sospecha diagnóstica.

9.6.- Tratamiento y pronóstico del IPEX

En los pacientes con IPEX es de vital importancia un tratamiento agresivo y temprano. Muchos requieren nutrición parenteral e incluso transfusiones de hematíes y plaquetas. La inmunosupresión continuada a largo plazo es efectiva en algunos pacientes, pero sólo parcialmente y por un periodo de tiempo limitado.

Al igual que ocurre en otras IDPs, el único tratamiento curativo es el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). Algunos pacientes con IPEX trasplantados consiguen una remisión completa de los síntomas tras el TPH (Mazzolari, 2005). Esta remisión depende de que el TPH se haya realizado antes de que existan daños irreversibles en órganos como el páncreas o el tiroides. Por ello es muy importante la precocidad en el TPH, aunque lleve un riesgo inherente.

En general el pronóstico de los IPEX es malo y muchos mueren antes de los 2 años de edad. Las mutaciones que permiten la formación de una pequeña proporción de mRNA de tamaño correcto, como las mutaciones de *splicing* o de la poliadenilación, dan lugar a un fenotipo más leve de la enfermedad, aunque sin TPH acaban muriendo antes de los 10 años.

10.- Enfermedad Granulomatosa Crónica

La Enfermedad Granulomatosa Crónica (CGD) es una inmunodeficiencia primaria que afecta a 1 de cada 250.000 individuos. Está causada por un defecto en la cadena respiratoria implicada en la destrucción de bacterias y hongos fagocitados por las células mieloides (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos) (Holmes, 1967). Esta cadena respiratoria convierte el oxígeno molecular (O_2) en el radical superóxido (O_2^-), el cual es transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) y radical hidroxilo (OH^-) (Babior, 1973). Estos derivados del oxígeno juegan un papel crítico en la destrucción de las bacterias y hongos fagocitados (Sbarra, 1959).

Como resultado del fallo en esta respiración oxidativa, la mayoría de los pacientes con CGD sufren infecciones severas recurrentes. Las más comunes son neumonías, linfadenitis, abscesos cutáneos y hepáticos, osteomielitis y septicemias. Estas infecciones suelen aparecer durante el primer año de vida y son causadas principalmente por *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus sp*, bacterias entéricas gram negativas, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas cepacia*. Además, los pacientes con CGD tienen granulomas que pueden llegar a ser lo suficientemente grandes para obstruir esófago, estómago, sistema biliar, uréteres o incluso vejiga urinaria.

A pesar de que todos los pacientes con CGD comparten la alteración en la respiración oxidativa, el defecto molecular responsable varía. La respiración oxidativa está catalizada por el complejo enzimático denominado NADPH oxidasa que consta de 5 subunidades designadas como *phox*, por *phagocyte oxidase* (Figura I.22):

- p22^{phox} y gp91^{phox}, que son las subunidades α y β del citocromo b₅₅₈.
- p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox}, que forman el componente citosólico.

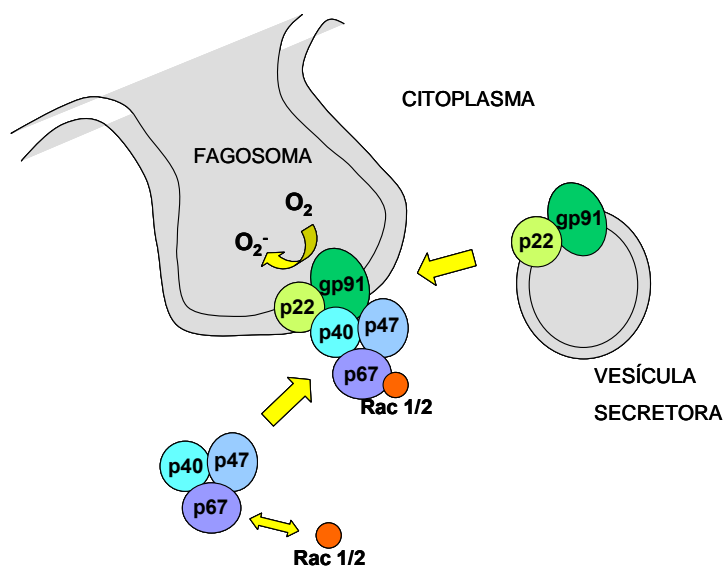


Figura I.22. Esquema de los componentes de la NADPH oxidasa.

Cuando la célula mieloides es estimulada, el componente citosólico se une al citocromo b₅₅₈ que está anclado en la membrana de los fagosomas, dando lugar a la forma activa del complejo enzimático NADPH oxidasa.

La CGD está causada por alteraciones en estos componentes. Las mutaciones en el gen *CYBB* que codifica la proteína gp91^{phox} son responsables de la forma ligada al sexo (X-CGD; MIM: 306400) que afecta a un 70% del total de pacientes con CGD, la mayoría varones. El 30% restante tienen una herencia autosómica recesiva y afecta por igual a varones y mujeres. Son causadas por mutaciones en los genes *CYBA*, que codifica p22^{phox} (MIM: 233690), *NCF1*, que lo hace para p47^{phox} (MIM: 23370), y *NCF2*, para p67^{phox} (MIM: 233710). Recientemente, se ha descrito un paciente con CGD debido a mutaciones en p40^{phox} (gen *NCF4*) (Matute, 2009).

Existen síndromes similares a la CGD que están causados por defectos en el mecanismo de activación de la NADPH oxidasa (Deficiencia en *Rac2*; MIM: 608203) o por una carencia en el aporte de sustrato para la oxidasa (Deficiencia en Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa, *G6PD*; MIM: 305900) que deben considerarse en el diagnóstico diferencial.

10.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de la CGD

Teniendo en cuenta el papel esencial que tienen los productos generados en la respiración oxidativa en la defensa del huésped, no es de extrañar que los pacientes con CGD tengan una gran variedad de infecciones bacterianas y fúngicas de carácter recurrente. La mayoría ocurren en órganos que están en contacto con el exterior: sistema respiratorio, tracto gastrointestinal y piel, así como los nódulos linfáticos que drenan estas estructuras. Las infecciones pueden extenderse afectando a otros órganos como hígado, huesos, riñones y cerebro. En dos tercios partes de los pacientes con CGD los primeros síntomas aparecen en el primer año de vida en forma de infecciones, dermatitis y complicaciones gastrointestinales, como vómitos causados por obstrucción del antro gástrico debido a los granulomas o diarrea sanguinolenta intermitente por colitis (Johnston, 1977). La clínica es muy variable y puede haber confusión con estenosis pilórica, alergia alimentaria o anemia deficiente en hierro. En general, los niños con X-CGD refieren una sintomatología más grave y anterior en el tiempo respecto a los pacientes con formas autosómicas recesivas de la enfermedad, especialmente la deficiencia en p47^{phox} (Winkelstein, 2000). En un pequeño grupo de pacientes el diagnóstico se hace durante la adolescencia debido a la menor gravedad de los síntomas (Liese, 1996).

Los patógenos más frecuentes en estos pacientes son *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus sp* y bacterias entéricas gram negativas como *Serratia marcescens*, varias *Salmonellas sp* y *Burkholderia cepacia*. La infección más típica de la CGD es la neumonía, mayoritariamente causada por *S. aureus*, *Aspergillus sp*, *B. cepacia* y bacterias entéricas gram negativas. Abscesos cutáneos y linfadenitis forman el siguiente grupo de infecciones más frecuentes y son típicamente causadas por *S. aureus* y microorganismos gram negativos como *B. cepacia* y *S. marcescens*. Los abscesos hepáticos son también bastante comunes y el responsable suele ser *S. aureus*. La osteomielitis es otra infección importante en CGD y puede derivarse de la expansión hematológica del microorganismo (*S. aureus*, *Salmonella sp*, *S. marcescens*) o de la invasión contigua del hueso que se da en la neumonía causada por *Aspergillus* cuando se expanden a los cuerpos vertebrales. También hay que destacar los abscesos perirectales.

Las reacciones crónicas de las células inflamatorias forman los granulomas típicos de la enfermedad. La localización del granuloma determinará la sintomatología: vómitos, disfagia, disuria, hidronefrosis. Otra manifestación de la inflamación crónica en la CGD es una forma de enfermedad inflamatoria intestinal que se parece a la Enfermedad de Crohn y que afecta a un 10% de estos pacientes.

Los niños con CGD suelen tener problemas en el desarrollo físico, especialmente los de X-CGD. Además, son típicamente anémicos (8-10 g/dL) con eritrocitos microcíticos. Ambos parámetros son debidos al carácter crónico de la enfermedad.

Los portadores de CGD suelen ser asintomáticos. La excepción son aquellas mujeres portadoras de X-CGD que tienen menos de un 10% de sus células mieloides con el cromosoma nativo activado y por tanto, con la función oxidativa conservada (Mills, 1980).

10.2.- Complejo enzimático NADPH oxidasa

El complejo NADPH oxidasa está formado por una subunidad catalítica que siempre está unida a la membrana de los fagosomas y por una serie de componentes reguladores situados en el citoplasma cuando la célula está en reposo. Estos elementos reguladores se translocarán a la membrana tras la activación celular y se unirán a la subunidad catalítica para dar lugar a la forma activa del complejo enzimático (Figura I.22).

El componente de membrana está formado por la glicoproteína gp91^{phox} y la proteína p22^{phox}. Ambas son transmembrana y juntas forman el citocromo b₅₅₈ (Huang, 1995).

Los componentes citosólicos p47^{phox} y p67^{phox} tienen dominios de interacción con otras proteínas como las GTPasas pequeñas Rac1 y Rac2 (Koga, 1999). El otro componente llamado p40^{phox} parece estar implicado en la estabilización del complejo p47^{phox}/p67^{phox} en las células en reposo y en el reclutamiento de dicho complejo durante la activación del complejo oxidasa (Fuchs, 1995).

Los compuestos reactivos del oxígeno generados gracias a la actividad NADPH oxidasa (O₂⁻, H₂O₂, HOCl⁻ y OH⁻) son los principales agentes bactericidas de las células mieloides. La formación de los granulomas en los pacientes con CGD puede ser debida al incremento en la actividad proinflamatoria y a un defecto en la apoptosis de los neutrófilos. Este hecho sería una consecuencia de la alteración en el perfil de expresión génica, ya que se sabe que existen genes cuya expresión está regulada por las especies reactivas del oxígeno que son generadas, entre otros, por el complejo NADPH oxidasa. Además, la disminución en la producción de mediadores antiinflamatorios por los neutrófilos y macrófagos de los pacientes CGD durante la fagocitosis de bacterias, hongos o células apoptóticas podría contribuir a la persistencia de la inflamación en estos pacientes.

10.3.- Bases moleculares de la CGD

La deficiencia en NADPH oxidasa puede ser el resultado de diferentes defectos moleculares. En primer lugar, puede haber una afectación de cualquiera de los componentes de la enzima, por ejemplo mutaciones en los genes que codifican gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} o p40^{phox}. La alteración en estos cinco genes explica la gran mayoría de los casos de CGD. De ellos, el 70% son debidos a mutaciones en gp91^{phox} y el 25% a defectos en p47^{phox}. Las alteraciones en p22^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox} son muy poco frecuentes. Además, existen defectos en los procesos posteriores a la activación de la NADPH oxidasa, concretamente ha sido descrito un paciente con una mutación en Rac2 que tiene una sintomatología parecida a CGD en combinación con defectos en la quimiotaxis y la degranulación (Ambruso, 2000); o en procesos anteriores, como por ejemplo la deficiencia en G6PD que impide la síntesis de NADPH, el sustrato de la reacción, y que provoca una forma leve de CGD.

El gen *CYBB* que codifica gp91^{phox} tiene 13 exones repartidos en 33,45 Kb (Figura I.23). Se transcribe en un RNA mensajero de 4.324 bp que se traduce en una proteína de 570 aminoácidos y 91 KDa de peso molecular. Está localizado en el cromosoma X, en Xp21.1. La proteína gp91^{phox} tiene en su extremo N-terminal 6 dominios transmembrana que incluyen 3 sitios de N-glicosilación. En el tercer y quinto dominio se sitúan 2 grupos hemo donde se une el hierro (Wallach, 1997). La parte C-terminal es hidrofílica y contiene un grupo FAD y el dominio de unión a NADPH.

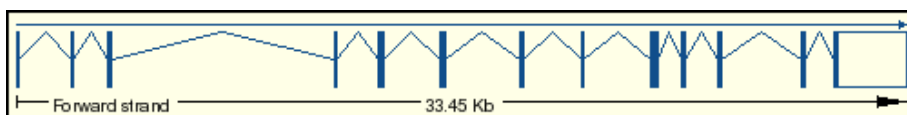


Figura I.23. Esquema del gen *CYBB*, que codifica gp91^{phox} (www.ensembl.org).

El gen *CYBA* que codifica p22^{phox} mide 7,76 Kb y tiene 6 exones (Figura I.24). Se transcribe en un mRNA de 687 bp que se traduce en una proteína de 195 aminoácidos de 22 KDa de peso molecular. Se halla en el cromosoma 16, en 16q24. La proteína p22^{phox} en su extremo N-terminal contiene hélices hidrofóbicas que se cree que pueden ser dominios transmembrana. El extremo C-terminal es la parte hidrofílica de la molécula.

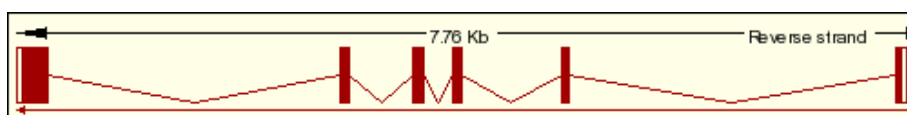


Figura I.24. Esquema del gen *CYBA*, que codifica p22^{phox} (www.ensembl.org).

El gen *NCF1* que codifica p47^{phox} se extiende a lo largo de 15,35 Kb que contienen 11 exones (Figura I.25). Se transcribe en un RNA mensajero de 1.396 bp que se traduce en una proteína de 390 aminoácidos cuyo peso molecular es 47 KDa. Lo encontramos en el cromosoma 7, en 7q11.23. La proteína p47^{phox} tiene 2 dominios SH3 y una región rica en prolina implicados en la interacción con p67^{phox} y el citocromo b₅₅₈ (de Mendez, 1994). Además, incluye la región PX (homóloga a *phox*).

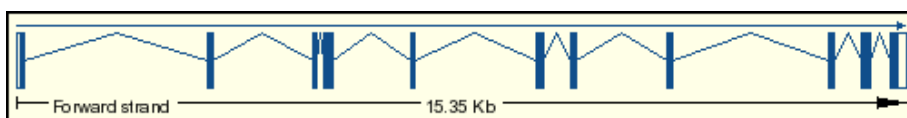


Figura I.25. Esquema del gen *NCF1*, que codifica p47^{phox} (www.ensembl.org).

El gen *NCF2* que codifica p67^{phox} mide 35,31 Kb y tiene 16 exones (Figura I.26). Se transcribe en un mRNA de 2.203 bp que se traduce en una proteína de 526 aminoácidos que pesa 67 KDa. Está localizado en el cromosoma 1, en 1q25. Además de 2 dominios SH3 y una región rica en prolina, la proteína p67^{phox} contiene 4 regiones tetratricopeptídicas en el extremo C-terminal que le permiten interactuar con las GTPasa pequeñas Rac1 y Rac2 (Nisimoto, 1997).

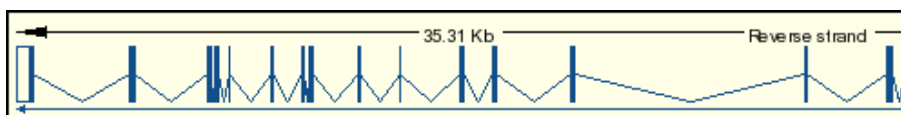


Figura I.26. Esquema del gen *NCF2*, que codifica p67^{phox} (www.ensembl.org).

El gen *NCF4* que codifica p40^{phox} tiene 10 exones que se expanden a lo largo de 17 Kb (Figura I.27). Se transcribe en un RNA mensajero de 1.396 bp que se traduce en una proteína de 339 residuos y 40 KDa de peso molecular. Está localizado en el cromosoma 22, en 22q12. Contiene un dominio SH3 y uno PX y regiones de unión a p67^{phox}.

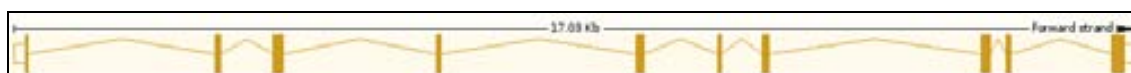


Figura I.27. Esquema del gen *NCF4*, que codifica p40^{phox} (www.ensembl.org).

10.4.- Análisis mutacional de los genes *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* y *NCF4*

La CGD es una enfermedad muy heterogénea, no sólo clínicamente si no también a nivel molecular, incluso dentro del mismo subgrupo. Existen todo tipo de alteraciones, desde grandes deleciones hasta mutaciones puntuales. La diversidad de estas mutaciones junto con los múltiples genes implicados explica la heterogeneidad clínica de esta enfermedad.

Enfermedad Granulomatosa Crónica ligada al X (X-CGD)

En la forma ligada al X se han descrito todo tipo de mutaciones en el gen *CYBB*, a excepción de la conversión génica. Existen bases de datos con las mutaciones reportadas disponibles en internet, como por ejemplo <http://www.uta.fi/imt/bioinfo/CYBBbase>. El 31% de estas mutaciones son deleciones o inserciones. Las deleciones pueden abarcar de 1 a 5.000.000 de nucleótidos, afectando incluso a genes vecinos. De ahí que algunos pacientes con X-CGD sufran otros síndromes como la Distrofia Muscular de Duchenne, Retinitis Pigmentosa o el síndrome de McLeod. Las inserciones, sin embargo, suelen ser de pequeño tamaño. Las mutaciones puntuales representan el 69% restante y agrupan a alteraciones que afectan al *splicing* (19%), mutaciones *missense*, con cambio de aminoácido (25%) y mutaciones *nonsense*, con aparición de un codón STOP (25%) (Vihinen, 2001). El porcentaje de mutaciones de *splicing* es similar al encontrado en otras enfermedades, pero hay que tener en cuenta que, al igual que sucede en ellas, está infravalorado ya que en la mitad de los casos sólo se estudia el DNA genómico. En los pacientes con X-CGD la mayoría de las mutaciones *nonsense* aparecen en secuencias CpG, no encontrándose ninguna forma de gp91^{phox} truncada en sus células mieloides. Las mutaciones *missense* pueden causar que gp91^{phox} sea más o menos inestable impidiendo su unión a p22^{phox}. En ocasiones el complejo se une correctamente pero no es funcional. El estudio de estas mutaciones puntuales ha permitido conocer el papel de cada uno de los dominios de la proteína gp91^{phox}. También se han descrito alteraciones en el promotor de *CYBB* responsables de la enfermedad. La mayoría de las mutaciones causantes de X-CGD son únicas en cada familia afectada de manera que sólo se han reportado 4 *hot spots* mutacionales (Heyworth, 2001).

Enfermedad Granulomatosa Crónica Autosómica Recesiva (AR-CGD)

Debido a su menor incidencia, el número de mutaciones caracterizadas responsables de AR-CGD es mucho menor que el de X-CGD. La forma de AR-CGD más frecuente es la alteración en p47^{phox}. La gran mayoría de estos pacientes tienen en homocigosis una delección del dinucleótido GT del tándem GTGT correspondiente a las 4 primeras bases del exón 2 del gen *NCF1* (Gorlach, 1997). La delección GT está causada por la recombinación entre el gen *NCF1* y su pseudogen, cuya homología es superior al 99% pero con la delección GT al principio del exón 2, entre otras diferencias. Esta delección lleva a la aparición de un codón STOP prematuro. Es difícil identificar portadores de la delección GT puesto que los individuos normales son "heterocigotos" para esta delección al contener los pseudogenes. El resto de pacientes son heterocigotos compuestos para esta mutación o tienen otra mutación en homocigosis (<http://www.uta.fi/imt/bioinfo/NCF1base>). El espectro de mutaciones diferentes a la delección GT es tan diverso como en las otras CGD. Todas las mutaciones identificadas en el gen *NCF1* comportan la ausencia de p47^{phox}.

Las mutaciones en p22^{phox} causantes de AR-CGD son también muy variadas, incluyendo delecciones, inserciones, mutaciones de *splicing*, mutaciones *nonsense* y *missense* del gen *CYBA* (<http://www.uta.fi/imt/bioinfo/CYBAbase>). Sólo se ha descrito un *hot spot* mutacional, en el nucleótido 354. Los pacientes pueden ser homocigotos para la misma alteración genética o heterocigotos compuestos.

Las mutaciones en p67^{phox} son las menos frecuentes (<3%) y también abarcan un amplio espectro de variación (<http://www.uta.fi/imt/bioinfo/NCF2base>). Al igual que en el caso anterior, existen homocigotos para una mutación y heterocigotos compuestos. Al principio del intrón 4 existe un *hot spot* mutacional.

Sólo se ha descrito un caso con mutaciones en p40^{phox}. Se trata de un varón heterocigoto compuesto para una mutación con aparición de codón STOP prematuro y la mutación *missense* p.Arg105Gln en el dominio PX (Matute, 2009).

10.5.- Correlación fenotipo-genotipo en CGD

En general, la clínica de los pacientes deficientes en p22^{phox} y p67^{phox} es tan severa como la de los deficientes en gp91^{phox}. Por el contrario, la de los pacientes deficientes en p47^{phox} es mucho menos severa, probablemente debido a la formación residual de anión superóxido o peróxido de hidrógeno de los neutrófilos deficientes en p47^{phox} (Cross, 1994). Por otra parte, cabría esperar que aquellos pacientes con una función residual de gp91^{phox} tuvieran una clínica más benigna, aunque no siempre es así (Roos, 1992). Las mujeres portadoras de X-CGD pueden presentar manifestaciones clínicas de la enfermedad similares a la de los pacientes hemocigotos, aunque en general sólo suelen verse afectadas aquellas que tienen menos de un 10% de sus fagocitos con la capacidad oxidativa conservada (Roos, 1996). Se ha observado que polimorfismos en genes implicados en la respuesta antimicrobiana independiente de oxígeno juegan un papel importante en la clínica de cada uno de los pacientes (Clark, 2002; Foster, 1998). Estos genes modificadores podrían explicar la variabilidad de la infección en CGD.

10.6.- Diagnóstico de la CGD

El diagnóstico de CGD debe plantearse en pacientes con infecciones bacterianas y fúngicas de carácter recurrente. Como hemos visto anteriormente, la CGD está causada por una disfunción del complejo enzimático NADPH oxidasa de los fagocitos que impide generar ión superóxido y otras especies reactivas del oxígeno. Esta actividad enzimática se puede medir a través del consumo de oxígeno (mediante un electrodo), de la generación de superóxido (por la reducción del citocromo c o del nitroazul de tetrazolium, NBT) o por la producción de peróxido de hidrógeno (por oxidación del ácido homovalínico).

En la actualidad, el método más utilizado es el análisis mediante citometría de flujo, en el cual se usa la Dihidrorodamina 123 (DHR) como detector fluorescente de la producción de peróxido de hidrógeno. Este sistema combina la ventaja de la sensibilidad con la posibilidad de usar sangre total y por ello ha sustituido al tradicional NBT. Para confirmar el diagnóstico se debe encontrar el defecto genético responsable. En función de las características del caso clínico, el estudio se decantará hacia uno o varios de los genes implicados.

Aunque el diagnóstico prenatal podría llevarse a cabo analizando la capacidad oxidativa de los neutrófilos de la sangre fetal, lo más práctico es el análisis del DNA procedente de las células del líquido amniótico o las vellosidades coriónicas. Es un diagnóstico mucho más precoz y seguro en familias de riesgo una vez se haya identificado la mutación.

10.7.- Tratamiento y pronóstico de la CGD

La mayoría de los pacientes con CGD sobreviven hasta la edad adulta, en particular los deficientes en p47^{phox}. Para ello hay que minimizar el riesgo de infección. Los pilares del tratamiento de la CGD son la prevención de las infecciones con inmunizaciones (vacunas) y evitando ciertas fuentes de patógenos; el uso profiláctico de trimetoprim sulfametoxazol o dicloxacilina, para disminuir el número de infecciones bacterianas; la administración de IFN- γ recombinante humano como profiláctico; la utilización temprana y agresiva de antibióticos parenterales, incluso antes de saber el resultado del antibiograma; y el drenaje quirúrgico o resección de infecciones recalcitrantes.

De estos cinco elementos el más importante es la temprana intervención de las infecciones antes de que el sistema inmune del paciente se vea comprometido. Es muy importante mantener el tratamiento el tiempo suficiente para haber erradicado la infección, puesto que si llega a establecerse, incluso los antibióticos mejor seleccionados pueden ser inefectivos.

En los casos de mayor gravedad se recurre al trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). Es el único tratamiento curativo. Su éxito depende de la ausencia de infección en el paciente en el momento de la intervención y del acondicionamiento mieloablativo. La decisión de un TPH precoz aumenta la esperanza de vida de estos pacientes.

11.- Displasia Ectodérmica Anhidrótica con Inmunodeficiencia

Las principales características de la Displasia Ectodérmica Anhidrótica (EDA) son dimorfismo facial, hipo o anodontia con incisivos en forma cónica, piel seca con hipo o anhidrosis (por un defeco en las glándulas sudoríparas), e hipo o atricosis. Algunos pacientes sufren infecciones recurrentes del tracto respiratorio pero de carácter benigno (Clarke, 1987).

La Displasia Ectodérmica Anhidrótica con Inmunodeficiencia (EDA-ID) es una entidad independiente. Se trata de pacientes varones con fenotipos menos graves de EDA pero con infecciones severas a lo largo de toda su vida. Estas infecciones están causadas principalmente por bacterias piógenas como *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (Abinun, 1996), y están relacionadas con una deficiencia en la respuesta específica de anticuerpos.

En los últimos años se han llevado a cabo estudios que han permitido descubrir la base genética de estos síndromes. En EDA sin inmunodeficiencia se han reportado mutaciones en el gen que codifica la ectodisplasia A (EDA), una proteína transmembrana que es esencial para el desarrollo de los apéndices ectodérmicos. Mutaciones en este gen, denominado *EDA*, causan la forma ligada al X de esta enfermedad (X-EDA; MIM: 305100). Las formas de EDA autosómicas dominantes (MIM: 129490) y recesivas (MIM: 224900) están causadas por alteraciones en el gen *EDAR*, que codifica el receptor de EDA (EDAR) y en el gen *EDARADD*, que codifica la proteína dominio de muerte asociada a EDAR (EDARADD), respectivamente.

En el año 2000 se describió un paciente con EDA-ID procedente de una familia afectada por Incontinencia Pigmenti (IP; MIM: 308300) (Smahi, 2000). La IP es una genodermatosis que segrega con una herencia dominante ligada al X y que causa mortalidad prenatal en los varones, por lo que sólo están afectadas las mujeres. Está causada por mutaciones en el gen *IKBKG*, también denominado *NEMO*, que codifica para el modulador esencial de NF- κ B (NEMO). Este paciente con EDA-ID, al igual que otros descritos posteriormente, tenía mutaciones en NEMO que no suprimían totalmente su control sobre NF- κ B (Zonana, 2000). Las mutaciones hipomórficas en NEMO dan lugar a dos síndromes diferentes:

- Mutaciones *missense* (cambio de aminoácido) son responsables de EDA-ID (MIM: 300291).
- Mutaciones *nonsense* (aparición de un codón STOP) causan una clínica más severa con osteopetrosis y linfedema (EDA-ID-OL; MIM: 300301).

Posteriormente, se descubrió un paciente con signos de EDA-ID, donde la inmunidad comprometida era la de las células T. Se identificó una mutación en heterocigosis el gen *IKBA*, otra molécula implicada en la regulación de NF- κ B. Esta nueva EDA-ID (MIM: 612132) tiene una herencia autosómica dominante (Courtois, 2003).

11.1.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de EDA-ID/IP

Los pacientes con EDA-ID tienen las mismas manifestaciones de los otros pacientes con EDA pero menos severas: ausencia completa o parcial de glándulas sudoríparas, dentición anormal y crecimiento escaso del pelo. La inmunodeficiencia está caracterizada por infecciones frecuentes, disgammaglobulinemia con bajos niveles séricos de IgG y elevados de IgM y una respuesta de anticuerpos disminuida. Los pacientes con EDA-ID-OL presentan un fenotipo más severo que incluye osteopetrosis y linfedema (Doffinger, 2001). La osteopetrosis está causada por un defecto en la función de los osteoclastos que provoca un exceso de masa ósea y el linfedema por un desarrollo inadecuado de los vasos linfáticos.

Las infecciones severas y recurrentes de los pacientes con EDA-ID aparecen en la infancia y se desarrollan a lo largo de toda su vida: infecciones bacterianas del tracto respiratorio, piel y tejidos blandos, huesos y tracto gastrointestinal, así como meningitis y septicemias. Los patógenos causales suelen ser bacterias gram positivas (*S. pneumoniae*, *S. aureus*) seguidas de gram negativas (*Pseudomonas sp*, *Haemophilus influenzae*) y micobacterias. También se han descrito infecciones por *Pneumocystis jiroveci*, citomegalovirus y adenovirus, lo que sugiere una inmunodeficiencia más severa y combinada. Los 2 únicos pacientes descritos hasta el momento con EDA-ID-OL sufrieron infecciones por *Mycobacterium* que les causaron la muerte en el primer año de vida (Doffinger, 2001; Dupuis-Girod, 2002).

Muchos pacientes con EDA-ID tienen disgammaglobulinemia con bajos niveles de IgG (especialmente IgG₂), mientras que los de los otros isotipos son variables. Los niveles de IgA pueden ser elevados, probablemente por las infecciones respiratorias recurrentes. Algunos pacientes tienen elevados niveles de IgM en suero (hiper-IgM asociado a EDA-ID) (Zonana, 2000). Esto es debido a que, a pesar de que la interacción CD40-CD40L es correcta, las células B no pueden proliferar ni realizar el *switch* de las inmunoglobulinas normalmente por lo que se produce una gran cantidad de IgM para compensar la deficiencia en los otros isotipos. Sí que hay producción de IgE, lo que indica que esta vía es independiente de NEMO.

Otra alteración de los pacientes con EDA-ID es la deficiente respuesta de anticuerpos a antígenos polisacáridos y los bajos niveles de isohemaglutininas. Las células T proliferan normalmente frente a mitógenos y antígenos, pero muestran una respuesta celular extremadamente reducida a IL-1, IL-18, LPS y CD40.

A diferencia de la EDA-ID que sólo afecta a varones, el 97% de los afectados con IP son mujeres. El resto son varones con Klinefelter (XXY) o mosaicismos somáticos (Pacheco, 2006). Los afectados de IP tienen alteraciones muy variables en los tejidos de origen ectodérmico: piel, pelo, uñas, dientes, ojos y sistema nervioso central (SNC). Los signos prominentes de la piel son vesículas inflamatorias perinatales, verrugas papulosas, un patrón distintivo de hiperpigmentación y lesiones atróficas de la dermis que aparecen siguiendo las líneas de Blaschko. La lesión cutánea da lugar a áreas hipopigmentadas. Estas manifestaciones aparecen secuencialmente sin afectar a zonas previamente dañadas. Otras características dermatológicas son alopecia, cejas y pestañas escasas, pelo áspero y uñas con hiperqueratosis. El 70% de las pacientes con IP tiene anomalías en los dientes que se aprecian muy bien después del primer año de vida (Carney, 1976). A diferencia de los defectos en la piel, son permanentes y afectan tanto a los dientes de leche como a los definitivos. Puede darse una ausencia total o parcial (hipo- o anodontia) con malformaciones de los dientes en forma cónica y/o erupción tardía (Landy, 1993). La afectación de los ojos es asimétrica y pueden afectar o no a la retina. Las retinopatías, que aparecen en el primer año de vida, son causadas por hemorragias y pueden causar ceguera. Las alteraciones que no afectan a la retina son muy variadas (cataratas, estrabismo, nistagmo) y aparecen más tarde (Mayer, 2003). Las manifestaciones en el SNC van desde encefalopatías a retraso mental. Se ha descrito que estos pacientes pueden ser más susceptibles a infecciones bacterianas, especialmente en la piel.

El fenotipo de IP es el resultado de un mosaicismo genético debido a la inactivación del cromosoma X. En estas enfermas existe un sesgo progresivo hacia la inactivación del cromosoma X mutado en todas las células. Los leucocitos de sangre periférica muestran una inactivación totalmente sesgada (Parrish, 1996).

Sólo algunas de las madres de afectados de EDA-ID tienen características de EDA o IP y elevados niveles séricos de IgA; mientras que las madres de los dos niños descritos con EDA-ID-OL tienen fenotipo poco severo de IP.

11.2.- La vía NF- κ B en las EDA

Las mutaciones en la ectodisplasina A causan la forma ligada al X de EDA. Esta proteína es un miembro de la superfamilia de los TNF. Las formas autosómicas de EDA están causadas por alteraciones en los genes *EDAR* (receptor de EDA, miembro de la superfamilia de los receptores de TNF) y *EDARADD* (proteína dominio de muerte asociado a EDAR). EDA activa a EDAR que usa a EDARADD como puente en la activación de NF- κ B, proceso que es dependiente de NEMO, proteína alterada en EDA-ID e IP.

La activación de NF- κ B requiere la fosforilación de sus inhibidores como la kinasa IKB, que están constitutivamente unidos a NF- κ B impidiendo así su entrada a núcleo. La kinasa IKB está a su vez regulada por la kinasa IKK. IKK está formada por las subunidades IKK α , IKK β e IKK γ . IKK α e IKK β tienen una función catalítica y fosforilaran a IKB. IKK γ , también llamada NEMO, es la subunidad reguladora de IKK. Cuando NEMO es estimulada a través de EDARADD o de otras proteínas, permite que IKK fosforile a IKB, provocando su degradación. De esta manera, NF- κ B entra en el núcleo y puede regular la expresión de genes implicados en la inhibición de la apoptosis, la defensa del huésped, la adhesión celular y las respuestas inflamatorias y al estrés (Smahi, 2002) (Figura I.28).

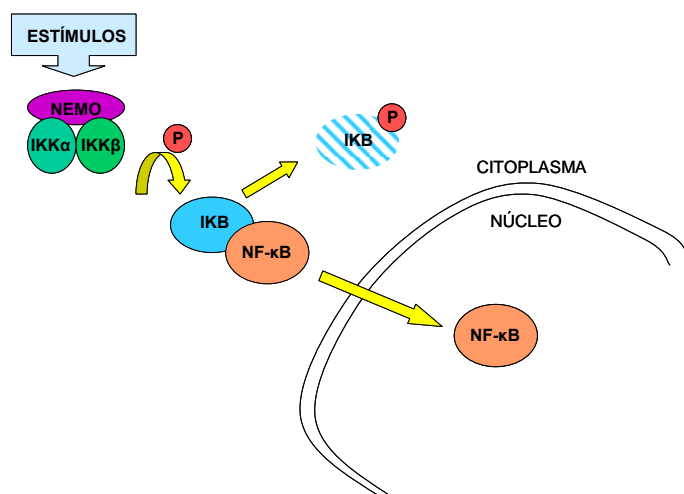


Figura I.28. Esquema simplificado sobre la activación de NF- κ B.

NEMO es necesario para la activación de IKK en respuesta a estímulos intra y extracelulares y la consecuente liberación de NF- κ B (Rothwarf, 1998). NEMO es esencial para la función de NF- κ B y su ausencia da lugar a su completa inhibición.

Las manifestaciones clínicas e inmunológicas de los pacientes con EDA-ID e IP se justifican por alteraciones en estas vías, incluida la señalización a través de EDA, la supervivencia de las células del endotelio, la arquitectura capilar o la diferenciación y función de los osteoclastos. El grado de afectación en función de la mutación determinará el fenotipo final, por ejemplo el EDA-ID-OL.

11.3.- Bases moleculares de EDA-ID/IP

La EDA-ID y la IP están causadas por alteraciones en el gen *NEMO*. Mutaciones en este gen también pueden causar Inmunodeficiencia sin manifestaciones de EDA (Niehues, 2004; Orange, 2004).

El gen *NEMO* tiene 10 exones que se extienden a lo largo de 17,41 Kb (Figura I.29). Se transcribe en un RNA mensajero de 2.102 bp que se traduce en una proteína de 419 aminoácidos y 48 KDa de peso molecular. Está localizado en el cromosoma X, en Xq28 (Smahi, 1994).

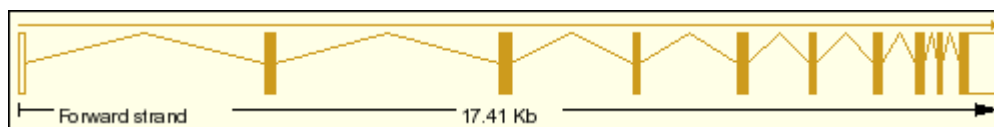


Figura I.29. Esquema del gen *NEMO* (www.ensembl.org).

La proteína NEMO es la subunidad reguladora de la kinasa IKK y carece de capacidad catalítica. Está compuesta por muchos dominios con estructura *coiled-coil*. La región N-terminal es la encargada de interaccionar con las subunidades catalíticas de IKK, mientras que el dedo de Zinc que posee en el extremo C-terminal es necesario para la activación de NF- κ B a través de citoquinas y LPS.

11.4.- Análisis mutacional del gen *NEMO*

El Consorcio Internacional sobre Incontinencia Pigmenti celebrado en el año 2000 demostró que las mutaciones en *NEMO* son responsables de la IP. La alteración más común es un reordenamiento genómico que provoca una delección intragénica desde el exón 4 al 10. Esta mutación está presente en un 85% de los afectados de IP (Smahi, 2000). En un 70% de los casos espontáneos se produce en la línea germinal paterna, indicando que tiene lugar por un mal alineamiento intracromosómico durante la meiosis. El resto de mutaciones están distribuidas a lo largo de todo el gen (Courtois, 2006).

Las mutaciones hipomórficas del gen *NEMO* causan EDA-ID o EDA-ID-OL y están localizadas principalmente en el exón 10, afectando al extremo C terminal de la proteína. Al igual que en otras IDPs existen bases de datos de mutaciones disponibles en internet, como por ejemplo <http://bioinf.uta.fi/IKBKGBase>. En pacientes con EDA-ID se han descrito inserciones de una base en el exón 10 que provocan un cambio en la pauta de lectura con la consecuente aparición de un codón STOP prematuro (1167-1168insN y 1218insA), mutaciones *nonsense* (p.Glu391STOP) y mutaciones *missense* también en el exón 10, afectando en su mayoría a la Cisteína 417, un residuo clave en el dominio de dedos de Zinc del extremo C terminal. Los 2 pacientes descritos con EDA-ID-OL tienen la mutación p.STOP420Trp, que provoca la desaparición del codón STOP generando una proteína de 27 aminoácidos más, que es inestable.

En el año 2005 se describió una paciente con EDA-ID debido a una mutación en NEMO. El estudio de la inactivación del cromosoma X en sangre periférica reveló un sesgo progresivo hasta que la inmunodeficiencia desapareció. Se trata del primer caso documentado *in vivo* en el que la selección actúa contra el cromosoma X mutado en una enfermedad ligada al sexo (Martinez-Pomar, 2005).

En los últimos años se han descrito pacientes inmunodeficientes con mutaciones en *NEMO* que no presentaban ningún signo de EDA (Niehues, 2004). Todos ellos padecían infecciones severas recurrentes por micobacterias.

11.5.- Diagnóstico de EDA-ID e IP

Los pacientes con EDA-ID tienen infecciones severas y recurrentes a lo largo de toda su vida y están causadas principalmente por bacterias encapsuladas. En los pacientes con EDA-ID-OL suelen ser micobacterias. Las manifestaciones clínicas de EDA en estos pacientes son menos obvias que en los pacientes con EDA sin inmunodeficiencia.

Los pacientes con IP tienen manifestaciones clínicas muy evidentes desde el nacimiento. El diagnóstico de esta enfermedad se basa en la evolución de las alteraciones en la piel junto con las anomalías en la dentición, ojos o sistema nervioso central. Hay que tener en cuenta el diagnóstico diferencial con la Hipomelanosis de Ito (MIM: 300337), que tiene una herencia esporádica y se desconoce su base genética.

El diagnóstico definitivo de todas estas enfermedades se realiza analizando la secuencia del gen *NEMO*. Las mujeres portadoras de EDA-ID y EDA-ID-OL pueden tener algunas características de EDA o IP. La inactivación del cromosoma X en estas mujeres está ligeramente sesgada, lo que sugiere que las mutaciones hipomórficas en *NEMO* no causan muerte celular.

El diagnóstico prenatal debe basarse en el estudio del gen *NEMO* a partir de DNA de vellosidades coriónicas, puesto que una selección de sexo no descartaría la presencia de algunos rasgos de la enfermedad.

11.6.- Tratamiento y pronóstico de EDA-ID e IP

La morbilidad y mortalidad de EDA-ID y EDA-ID-OL son muy elevadas. El tratamiento consiste en la administración de inmunoglobulinas intravenosas para evitar infecciones. No obstante, no siempre es protectoro y debe combinarse con una profilaxis antibiótica individualizada para cada paciente, con especial atención a las infecciones por micobacterias.

El tratamiento en la IP es sintomatológico: hay que prevenir la ulceración en las lesiones de la piel, tratar las alteraciones en los ojos para evitar el daño ocular y la pérdida visual. También es necesario un examen neurológico completo (Bruckner, 2004).

12.- Deficiencia en Properdina

El sistema del complemento está formado por una serie de proteínas séricas cruciales en la defensa del huésped y en la inflamación. El complemento también tiene un papel importante en el aclaramiento y procesamiento de los inmunocomplejos (Schifferli, 1986).

El primer paciente con una deficiencia de complemento determinada genéticamente fue descrito en 1960 (Silverstein, 1960). Desde entonces se han descrito deficiencias de casi todos los componentes del sistema del complemento.

12.1.- El sistema del complemento

El complemento es especialmente importante para la respuesta inmunitaria durante las primeras horas de la infección y para contener dicha infección en el lugar inicial. Si existe diseminación también contribuye al aclaramiento de los microorganismos del torrente circulatorio. Existen al menos tres vías por las cuales se activa el complemento: la clásica, la alternativa y la de las lectinas (Figura I.30).

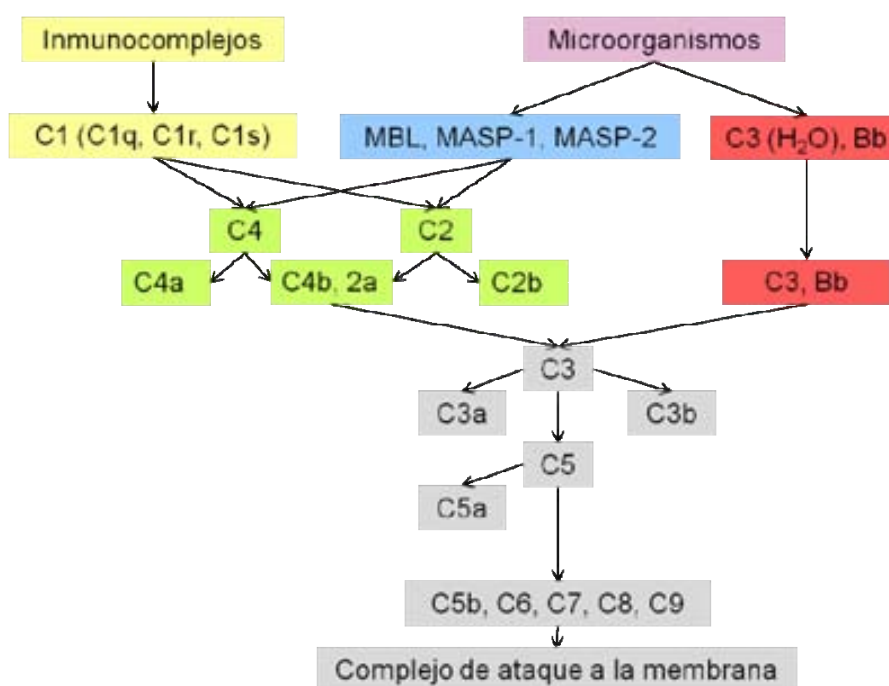


Figura I.30. Esquema de las 3 vías de activación del complemento: la clásica (en amarillo), la alternativa (en rojo) y la de las lectinas (en azul).

La activación de la vía clásica se inicia por complejos antígeno-anticuerpo. La unión del anticuerpo (IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgM) con el antígeno forma un inmunocomplejo que se une y activa al primer componente de la vía (C1), que está formado por C1q, C1r y C1s. C1q es el que se une a la molécula pesada de la inmunoglobulina activando a C1r y éste a C1s. C1s activado activa a C4 formándose C4a y C4b. C4b se une covalentemente a la inmunoglobulina del inmunocomplejo o a la superficie celular donde esté el inmunocomplejo, como por ejemplo un microorganismo. En paralelo, C1s también activa a C2, dando lugar a C2a y C2b. C2a se une a C4b creando un complejo (C4b, 2a) denominado convertasa de C3 de la vía clásica, porque es

capaz de activar a C3 e iniciar el ensamblaje de los componentes terminales (C5-C9) para formar el complejo de ataque a la membrana (MAC). Una activación incontrolada de esta vía da lugar a una actividad exacerbada de C3 y de los componentes terminales, que provocaría daños en el huésped. Por ello, existen elementos reguladores de la vía, como el inhibidor de la C1 esterasa (C1INH), que inhibe tanto a C1r como a C1s; el factor I, que inhibe a C4b; o el factor acelerante de decaimiento (DAF) que promueve la disociación de C2a del complejo C4b, 2a.

La activación de la vía alternativa puede darse independientemente de la participación de los anticuerpos. El factor C3 se hidroliza de forma espontánea, pudiéndose de esta manera unirse al factor B. Esta unión permite al factor D escindir el factor B en 2 fragmentos: el mayor de ellos, Bb, se une covalentemente a C3 provocando la hidrólisis de C3 en C3a y C3b. C3b, Bb es la convertasa de C3 de la vía alternativa y tiene la capacidad de generar C3b que irá uniéndose a las superficies celulares (opsonina) y a más factor B que el factor D transformará en Bb y de esta manera se irá amplificando la cascada. Los factores que modulan la actividad de la vía alternativa son la properdina, que estabiliza la unión de Bb a C3b; el factor H, que compite con el factor B por la unión a C3b para así desplazar a Bb del complejo enzimático; y el factor I, que inactiva el C3b unido a la célula por proteólisis dando lugar a iC3b, molécula incapaz de unirse a C3b, Bb.

La vía de las lectinas se inicia con la lectina de unión a manosas (*mannose binding lectin*, MBL). Esta proteína tiene la capacidad de unirse a diferentes microorganismos y de activar C3 por la vía clásica sin requerimiento ni de C1q ni de inmunoglobulina. MBL interacciona con MASP-1 y MASP-2, moléculas homólogas a C1r y C1s, que pueden cortar C4 y C2 generando C4b,2a, es decir, la convertasa de C3 de la vía clásica.

Como ya hemos descrito anteriormente, la hidrólisis de C3 da lugar a C3a y C3b, que se une covalentemente a inmunocomplejos y superficies celulares. C3b, además de opsonizar, se combina con sus convertasas para activar a C5, dando lugar a C5a y C5b. C5a es una anafilotoxina y C5b se unirá inmediatamente a C6 para iniciar la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), un complejo multimolecular de C5a, C6, C7, C8 y C9 que posee actividad citolítica. La formación del MAC está regulada por el factor de restricción homólogo (HRF), también conocido como proteína de unión a C8 (C8bp), que es una proteína de membrana integral que está en células de sangre periférica para impedir la formación e inserción del MAC; y por HRF20 o CD59, que inhibe el desplegamiento de C9 necesario para la inserción en membrana.

12.2.- Manifestaciones clínicas e inmunológicas de las deficiencias de complemento

La expresión clínica de las deficiencias de complemento determinadas genéticamente es variable y depende del papel del componente deficiente en la defensa normal del huésped y en la inflamación. Estos pacientes pueden tener una susceptibilidad incrementada a infecciones bacterianas, enfermedades reumáticas, angiodema o ser asintomáticos.

Los pacientes con una deficiencia en C3 tienen una marcada susceptibilidad a infecciones por bacterias cuya primera defensa del huésped es la opsonización, como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* o *Haemophilus influenzae*. Los pacientes con una deficiencia en C1, C2 o C4 también tienen susceptibilidad a estas mismas bacterias

encapsuladas, ya que estos componentes son necesarios para la activación de la vía clásica, pero en menor grado, ya que mantienen la vía alternativa intacta. Los pacientes con deficiencias en C5-C9 tienen una susceptibilidad incrementada a infecciones por bacterias gram negativas, como *Neisseria meningitidis*, ya que estas bacterias son muy susceptibles a la acción del MAC. El tipo de infecciones más comunes en todos estos pacientes son bacteremias, meningitis e infecciones localizadas tipo sinusitis, otitis y neumonías.

Las manifestaciones reumáticas son más frecuentes en pacientes con defectos en los primeros componentes de la vía clásica (C1, C2 y C4), ya que el riesgo de desarrollarse se correlaciona con la incapacidad de estos pacientes para eliminar los inmunocomplejos. Existe gran variedad de enfermedades reumáticas, incluyendo Lupus Eritomatoso Sistémico, Dermatomiosistis, Esclerodermia, Vasculitis o Glomerulonefritis entre otras.

La deficiencia en el inhibidor C1 esterasa (C1INH) tiene manifestaciones clínicas muy diferentes al resto de deficiencias genéticas del complemento, consistentes en angioedemas. Los defectos en DAF y CD59 causan Hemoglobinuria paroxística nocturna.

Se han descrito deficiencias de todos los componentes solubles del complemento y de muchas de las proteínas reguladoras y de los receptores de membrana. La mayoría tienen una herencia autosómica recesiva, pero la deficiencia en el inhibidor de la C1 esterasa tiene una herencia autosómica dominante, y la deficiencia en properdina está ligada al X (MIM: 321060).

12.3.- Deficiencia en Properdina

El gen de la properdina (*CFP*) es el único gen del complemento localizado en el cromosoma X. Se extiende a lo largo de 5,75 Kb y está agrupado en 9 exones (Figura I.31). Se transcribe a un mRNA de 1.592 bp que se traduce a una proteína de 469 residuos y 53 KDa de peso molecular. Esta proteína contiene 6 unidades trombospondina y circula como un oligómero cíclico (Nolan, 1991).



Figura I.31. Esquema del gen *CFP*, que codifica la properdina (www.ensembl.org).

La properdina es un componente de los gránulos secundarios de los neutrófilos pero también es sintetizada por monocitos, hepatocitos y linfocitos T. Su función es estabilizar las enzimas de la vía alternativa que activan C3 y C5 (C3b, Bb).

El suero de todos los pacientes con deficiencia en properdina es incapaz de mantener la activación de C3 por la vía alternativa por lo que tienen una actividad bactericida reducida frente a meningococos. Por ello, aproximadamente la mitad de los pacientes con esta deficiencia padece enfermedades meningocócicas, demostrando la importancia de la vía alternativa en la defensa frente a *Neisseria sp.* Se han descrito casos aislados de Lupus Eritomatoso Sistémico y Lupus Discoide.

Se han identificado diferentes tipos de mutaciones en estos pacientes, que se correlacionan con los niveles de properdina en suero. Aquellos en los que no hay properdina tienen mutaciones con aparición de un codón STOP prematuro, mientras que en los que los niveles están reducidos existen mutaciones *missense* (cambio de aminoácido). También se han

descrito mutaciones *missense* que permiten una expresión normal de la proteína pero que impiden su funcionalidad, por ejemplo la interacción con C3b (Fredrikson, 1996).

12.4.- Diagnóstico y tratamiento de las deficiencias de complemento

Muchas de las deficiencias de la vía clásica (C1-C9) pueden ser detectadas mediante un ensayo hemolítico que comprueba la integridad funcional de la vía. El más tradicional y en el que se basan muchos de los métodos actuales es el CH50, que determina la capacidad de un suero problema para lisar hematíes de cordero sensibilizados. Una deficiencia de cualquiera de los componentes alterará el resultado de la prueba.

Las deficiencias de los componentes de la vía alternativa (factores B, H, I y properdina) pueden ser detectados usando un ensayo hemolítico que teste la actividad funcional de la vía alternativa (AH50). Uno de ellos es el que usa eritrocitos de conejo como potente activador de la vía alternativa. Los pacientes con deficiencia en los componentes de la vía alternativa, pero también con deficiencia en C5-C9, no podrán lisar los hematíes de conejo.

La identificación del componente específico que está alterado depende tanto de ensayos funcionales como inmunoquímicos. El diagnóstico final se establecerá por la identificación del defecto genético responsable.

12.5.- Tratamiento y pronóstico de las deficiencias de complemento

El tratamiento de las deficiencias de complemento se limita normalmente a cuidados de soporte y relacionados con las manifestaciones clínicas que son secundarias a la deficiencia específica. Para prevenir las infecciones y/o modificar el curso de las mismas se han probado dos estrategias. La primera consiste en vacunar contra los patógenos más comunes como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis*. Esta estrategia tiene limitaciones por lo que existe una segunda, que consiste en el uso de antibióticos profilácticos.

En cuanto a las enfermedades reumatológicas, se tratan de igual modo que en el resto de pacientes, con inmunosupresores y antiinflamatorios.

El tratamiento de la deficiencia del inhibidor de la C1 esterasa es diferente del resto y consiste en aminorar los síntomas y evitar las recurrencias del angiodema. En profilaxis a largo plazo se usan andrógenos atenuados y antifibrinolíticos. Sin embargo, el concentrado de C1 esterasa inhibidor es el agente más efectivo en el tratamiento de los ataques agudos (Agostoni, 1993).

II. Hipótesis de trabajo y Objetivos

Las Inmunodeficiencias Primarias (IDPs) son enfermedades congénitas que afectan a la funcionalidad y al desarrollo del sistema inmune. Aunque en los últimos años se ha incrementado el número de pacientes identificados con estas patologías, todavía quedan muchos por caracterizar genética y molecularmente de manera adecuada. Se encuentra ampliamente documentado que el retraso en su diagnóstico provoca complicaciones muy graves, a menudo irreversibles e incluso letales. Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que la correcta evaluación y el diagnóstico temprano de estos pacientes en centros especializados, y especialmente cuando se hace de manera integrada y coordinada, permite incrementar su calidad de vida, ya que aceleran y facilitan una mejora en su tratamiento y seguimiento, así como en la prevención de las complicaciones más severas. En la presente Tesis nos hemos querido centrar preferentemente en las Inmunodeficiencias Primarias ligadas al X dada su particular herencia y su elevada prevalencia dentro de los diferentes grupos sindrómicos en los que se encuadran las IDPs.

En consonancia con esta hipótesis, los objetivos de la presente Tesis son:

1. Evaluar inmunológicamente a pacientes con afectación del sistema inmune con el fin de establecer una firme sospecha diagnóstica de una Inmunodeficiencia Primaria concreta y, especialmente, en aquellas inmunodeficiencias en las que los datos sugieran una herencia ligada al X.
2. Llevar a cabo los estudios funcionales, moleculares y genéticos precisos que permitan alcanzar un diagnóstico definitivo en todos los casos.
3. Identificar nuevas mutaciones no descritas previamente y responsables de Inmunodeficiencias Primarias. Demostrar la relación causal entre dichas mutaciones, el defecto molecular y la patología encontrada.
4. Extender el estudio genético a familiares para identificar individuos portadores de la enfermedad, así como pacientes no diagnosticados. Proporcionar herramientas que faciliten un abordaje molecular que permita corregir dichas patologías: terapia génica, selección de embriones sanos, etc.
5. Establecer relaciones fenotipo-genotipo en base a los pacientes y a sus mutaciones aquí descritas.
6. Realizar estudios inmunológicos, tanto funcionales como genéticos o moleculares, con el fin de evaluar el seguimiento post-trasplante.

III. Material y Métodos

1.- Pacientes

Las muestras de pacientes inmunodeficientes procedían del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, del Hospital Infantil Sant Joan de Déu, del Hospital de la Vall d'Hebrón, del Hospital Universitario de Canarias y del Hospital Marqués de Valdecilla, así como de sus familiares. Los individuos control eran donantes sanos procedentes del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Las muestras de sangre total fueron obtenidas por punción venosa periférica. En casos seleccionados se trabajó con muestras de biopsias.

2.- Líneas celulares

Las células transformadas por el virus de Epstein Barr (EBV) de pacientes y controles fueron derivadas en el laboratorio de la Dra. Montse Planas. Estas células se cultivaron a 37°C, 5% CO₂ y humedad saturante en medio RPMI (*BioWhittaker, Noruega*) suplementado con un 10% de suero fetal bovino-FCS (*BioWhittaker, Noruega*), 1% glutamina (*Gibco BRL, USA*) y 1% penicilina/estreptomycin (*BioWhittaker, Noruega*) a una concentración de 400.000 células/mL.

En el estudio de la movilización de gránulos citotóxicos en células NK se utilizó la línea celular K562, una línea humana de origen mielóide (eritroleucemia) que carece de moléculas HLA de clase I. Esta línea se cultivó en las mismas condiciones anteriormente descritas.

3.- Determinación de los niveles de inmunoglobulinas

Los niveles de inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM se valoraron mediante la técnica de nefelometría, mientras que los de IgE total e IgE específica se hicieron por ELISA. Las muestras analizadas fueron sueros o plasmas separados por centrifugación a 1.600g durante 10 minutos de sangre coagulada (suero) o no coagulada (plasma).

Los niveles de IgG, IgM e IgA expresados en mg/dL se determinaron con el nefelómetro *IMMAGE (Beckman Coulter, USA)*. Los de IgE total e IgE específica, expresados en UI/mL, fueron obtenidos mediante el equipo *ImmunoCap 250 (Pharmacia Diagnostics, Suecia)*.

4.- Separación de poblaciones celulares de la sangre

4.1.- Obtención de leucocitos (*buffy coat*)

La obtención de leucocitos se realizó a partir de la centrifugación de sangre fresca no coagulada (heparina o EDTA) y la posterior lisis de hematies con solución ACK (NH₄Cl 150mM, KHCO₃ 1mM, EDTA bisódico 0,1mM, pH 7,2):

1. Centrifugar la sangre a 1.600g durante 5 minutos.
2. Transferir el *buffy coat* (capa de leucocitos) a un tubo nuevo.
3. Añadir 10mL de ACK. Incubar durante 10 minutos, agitando de vez en cuando.
4. Centrifugar a 700g durante 5 minutos.
5. Descartar el sobrenadante y lavar con 10mL de PBS (Tampón fosfato 10mM, NaCl 150mM, pH 7,2) centrifugando a 700g durante 5 minutos. Repetir el lavado.

6. Resuspender el *pellet* en 2-3mL de PBS y repartirlo en *ependorfs* previamente rotulados.
7. Centrifugar a 16.000g durante 3 minutos. Descartar el sobrenadante.
8. Congelar los *pellets* celulares en N₂ líquido y guardar a -80°C.

Esta técnica permitió tener *pellets* para extraer DNA, RNA o proteínas, según las necesidades.

4.2.- Obtención de células mononucleares

La obtención de células mononucleares de la sangre se realizó mediante un gradiente de ficoll (*Lymphoprep Ficoll-Hypaque; Nicomed, Pharma As, Norway*) obtenido por centrifugación:

1. Diluir a la mitad la sangre fresca no coagulada, preferiblemente heparinizada, en PBS.
2. Poner 4mL de ficoll atemperado en tubos de 15mL, dos tubos por muestra.
3. Añadir la sangre diluida gota a gota sobre el ficoll.
4. Centrifugar 20 minutos a 850g a temperatura ambiente (RT).
5. Recoger la capa de células que queda por encima del ficoll (células mononucleares) y transferir a un nuevo tubo de 15mL. Completar con 10mL de PBS estéril.
6. Centrifugar 10 minutos a 700g a 4°C.
7. Descartar el sobrenadante. Resuspender el *pellet* y añadir nuevamente PBS.
8. Coger una alícuota de la suspensión celular y realizar el conteo de células en cámara de *Neubauer (Hycor biomedical inc., USA)* mediante exclusión con azul de tripán (*Trypan Blue Solution 0.4%, Sigma, USA*).
9. Centrifugar el resto de la suspensión celular 5 minutos a 700g a 4°C.
10. Repetir los pasos 7 y 9.
11. Descartar el sobrenadante.
12. Resuspender el *pellet* de células en medio RPMI suplementado con un 10% de suero fetal bovino-FCS, 1% glutamina y 1% penicilina/estreptomicina a la concentración deseada.

Mediante esta técnica obtuvimos células mononucleares en cultivo necesarias para llevar a cabo la mayoría de pruebas funcionales. Para obtener *pellets* de células mononucleares para la extracción de RNA o proteínas, a partir del punto 11 se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Resuspender el *pellet* en 2-3mL de PBS y repartirlo en *ependorfs* identificados.
2. Centrifugar a 16.000g durante 3 minutos. Aspirar el sobrenadante.
3. Congelar los *pellets* celulares en N₂ líquido y guardar a -80°C.

4.3.- Obtención de neutrófilos

La obtención de neutrófilos a partir de sangre heparinizada se realizó mediante una sedimentación diferencial en un gradiente de dextrano y sacarosa:

1. Disolver 1,5g de dextrano (*Sigma, USA*) más 1,5g de sacarosa (*Merck, Alemania*) en un volumen final de 50mL de suero fisiológico (*Braun Medical, España*).
2. En un tubo de vidrio mezclar 4mL de sangre y 1mL de tampón dextrano-sacarosa.
3. Dejar sedimentar durante 1 hora.
4. Recuperar la fase superior del gradiente, de color blanquecino, que contiene los neutrófilos.
5. Lavar con 10 mL de suero fisiológico y centrifugar 5 minutos a 300g.
6. Descartar el sobrenadante y resuspender en suero fisiológico.

7. Coger una alicuota de suspensión celular y realizar el conteo en cámara de *Neubauer*.
8. Centrifugar el resto 5 minutos a 300g.
9. Descartar sobrenadante, resuspender el *pellet* en 2-3mL de suero fisiológico y repartirlo en *eppendorfs* previamente identificados.
10. Centrifugar a 16.000g durante 3 minutos. Aspirar el sobrenadante.
11. Congelar los *pellets* celulares en N₂ líquido y guardar a -80°C.

Esta técnica permitió obtener *pellets* de neutrófilos que sirvieron como base de algunos de los experimentos de *western blot*.

5.- Fenotipado celular mediante citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis multiparamétrico que permite medir características físicas y bioquímicas de células vivas. Para ello, el citómetro forma un flujo laminar y las células pasan individualmente delante de un láser. Cuando el láser incide sobre la célula los detectores miden el grado y la dirección de la luz desviada determinando así el tamaño, forma y estructura de la célula (gráfico FS:SS). Si estas células han sido previamente marcadas con una o más moléculas fluorescentes llamadas fluorocromos, el láser las excitará dando lugar a una fluorescencia que es cuantificable. Para el fenotipado celular mediante citometría de flujo utilizamos anticuerpos que reconocen las proteínas de interés y que, directa o indirectamente, tienen unido covalentemente un fluorocromo. El equipo utilizado fue el citómetro *Cytomics FC500* y el programa de análisis *CXP Software* ambos de *Beckman Coulter, USA*.

Esta técnica fue utilizada para analizar y caracterizar las poblaciones linfocitarias así como para evaluar la expresión de proteínas de interés, tanto de superficie como intracelulares.

5.1.- Análisis de la expresión de proteínas de superficie

Todas las proteínas de superficie analizadas disponían de anticuerpos monoclonales (MoAbs) marcados con un determinado fluorocromo. Por ese motivo, para determinar la expresión de las proteínas de superficie utilizamos la técnica de la inmunofluorescencia directa (IFD), que consiste en la incubación de la muestra con MoAbs ya marcados. El esquema general es el siguiente:

1. Poner en un tubo de citometría los MoAbs deseados. En la tabla III.1 están indicados los MoAbs utilizados, así como el fluorocromo que llevan unido y la cantidad requerida por cada 100µL de muestra.
2. Añadir 100µL de sangre o de células resuspendidas en PBS.
3. Incubar durante 15 minutos a RT en oscuridad.
4. A partir de aquí existen 2 posibilidades:
 - Si es sangre, lisar con el aparato *TQ-Prep* (*Beckman Coulter, USA*) que realiza una lisis osmótica de los hematíes (ácido fórmico al 1,2%), estabiliza el pH (Na₂CO₃ 50mM, NaCl 250 mM y Na₂SO₄ 200mM) y fija las células (paraformaldehído 1%) de manera automática.
 - Si son células aisladas, añadir 300µL de tampón *ISOTON® II* (*Beckman Coulter, USA*).
5. Analizar las muestras en el citómetro.

MoAbs – Fluorocromo	μL/100μL	Marca comercial
CD3-PC5	3μL	BECKMAN COULTER, USA
CD8-FITC	5μL	BECKMAN COULTER, USA
CD11a-FITC	5μL	IMMUNOTOOLS, Alemania
CD14-PC5	5μL	BD BIOSCIENCES, USA
CD15-FITC	5μL	IMMUNOTOOLS, Alemania
CD16-FITC	3μL	BD BIOSCIENCES, USA
CD18-FITC	5μL	IMMUNOTOOLS, Alemania
CD20-FITC	5μL	BECKMAN COULTER, USA
CD21-FITC	5μL	IMMUNOTOOLS, Alemania
CD22-FITC	5μL	IMMUNOTOOLS, Alemania
CD25-FITC	5μL	IMMUNOTOOLS, Alemania
CD40L-PE	10μL	IMMUNOTECH, Francia
CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5	5μL	BECKMAN COULTER, USA
CD45-FITC, CD56-PE, CD19-ECD, CD3-PC5	5μL	BECKMAN COULTER, USA
CD45RA-FITC	3μL	IMMUNOTOOLS, Alemania
CD45RO-PE	3μL	BD BIOSCIENCES, USA
CD69-FITC	5μL	BD BIOSCIENCES, USA
CD69-PE	5μL	IMMUNOTOOLS, Alemania
CD107a-PE	5μL	BD BIOSCIENCES, USA
HLA-DR-PE	10μL	IMMUNOTECH, Francia
IgM-PE	2μL	IMMUNOTECH, Francia
STAT5-P-PE	20μL	BD BIOSCIENCES, USA
TCR gamma-delta-FITC	5μL	IMMUNOTECH, Francia
W6/32-FITC	3μL	ABD SEROTEC, Alemania

Tabla III.1. Listado de anticuerpos monoclonales (MoAbs) usados en la citometría directa.

5.2.- Análisis de la expresión de proteínas intracelulares

Para determinar la expresión de proteínas intracelulares es necesario fijar y permeabilizar las células. Este proceso se realizó usando los tampones comerciales *Fixation Solution* y *Permeabilization Buffer* (eBiosciences, USA). Los anticuerpos que reconocen las proteínas intracelulares no suelen estar marcados, por lo que se debe incubar con un anticuerpo secundario que reconozca el primario y que sí que tenga un fluorocromo unido. Es por ello que esta técnica se denomina inmunofluorescencia indirecta (IFI). Su esquema general es:

1. Partir de 1.000.000 de células por tubo de citometría.
2. Lavar con 3mL de FACS (PBS, 1%FCS, 0,5% azida sódica) a 700g durante 5 minutos.
3. Aspirar sobrenadante y resuspender en 100µL de FACS + SCI (suero de conejo inactivado) al 10%.
4. Realizar el marcaje de superficie mediante MoAbs marcados. Incubar 15 minutos a RT oscuridad.
5. Lavar con FACS a 700g durante 5 minutos.
6. Dividir cada tubo en dos: el control negativo y el test (50µL cada uno)
7. Añadir 100µL de *Fixation Solution*. Vortear e incubar 20 minutos a RT oscuridad.
8. Añadir 1mL de *Permeabilization Buffer 1x* y centrifugar 5 minutos a 700g.
9. Descartar sobrenadante y repetir el lavado.
10. Añadir 50µL de *Permeabilization Buffer 1x* e incubar 5 minutos a RT.
11. Añadir el anticuerpo primario al test y un anticuerpo irrelevante al control negativo, ambos diluidos en FACS + SCI 10%.
12. Incubar 1 hora en hielo.
13. Añadir 1mL de *Permeabilization Buffer 1x* y centrifugar 5 minutos a 700g.
14. Repetir 2 veces más este lavado.
15. Añadir el anticuerpo secundario marcado con fluorocromo a todos los tubos.
16. Incubar 45 minutos en hielo y oscuridad.
17. Añadir 1mL de *Permeabilization Buffer 1x* y centrifugar 5 minutos a 700g.
18. Repetir el lavado.
19. Añadir 3mL de FACS y centrifugar a 700g durante 5 minutos.
20. Añadir 300 µL de tampón *ISOTON® II* al *pellet* resultante y analizar en el citómetro.

5.2.1.- Tinción intracelular indirecta de la proteína Btk

Para determinar la expresión de Btk partimos de células mononucleares obtenidas por gradiente de ficoll. El marcaje de superficie se realizó con anti CD14-PC5. El anticuerpo primario fue un anticuerpo murino que reconoce la proteína Btk humana (*BD Transduction laboratories, USA*) y se utilizó a una concentración final de 50µg/mL. El anticuerpo secundario utilizado fue el F(ab')₂ de cabra que reconoce las cadenas H y L de las IgG de ratón y está marcado con FITC (*Caltag, USA*). Se utilizó a una concentración final de 3,5µg/mL.

5.2.2.- Tinción intracelular indirecta de la proteína WASP

Para determinar la expresión de WASP partimos de linfocitos T estimulados durante 3 días con PHA + IL-2. El marcaje de superficie se realizó con anti CD3-PC5. El anticuerpo primario fue un anticuerpo murino que reconoce la proteína WASP humana (*BD Pharmingen, USA*) y se utilizó a una concentración final de 5µg/mL. El anticuerpo secundario utilizado fue un F(ab')₂

de cabra marcado con FITC que reconoce las cadenas H y L de las IgG de ratón (*Caltag, USA*). Se utilizó a una concentración final de 3,5µg/mL.

5.2.3.- Tinción intracelular indirecta de la proteína gp91^{phox}

Para determinar la expresión de gp91^{phox} partimos de células mononucleares obtenidas por gradiente de ficoll. El marcaje de superficie se realizó con anti CD14-PC5. El anticuerpo primario utilizado se denomina 7D5, que es un anticuerpo murino que reconoce la proteína gp91^{phox} humana (cedido por el Dr. Dirk Roos) y se utilizó a una concentración final de 1 en 50. El anticuerpo secundario utilizado fue el F(ab')₂ de cabra que reconoce las cadenas H y L de las IgG de ratón y está marcado con FITC (*Caltag, USA*). Se utilizó también a una concentración final de 3,5µg/mL.

6.- Análisis de la expresión proteica

Para el análisis de la expresión proteica utilizamos la técnica del *Western blot*. Previamente, obtuvimos los extractos celulares. El *Western blot* consistió en someter las proteínas a un campo eléctrico para separarlas en función de su peso molecular, transferirlas a una membrana de nitrocelulosa donde posteriormente se incubaron con los anticuerpos adecuados y revelarla con un sustrato quimioluminiscente.

6.1.- Obtención de extractos celulares

Para obtener los extractos celulares partimos de *pellets* celulares:

1. Por cada 10⁷ células utilizar 100µL de *Buffer de lisis* (Tris-HCl pH 7.6 10mM, NaCl 150mM, NP-40 1%, EDTA 1mM, Ortovanadato 1mM, PMSF 2mM, aprotinina 10µg/mL y una combinación de inhibidores de proteasas y fostasas, *Roche Diagnostics, Alemania*).
2. Resuspender bien y dejar en hielo durante 1 hora.
3. Centrifugar 10 minutos a 16.000g.
4. Pasar el sobrenadante a un *eppendorf* nuevo y agregar el volumen adecuado de tampón de muestra 4x (Tris 250mM pH 6.8, SDS 80mg/mL, Glicerol 35%, Azul de bromofenol 0.1%, 2-Mercaptoetanol 20%).
5. Calentar la muestra a 100°C durante 5 minutos.

6.2.- Western blot

La electroforesis se llevó a cabo en geles comerciales que contenían un gradiente de poliacrilamida del 4 al 12% (*NuPAGE 4-12% Bis Tris Gel, Invitrogen, USA*). Tras el montaje del gel en la cubeta *X-Cell II Mini-Cell (Novex, USA)*, se añadió el *Buffer MOPS* suplementado con antioxidante (*Invitrogen, USA*). Junto con las muestras se cargó el marcador de peso molecular pre-teñido *Seeblue® Plus2Pre.Stained Standard (Invitrogen, USA)* (Figura III.1). Cada gel se corrió a 20mA durante aproximadamente 3 horas.

Una vez corrido el gel, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (*Protran, Schleicher&Schuell, Alemania*) a una intensidad constante de 300mA durante 1 hora y 30 minutos a 4°C. El *Buffer de transferencia (Invitrogen, USA)* contenía un 10% de metanol y el antioxidante (*Invitrogen, USA*).

Antes de bloquear la membrana, la lavamos con TBS (Tris-HCl pH8 25mM, NaCl 125mM) durante 5 minutos. El bloqueo de la membrana se realizó con TBST (TBS con 0,1% de Tween 20, Merck, Alemania) con un 5% de leche desnatada (Nestlé, Suiza) durante 2 horas en agitación a RT. Posteriormente se realizaron 5 lavados de 10 minutos cada uno con TBST.

La incubación con el anticuerpo primario fue durante toda la noche en agitación a 4°C. La dilución se hizo en TBST al 3% de leche desnatada.

Antes de incubar con el anticuerpo secundario, se realizaron 5 lavados de 10 minutos cada uno con TBST. Los anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados con peroxidasa de rábano-HRP (Pierce, USA). Se diluyeron en TBST al 3% de leche desnatada y se incubaron durante 1 hora y 30 minutos en agitación a RT. Repetimos los 5 lavados de 10 minutos cada uno con TBST y procedimos al revelado de la membrana. Los sistemas utilizados fueron los kits comerciales *Super Signal® West Pico* y *Super Signal® West Dura* (Pierce, USA). Estos kits contienen un sustrato que al ser degradado por la HRP emite quimioluminiscencia que es detectada mediante una impresión radiográfica. Se escogieron estos sistemas por ser sensibles a nanogramos de proteína e incluso femtogramos en el caso del *Super Signal® West Dura*.

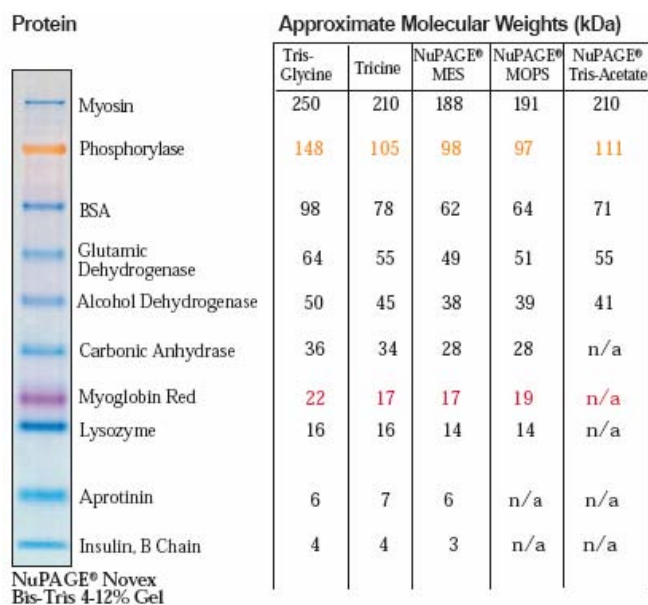


Figura III.1. Marcador de peso molecular *Seebblue® Plus2Pre.Stained Standard*.

6.3.- Stripping: reutilización de las membranas

Las membranas de nitrocelulosa reveladas pueden ser reutilizadas para detectar otras proteínas. Para ello se usó el reactivo comercial *Restore™ Western blot Stripping Buffer* (Pierce, USA). Las membranas que quisimos volver a revelar se lavaron y se guardaron sumergidas en PBS a 4°C hasta el momento de su nueva utilización. En dicho momento, se incubó la membrana con el reactivo durante 45 minutos a 45°C y en agitación. A continuación se realizaron 5 lavados con TBST de 10 minutos cada uno. El siguiente paso fue bloquear e incubar con los anticuerpos deseados tal y como se ha detallado anteriormente.

6.4.- Western blot para la proteína β -actina

Esta proteína fue utilizada como control de la técnica. Los extractos celulares fueron los mismos que se utilizaron para la proteína que se quería testar y, mayoritariamente, se trataba de membranas reutilizadas. El anticuerpo primario era un anticuerpo murino anti beta-actina humana (*Sigma, USA*) y se utilizó a una concentración de 1 en 100.000. El anticuerpo secundario utilizado fue un anticuerpo de cabra contra ratón (*goat anti-mouse*) marcado con HRP (*Pierce, USA*) diluido 1 en 100.000. El sistema de revelado fue el *Super Signal[®] West Pico*.

6.5.- Western blot para la proteína Btk

Los extractos procedían de células mononucleares aisladas por gradiente de ficoll. El anticuerpo primario utilizado fue un anticuerpo murino que reconoce la proteína Btk humana (*BD Transduction laboratories, USA*) a una dilución 1 en 200. El anticuerpo secundario fue un *goat anti-mouse* marcado con HRP (*Pierce, USA*) diluido 1 en 100.000. El sistema de revelado fue el *Super Signal[®] West Dura*.

6.6.- Western blot para la proteína WASP

Los extractos procedían de linfocitos T estimulados con PHA e IL-2 durante 3 días. El anticuerpo primario utilizado fue un anticuerpo murino que reconoce la proteína WASP humana (*BD Pharmingen, USA*) a una dilución 1 en 200. El anticuerpo secundario fue un *goat anti-mouse* unido a HRP (*Pierce, USA*) diluido 1 en 100.000. El sistema de revelado fue el *Super Signal[®] West Pico*.

6.7.- Western blot para la proteína gp91^{phox}

Los extractos celulares procedían de neutrófilos separados mediante dextrano y sacarosa. El anticuerpo primario fue el monoclonal de ratón 7D5, donado por el Dr. Dirk Roos y se utilizó a una dilución de 1 en 5.000. El anticuerpo secundario fue un *goat anti-mouse* marcado con HRP (*Pierce, USA*) diluido 1 en 125.000. En este caso, la solución de bloqueo fue TBST al 5% de albúmina (*Merck, Alemania*) y las diluciones de los anticuerpos se hicieron en TBST al 3% de albúmina. El sistema de revelado fue el *Super Signal[®] West Pico*.

6.8.- Western blot para la proteína p47^{phox}

Los extractos celulares procedían de leucocitos totales (*buffy coat*). El anticuerpo primario fue un policlonal de conejo donado por el Dr. Frans Wientjes y se utilizó a una dilución de 1 en 5.000. El anticuerpo secundario fue un anticuerpo de cabra contra ratón (*goat anti-rabbit*) marcado con HRP (*Pierce, USA*) diluido 1 en 125.000. El sistema de revelado fue el *Super Signal[®] West Pico*.

6.9.- Western blot para la proteína p67^{phox}

Los extractos celulares procedían de neutrófilos separados mediante dextrano y sacarosa. El anticuerpo primario fue un policlonal de conejo donado por el Dr. Frans Wientjes, que reconoce tanto p67^{phox} como p40^{phox}. Se utilizó a una dilución de 1 en 2.000. El anticuerpo secundario fue un *goat anti-rabbit* marcado con HRP (*Pierce, USA*) diluido 1 en 125.000. El sistema de revelado fue el *Super Signal[®] West Pico*.

7.- Análisis de funciones leucocitarias

7.1.- Determinación de la señalización vía IL-2

La vía de señalización a través de la Interleucina-2 (IL-2) induce la fosforilación de factores de transcripción implicados en la respuesta del linfocito a esta citocina. En esta técnica valoramos la presencia del factor de transcripción STAT5 fosforilado en células transformadas por el virus de Epstein Barr (EBV) estimuladas con IL-2 recombinante humana (*Biosource Internacional, USA*). Al tratarse de una proteína intracelular debimos permeabilizar y fijar las células y al ser fosforilada lo hicimos con los tampones comerciales *Cytofix* y *Permeabilization buffer* (*BD Biosciences, USA*) que protegen la fosforilación proteica. Cultivamos tanto células del paciente como de controles transformados por EBV, las estimulamos con IL-2 y, después de fijarlas y permeabilizarlas, las marcamos con un anticuerpo que reconoce STAT5 fosforilado (STAT5-P). Mediante esta técnica determinamos si existía un defecto en la vía de señalización de la IL-2. El procedimiento a seguir fue el siguiente:

1. Ajustar las células transformadas por EBV a una concentración de 1.000.000 células/mL en RPMI.
2. De cada muestra preparar 2 tubos de citometría con 500µL de las células ajustadas.
3. En uno de los dos tubos (estimulado), añadir 50µL de IL-2 a una concentración final de 10⁶U/mL y en el otro (sin estimular), 50µL de medio RPMI. Vortear.
4. Poner todos los tubos en un incubador a 37°C y al 5% CO₂ durante 20 minutos.
5. Añadir 500µL del fijador *Cytofix* previamente atemperado a 37°C. Vortear.
6. Incubar 10 minutos más a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturante.
7. Centrifugar a 700g durante 5 minutos.
8. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet*.
9. Añadir 2mL de PBS a cada tubo.
10. Centrifugar a 700g durante 5 minutos.
11. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet*.
12. Añadir 300µL de *Permeabilization buffer* en frío y gota a gota vortear.
13. Dejar 30 minutos en hielo.
14. Centrifugar a 700g durante 5 minutos.
15. Descartar el sobrenadante y vortear muy bien.
16. Añadir 2mL de FACS.
17. Centrifugar a 700g durante 5 minutos.
18. Descartar el sobrenadante y vortear muy bien.
19. Repetir el lavado con FACS.
20. Dejar el *pellet* en 100µL de FACS y teñir con 20µL de STAT5-P-PE y 5µL CD20-FITC.
21. Incubar 30 minutos a RT en oscuridad.
22. Añadir 2mL de FACS.
23. Centrifugar a 700g durante 5 minutos.
24. Descartar el sobrenadante y vortear.
25. Añadir 300µL de FACS y analizar las muestras en el citómetro.

7.2.- Estimulación policlonal de linfocitos T con PHA + IL-2

La estimulación policlonal de los linfocitos T se realizó a partir de células mononucleares obtenidas por gradiente de ficoll mediante la adición de PHA (fitohematoglutina, *Sigma, USA*) e IL-2 recombinante humana (*Biosource Internacional, USA*). Esta técnica nos permitió evaluar la activación de estas células en el tiempo. Además, el rendimiento de la extracción tanto de RNA como de proteínas mejoró notablemente en estas células estimuladas respecto a los linfocitos T obtenidos de sangre fresca.

1. Ajustar las células mononucleares obtenidas por gradiente de ficoll a una concentración de 1.000.000 células/mL en RPMI suplementado.
2. Añadir PHA (dilución 1 en 200 respecto la solución madre) e IL-2 (concentración final de 50UI/mL).
3. Pasar las células resuspendidas a un frasco de cultivo (*TPP, Suiza*) e incubar a 37°C, 5% de CO₂ y una humedad relativa saturante del 90% durante el tiempo estimado, teniendo en cuenta que hay que añadir IL-2 cada 2-3 días a 50UI/mL.

Para la obtención de *pellets* celulares a partir de los cuales se realizó la extracción de RNA o proteínas, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

4. Pasar el contenido de los frascos a tubos de 15mL.
5. Centrifugar a 700g durante 5 minutos.
6. Descartar el sobrenadante y lavar con 10mL de PBS centrifugando a 700g durante 5 minutos. Repetir el lavado.
7. Resuspender el *pellet* en 2-3mL de PBS y repartirlo en *ependorfs* bien identificados.
8. Centrifugar a 16.000g durante 3 minutos. Aspirar el sobrenadante.
9. Congelar los *pellets* celulares en N₂ líquido y guardar a -80°C.

7.3.- Evaluación de la expresión de CD40L y otras moléculas de activación

Esta prueba consistió en el análisis de la expresión de las moléculas CD40L y CD69 en las células mononucleares estimuladas con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato, *Sigma, USA*) e ionomicina (*Sigma, USA*) y compararlas con la expresión basal sin estimulación. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Ajustar las células mononucleares obtenidas por gradiente de ficoll a una concentración de 200.000 células/mL en RPMI suplementado y ponerlas en placas de microcultivo (*NUNC, Dinamarca*).
2. Por cada individuo a analizar, preparar 2 situaciones experimentales: una sin estimular y otra estimulada.
3. Añadir PMA y ionomicina en los pozos de estimulación para que la concentración final sea de 10ng/mL y 1µg/mL, respectivamente.
4. Dejar durante 4 horas en un incubador a 37° C y al 5% CO₂.
5. Pasado este tiempo, recoger las células.
6. Lavar con 10mL de PBS centrifugándolas a 700g durante 5 minutos.
7. Resuspender en 200µL de PBS y dividir en 2 tubos de citometría para hacer los marcajes:

Tubo 1: 3µL CD3-PC5 + 5µL CD8-FITC + 10µL CD40L-PE

Tubo 2: 3µL CD3-PC5 + 5µL CD8-FITC + 5µL CD69-PE

8. Incubar durante 15 minutos a RT en oscuridad.
9. Añadir 300µL de tampón *ISOTON*[®] II y analizar las muestras en el citómetro.

7.4.- Estudio de la capacidad proliferativa de los linfocitos T

Mediante esta técnica se evaluó la inmunidad celular frente a células extrañas (respuesta aloreactiva) y frente a sustancias inductoras (mitógenos). Consistió en la activación de células mononucleares y la posterior incubación con timidina tritiada. Si hubo proliferación, las células incorporaron la timidina marcada radioactivamente con tritio como base para la síntesis de DNA. La medida del nivel de radioactividad alcanzado por las células en cultivo nos indicó el nivel de linfoproliferación.

7.4.1.- Estimulación con Mitógenos

Utilizamos dos protocolos diferentes en función de si queríamos testar la capacidad proliferativa de los linfocitos T contra una amplia gama de mitógenos durante 5 días, o sólo frente a unos pocos y como control de la prueba de estimulación aloreactiva, durante 3 días.

Protocolo de estimulación con PHA, PWN, OKT3, SEA y SEB. Los pasos a seguir fueron:

1. Ajustar las células mononucleares obtenidas por gradiente de ficoll a una concentración de 1.500.000 células/mL en RPMI suplementado.
2. Preparar 1mL de las diluciones de los mitógenos en RPMI suplementado (se hicieron más concentradas para luego diluir al montar la placa de cultivo):
 - PHA (Fitohemaglutinina, *Sigma, USA*): diluir la solución madre a 1/4 y 1/16. Concentración final 1/8 y 1/32.
 - PWM (Pokeweed, *Sigma, USA*): preparar una dilución a 50ng/µL y otra a 10ng/µL. Concentración final 25ng/µL y 5ng/µL.
 - OKT3 (anti-CD3, *Sigma, USA*): preparar una dilución a 2ng/µL y otra a 1ng/µL. Concentración final 1ng/µL y 0,5ng/µL.
 - SEA (Superantígeno A de *Staphylococcus aureus, Sigma, USA*): preparar una dilución a 0,1ng/µL. Concentración final 0,03ng/µL.
 - SEB (Superantígeno B de *Staphylococcus aureus, Sigma, USA*): preparar una dilución a 2µg/µL. Concentración final 0,7ng/µL.
3. Montar una placa de 96 pocillos de fondo en U (*NUNC, Dinamarca*), añadiendo 100µL de cada uno de los componentes indicados en la siguiente plantilla, a excepción del SEA y el SEB que sólo se ponen 50µL:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P + RPMI			P + RPMI			C + RPMI			C + RPMI		
B	P + PHA 1/8			P + PHA 1/32			C + PHA 1/8			C + PHA 1/32		
C	P + PWM 25ng/µL			P + PWM 5ng/µL			C + PWM 25ng/µL			C + PWM 5ng/µL		
D	P + OKT3 1ng/µL			P + OKT3 0,5ng/µL			C + OKT3 1ng/µL			C + OKT3 0,5ng/µL		
E	P + SEA			C + SEA			P + SEB			C + SEB		

P: Células del paciente, C: Células del control

4. Incubar durante 5 días a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturante.
5. Pasado este tiempo, añadir 10µL de timidina tritiada (*Amersham Internacional, UK*) a una dilución final de 1µCi/mmol por pocillo.
6. Incubar durante 20 horas más a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturante.
7. Filtrar los cultivos a través del papel *FilterMat* (*Skatron, Noruega*) utilizando el aparato de filtración *SKATRONAS* (*Skatron, Noruega*).
8. Pasar los filtros a tubos y dejar secar.
9. Añadir 1mL de líquido de centelleo (*Tri-Carb 2100TR, Packard, USA*) a cada uno de ellos.
10. Realizar el contaje de radioactividad mediante el contador β COBRA II 5002 (*Packard, USA*). Los resultados se expresaron en cuentas por minuto (cpm).

Protocolo de estimulación con PHA y PWN. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Ajustar las células mononucleares obtenidas por gradiente de ficoll a una concentración de 1.500.000 células/mL en RPMI suplementado.
2. Preparar 1mL de las diluciones de los mitógenos en RPMI suplementado (se hicieron el doble de concentradas para luego diluir a la mitad al montar la placa de cultivo):
 PHA: diluir la solución madre a 1/8 y 1/16. Concentración final 1/16 y 1/32.
 PWM: preparar una dilución a 20ng/µL y otra a 5ng/µL. Concentración final 10ng/µL y 2,5ng/µL.
3. Montar una placa de 96 pocillos de fondo en U, añadiendo 100µL de cada uno de los componentes indicados en la siguiente plantilla:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P + RPMI		P + RPMI			C + RPMI			C + RPMI			
B	P + PHA 1/16		P + PHA 1/32			C + PHA 1/16			C + PHA 1/32			
C	P + PWM 10ng/µL		P + PWM 2,5ng/µL			C + PWM 10ng/µL			C + PWM 2,5ng/µL			

P: Células del paciente, C: Células del control

4. Incubar durante 3 días a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturante.
5. Pasado este tiempo, añadir 10µL de timidina tritiada a una dilución final de 1µCi/mmol por pocillo.
6. Incubar durante 20 horas más a a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturante.
7. Filtrar los cultivos a través del papel *FilterMat* utilizando el aparato de filtración *SKATRONAS*.
8. Pasar los filtros a tubos y dejar secar.
9. Añadir 1mL de líquido de centelleo a cada uno de ellos.
10. Realizar el contaje de radioactividad (cpm) mediante el contador β.

7.4.2.- Respuesta aloreactiva: cultivo mixto linfocitario

El protocolo a realizar fue el siguiente:

1. Ajustar las células mononucleares obtenidas por gradiente de ficoll a una concentración de 1.500.000 células/mL en RPMI suplementado.

- Separar 1mL de células del paciente y 1mL del control e irradiarlas a 25Gray durante 10 minutos.
- Montar una placa de 96 pocillos de fondo en U, añadiendo 100µL de cada uno de los componentes indicados en esta plantilla:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P + RPMI			P + RPMI			C + RPMI			C + RPMI		
B	P + C*			P + C*			C + P*			C + P*		
C	P + C*			P + C*			C + P*			C + P*		
D	P + C			P + C			P + C			P + C		

P: Células del paciente, P*: Células del paciente irradiado, C: Células del control, C*: Células del control irradiado

- Incubar durante 3 días a a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturante.
- Pasado este tiempo, añadir 10µL de timidina tritiada a una dilución final de 1µCi/mmol por pocillo.
- Incubar durante 20 horas más a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturante.
- Filtrar los cultivos a través del papel *FilterMat* utilizando el aparato de filtración *SKATRONAS*.
- Pasar los filtros a tubos y dejar secar 1 hora a 37°C.
- Añadir 1mL de líquido de centelleo a cada uno de ellos.
- Realizar el contaje de radioactividad (cpm) mediante el contador β.

7.5.- Estudio de la movilización de gránulos citotóxicos en células NK

Esta prueba consistió en activar células NK para determinar si estaba afectada la movilización de sus gránulos citotóxicos. Para ello utilizamos como estímulo para las células NK la línea celular K562, mieloma carente de MHC de clase I. El grado de movilización se evaluó por la expresión en superficie de la proteína CD107a, constituyente de dichos gránulos, ya que si la movilización es correcta, CD107a se expresa en superficie.

- Ajustar las células mononucleares obtenidas por gradiente de ficoll a una concentración de 2.000.000 células/mL en RPMI suplementado.
- Añadir IL-2 a una concentración final de 50UI/mL.
- Incubar durante 24 horas a a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturante.
- Al día siguiente, lavar las células estimuladas con PBS a 700g durante 5 minutos. Repetir el lavado.
- Resuspender el *pellet* en RPMI suplementado ajustando nuevamente a 2.000.000 células/mL.
- Por otro lado, ajustar la línea K562 a 2.000.000 células/mL en RPMI suplementado.
- Una vez ajustadas todas las células, montar la placa de microcultivos de 96 pocillos (*NUNC, Dinamarca*), siguiendo el siguiente esquema.
Pocillo 1: 100µL de células mononucleares + 100µL de RPMI suplementado
Pocillo 2: 100µL de células mononucleares + 100µL de células K562
- Añadir a todos los pocillos 5µL de CD107a-PE.
- Incubar 1 hora a a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturante.

10. Añadir 5µL de monesina 2mM (*Sigma, USA*) a cada pocillo (concentración final 0,05mM)
11. Incubar 2 horas más a a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturante.
12. Coger 100µL de cada pocillo y lavar con 3mL PBS a 700g durante 5 minutos.
13. Descartar sobrenadante y resuspender el *pellet* en 100µL de PBS.
14. Marcar con 3µL de CD16-FITC y 3µL de CD3-PC5.
15. Incubar 15 minutos a RT en oscuridad.
16. Añadir 300µL de tampón *ISOTON® II* y analizar las muestras en el citómetro.

7.6.- Determinación de la capacidad oxidativa de los granulocitos

7.6.1.- BURSTTEST®

El kit *BURSTTEST®* (*ORPEGEN Pharma, Alemania*) permitió determinar cuantitativamente la respiración oxidativa en leucocitos. Para ello, estimulamos sangre heparinizada con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) y *Escherichia coli* opsonizadas y posteriormente incubamos con el sustrato Dihidrorodamina 123 (DHR). Si hubo respiración, los radicales de oxígeno producidos oxidaron el sustrato dando lugar a Rodamina 123. La cuantificación de este producto mediante la emisión de fluorescencia indicó la actividad enzimática de estas células. Es un test diagnóstico para la Enfermedad Granulomatosa Crónica (CGD). El procedimiento a seguir fue el siguiente:

1. Partir de sangre heparinizada. La sangre debe ser fresca y no deben haber pasado más de 4-5 horas desde su extracción.
2. Preparar 3 tubos de citometría por cada muestra con 100µL de sangre cada uno.
3. Mantener las muestras de sangre en hielo durante 10 minutos para que la temperatura descienda a 0°C.
4. Cada uno de los 3 tubos representa una activación:
 - Control negativo: añadir 20µL de PBS.
 - PMA: añadir 20µL de la solución de PMA (dilución 1:200).
 - E. Coli: añadir 20µL de las bacterias *Escherichia coli* opsonizadas del kit (mantener siempre en hielo y vortear antes de añadir).
5. Mezclar bien todos los tubos.
6. Incubar 10 minutos a 37°C en el baño. El tiempo de incubación y la temperatura deben controlarse durante todo el proceso. Es conveniente tapar los tubos.
7. Añadir 20µL de la *solución del sustrato* y agitar con vortex. El sustrato debe haber sido reconstituido inyectando 1mL de PBS en el vial, 30 minutos antes de iniciar el procedimiento.
8. Incubar 10 minutos a 37°C en el baño.
9. Añadir 2mL de *solución de lisis 1x* e incubar 20 minutos a RT. De esta manera, eliminaremos los hematíes.
10. Centrifugar las células 5 minutos a 300g a 4°C y descartar el sobrenadante.
11. Añadir 3mL de PBS.
12. Centrifugar 5 minutos a 300g a 4°C y descartar el sobrenadante.
13. Añadir 50µL de la *solución para la tinción del DNA* y mezclar.
14. Añadir 300µL de tampón *ISOTON® II* y analizar las muestras en el citómetro.

7.6.2.- Oxidación de la Dihidrorodamina (DHR)

Esta prueba se basa en los mismos principios que el kit comercial *BURSTTEST*[®]. Es una simplificación del kit ya que sólo se utiliza un estímulo, la PMA (*Sigma, USA*). Los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Partimos de sangre fresca no coagulada, ya sea heparinizada o con EDTA.
2. Preparar 2 tubos de citometría (tubo A: sin PMA y tubo B: con PMA) por cada muestra, con 50µL de sangre y 150µL de suero fisiológico.
3. Preparar la dilución del DHR (*Sigma, USA*) a 0,5µg/mL en suero fisiológico.
4. Añadir 10µL a todos los tubos.
5. Incubar durante 10 minutos a 37°C, 5%CO₂ y humedad saturante.
6. Preparar la dilución de PMA a 0,2µg/mL en PBS. Esta dilución no puede utilizarse más veces.
7. Añadir 20µL de PMA sólo a los tubos B.
8. Incubar durante 30 minutos a 37°C, 5%CO₂ y humedad saturante.
9. Lisar con 1mL de solución de lisis (*Beckman Coulter, USA*) durante 5 minutos.
10. Centrifugar 5 minutos a 300g a 4°C.
11. Lavar con 2mL de PBS frío.
12. Centrifugar 5 minutos a 300g a 4°C.
13. Añadir 200µL de PBS frío. Analizar las muestras en el citómetro.

8.- Análisis de la expresión génica

8.1.- Extracción de RNA

Se realizó por el método *Nucleo Spin RNA II* (*Macherey-Nagel, Alemania*). En función del cDNA que queríamos estudiar, se partió de diferentes poblaciones celulares. Fueran del tipo que fueran, la técnica se inició a partir de un *pellet* de entre 2 y 10 millones de células en un *ependorf* de 1,5mL. El protocolo de *Nucleo Spin RNA II* consiste en:

1. Añadir 350µL del *buffer* RA1 y 3,5µL de β-mercaptoetanol al *pellet* celular. Vortear para resuspender bien.
2. Poner en una columna *Nucleospin Filter Unit*.
3. Centrifugar 1 minuto a 11.000g.
4. Descartar la columna y añadir al filtrado 350µL de etanol al 70%. Vortear bien. Se verá un pequeño precipitado blanco.
5. Colocar en una columna *Nucleospin RNA II*.
6. Centrifugar 30 segundos a 8.000g.
7. Añadir 350µL de la solución MDB (*membrane desalting buffer*)
8. Centrifugar 1 minuto a 11.000g.
9. Preparar la mezcla de la reacción de la DNasa I (10µL de DNasa I + 90µL del *DNasa Reaction Buffer* por muestra).
10. Añadir 95µL de esta mezcla en el centro de la membrana silica de la columna.
11. Incubar 15 minutos a RT.
12. Añadir 200µL de *buffer* RA2 (inactivador de la DNasa I) a la columna.
13. Centrifugar 30 segundos a 8.000g.

14. Añadir 600µL del *buffer* RA3.
15. Centrifugar 30 segundos a 8.000g.
16. Añadir 250µL del *buffer* RA3.
17. Centrifugar 2 minutos a 11.000g.
18. Colocar la columna en un *ependorf* identificado y añadir 60µL de H₂O *RNase free*.
19. Centrifugar 1 minuto a 11.000g.
20. Leer la concentración de RNA del eluido mediante espectrofotometría a 260nm y calcular su concentración:

$$\text{Concentración RNA} = \text{D.O.260nm} * 40 * \text{factor de dilución}$$

8.2.- Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA utilizamos el kit *Super Script III First Strand Syntesis for RT-PCR* (Invitrogen, USA). En él, a partir de un *primer reverse* específico u oligodT se elabora una copia de cDNA utilizando como molde el mRNA. Una vez obtenido el híbrido, se añade RNasa H para degradar el RNA, quedando la cadena sencilla de cDNA. El protocolo del kit consiste en:

1. Mezclar en un tubo de PCR:

RNA	1-5µg
dNTPs 10mM	1µL
<i>Primer reverse</i> 5µM /oligodT	1µL
H ₂ O	hasta 10µL

2. Incubar 5 minutos a 65°C y dejar 1 minuto en hielo.
3. Mientras tanto, preparar para cada reacción, la mezcla de:

<i>Buffer</i> RT 10x	2µL
MgCl ₂ 25mM	4µL
DTT 0,1M	2µL
RNasa OUT (1U/µL)	1µL
Super Script III RT (1U/µL)	1µL

4. Pasado el minuto en hielo, añadir 10µL de la mezcla al primer tubo.
5. Incubar 50 minutos a 50°C y 5 minutos a 85°C.
6. Añadir 1µL de RNasa H (1U/µL) e incubar 20 minutos a 37°C.

8.3.- Amplificación de cDNA

Para la amplificación del cDNA utilizamos polimerasas diseñadas para amplificaciones largas en las que se necesita un alto grado de fidelidad en las copias (*proof-reading*), como la *FideliTaq* (USB, USA). El esquema general de esta amplificación fue:

PCR <i>Buffer</i> 10X (con MgCl ₂)	2,5µL
dNTPs 4mM	2,5µL
<i>Primer Forward</i> 5µM	3µL
<i>Primer Reverse</i> 5µM	3µL
Taq polimerasa	1 unidad
cDNA	4µL
H ₂ O	hasta 25µL

Las condiciones de amplificación variaron según los *primers* (temperatura de anillamiento o *annealing*) y la longitud del fragmento a amplificar (tiempo de extensión). El esquema general fue:

1. Desnaturalización: 95°C 3 minutos
 2. Desnaturalización: 95°C 30 segundos
 3. Anillamiento: 60°C 30 segundos
 4. Extensión: 72°C 1 minuto/Kb
 5. Extensión: 72°C 5 minutos
 6. 4°C
- } x 40 ciclos

La comprobación de la amplificación y los procesos posteriores, como la secuenciación, digestión o clonación de productos, se encuentran detallados en los apartados 9.4, 9.5 y 9.8.

8.4.- *Primers* para RT-PCR

Gen	Primer	5' Secuencia 3'
AK2	AK2cDNA-F	GTGAGGCGTGCGAACTGGTGG
AK2	AK2cDNA-AR	ATTCCCACCCATTGCCTCACAGG
AK2	AK2cDNA-BR	TGCCCAGCACCTAAGAGCAGG
BTK	BTKcDNAF	AGTCCCACCTTCCAAGTCCT
BTK	BTKcDNAR1.1	GTGAATCCACCGCTTCCTTA
BTK	BTKcDNAF1.2	AGGTTCCCTTATCCCTTCCA
BTK	BTKcDNAR1.2	TCCTGCCCATTTTATCTCG
BTK	BTKcDNAF2	GGGTGATGAATATTTATCTTGGA
BTK	BTKcDNAR2	TCGGTGAAGGAAGTCTTTG
BTK	BTKcDNAF3	TGGCCATCAAGATGATCAAA
BTK	BTKcDNAR	AAGTGAAATTGGGGCTTG TG
CYBA	p22cDNA-F	CGCGCCTAGCAGTGTCCCAG
CYBA	p22cDNA-R	CCGGCTTCGCTGCATTATT
CYBB	gp91cDNAF	TCATTGGAAGAAGAAGCATAGTATAGA
CYBB	gp91cDNAR1	CAAAGAGATGATGTGTGTACCAAAA
CYBB	gp91cDNAF2	GTACCTGGCTGTGACCCTGT
CYBB	gp91cDNAR2	CAACGATGCGGATATGGATAC

<i>CYBB</i>	gp91cDNAF3	AAGGTGTCCAAGCTGGAGTG
<i>CYBB</i>	gp91cDNAR	ATTATTTGAGCATTTGGCAG
<i>NCF2</i>	p67cDNA-F1	ACGCTCCAACCTGTCTTCTC
<i>NCF2</i>	p67cDNA-R1	TCTTGATCCACCACAGATGC
<i>NCF2</i>	p67cDNA-F2	TGGAGTGTGTCTGGAAGCAG
<i>NCF2</i>	p67cDNA-R2	CCGGAGCTCCAGTTTCTTAG
<i>NCF2</i>	p67cDNA-F3	GTTCCCATGCCCTACACACT
<i>NCF2</i>	p67cDNA-R3	CAGTACAGTATACAGCAGAAGGG
<i>TNFRSF6</i>	cDNA FAS F	GGGAAGCGGTTTACGAGTGA
<i>TNFRSF6</i>	cDNA FAS R	TGGGGTTAGCCTGTGGATAGAC
<i>TNFSF5</i>	CD40LcDNA-FW	GCCAGAAGATACCATTTC AAC
<i>TNFSF5</i>	CD40LcDNA-RE	CCGCTGTGCTGTATTATGAA
<i>SH2D1A</i>	SAPcDNA-F	GCCTGGCTGCAGTAGCAGCGGCATCTCCC
<i>SH2D1A</i>	SAPcDNA-R	ATGTACAAAAGTCCATTT CAGCTTTGAC
<i>WASP</i>	WASPcDNAex1F	GCCTCGCCAGAGAAGACAAG
<i>WASP</i>	WASPcDNAex2F	CCTACTTCATCCGCTTTAC
<i>WASP</i>	WASPcDNAex4F	AAGGAATCAGAGGCCAAAGTGG
<i>WASP</i>	WASPcDNAex6F	GGCTGGGGACAGTGGACATC
<i>WASP</i>	WASPcDNAex10F	TCCAGCTACTGGACGTTCTG
<i>WASP</i>	WASPcDNAex7R	TCTTCCCTGAGCGTTTCTTA
<i>WASP</i>	WASPcDNAex10R	GGGCAGTGGACCAGAACGACC
<i>WASP</i>	WASPcDNAex11R	CTGCAGCGCTGAGCTCTCTG
<i>WASP</i>	WASPcDNAex12R	TGGAGGGGGAGCCATGTC

9.- Análisis de la secuencia génica

9.1.- Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizó el kit *Blood and Body Fluid Spin Protocol* (Qiagen, Alemania). El protocolo consistió en:

1. Resuspender el *pellet* de células en 200µL de PBS.
2. Añadir 20µL de proteasa. Pipetear hasta que se deshaga bien el *pellet*.
3. Añadir 200µL de *Buffer AL*. Vortear durante 15 segundos.
4. Incubar 10 minutos a 56°C.
5. Añadir 200µL de etanol absoluto (*Merck, Alemania*). Vortear durante 15 segundos.
6. Aplicar la mezcla a una columna *QIAspin*.
7. Centrifugar 1 minuto a 6.000g. Descartar el filtrado.
8. Añadir 500µL de *Buffer AW1*.
9. Centrifugar 1 minuto a 6.000g. Descartar el filtrado.
10. Añadir 500µL de *Buffer AW2*.
11. Centrifugar 3 minutos a 16.000g. Descartar el filtrado.
12. Colocar la columna en un *ependorf* bien rotulado.
13. Añadir 200µL de *Buffer AE*. Incubar 5 minutos a RT.
14. Centrifugar 1 minuto a 6.000g.
15. Cuantificar el DNA mediante espectrofotometría (260nm):

$$\text{Concentración DNA} = \text{D.O.}_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{factor de dilución}$$

9.2.- Amplificación por PCR

Para la amplificación por PCR se utilizaron diferentes polimerasas (*Dream Taq, Fermentas, USA; GoTaq, Promega, USA*) y se adecuaron las condiciones según cada una de ellas. El esquema general para una reacción de volumen final 20µL fue:

PCR <i>Buffer</i> 10x	2µL
MgCl ₂ 50mM	1µL
<i>Primer Forward</i> 5µM	2µL
<i>Primer Reverse</i> 5µM	2µL
dNTPs 4mM	2µL
DNA	100ng
Taq polimerasa	1 unidad
H ₂ O	hasta 20µL

Las condiciones de amplificación variaron según los *primers* (temperatura de anillamiento) y la longitud del fragmento a amplificar (tiempo de extensión), pero el esquema general fue:

1. Desnaturalización: 95°C 3 minutos
 2. Desnaturalización: 95°C 30 segundos
 3. Anillamiento: 60°C 30 segundos
 4. Extensión: 72°C 1 minuto/Kb
 5. Extensión: 72°C 5 minutos
 6. 4°C
- } x 35 ciclos

9.3.- *Primers* para PCR genómica

Gen	<i>Primer</i>	5' Secuencia 3'
AK2	AK2ex1F	GCACCAATTCTGTCCAATCA

<i>AK2</i>	AK2ex1R	GCAGGTCCAGGGCTTCTA
<i>BTK</i>	BTkex7F	CACTCAATATGGACGGCAAAA
<i>BTK</i>	BTkex7R	CAAATCCCCCATCTTAGCAA
<i>BTK</i>	BTkex10F	ATAGGGTTTGAGTGAGTTGACTG
<i>BTK</i>	BTkex10R	AGGTAGGGGGCAGAACAG
<i>CYBB</i>	gp91ex3F	CCTCATGCTAAGAACCTTGG
<i>CYBB</i>	gp91ex3R	TTGATGGCCTTTGAAAATTAGAGGAACTTAG
<i>CYBB</i>	gp91mutF	CCGCCTCTTCTAGTCAGCAC
<i>CYBB</i>	gp91mutR	TCGACAGACTGGCAAGAGAA
<i>CYBB</i>	gp91ex7F	CTATTACTAAATGATCTGG
<i>CYBB</i>	gp91ex7R	TACATGTTTCTTAGACACAGG
<i>IL-2GR</i>	IL-2GRcDNA2F	GACTCCCTCAGTGTTTCCACTCTGCC
<i>IL-2GR</i>	IL-2GRcDNA4R	CCCAGTCAGTCCGGTACTGCACC
<i>IL-2GR</i>	IL-2GRex5F	ATGACACTGGTGGGTGTTC
<i>IL-2GR</i>	IL-2GRex5R	GAGATGGGGGCACCAAGTTA
<i>JAK3</i>	<i>JAK3ex10F</i>	CCAGACTCCGTCTCCAAAAA
<i>JAK3</i>	<i>JAK3ex10R</i>	ACCTGCAGTTTCTGCCACTT
<i>NCF1</i>	p47int2F	TGCAATCCAGGACAACCGCAA
<i>NCF1</i>	p47ex2R	CTCCCAAAGGGTGGAGCT
<i>NCF2</i>	p67ex3nF	CTCACACCTCTCACTGC
<i>NCF2</i>	p67ex3nR	ACTGCTCAAAACCAAGC
<i>NCF2</i>	p67ex4nF	GCTGCATTTATTTCTCCA
<i>NCF2</i>	p67ex4nR	TGAACTGTCAGCCATCCAT
<i>NCF2</i>	p67ex5nF	TTTTATGTTGCGGTCTGT
<i>NCF2</i>	p67ex5nR	ATGGCATGTCCTCTGAGA
<i>NCF2</i>	p67ex5inF	CGCATTCCATGGTGTTTT
<i>NCF2</i>	p67ex6nR	TCCCACCTTGCTCCACAT

<i>NCF2</i>	p67ex9nF	CTGGCTCCAAGTTCAGTG
<i>NCF2</i>	p67ex9nR	CAAACAAGGCAGCAGATACT
<i>NCF2</i>	p67ex10nF	TGTGGGTACTGATGAGCA
<i>NCF2</i>	p67ex10nR	TCCTGACAACACCTCTTTT
NEMO	NEMOdelF	GAGGACCAATACCGAGCATC
<i>NEMO</i>	NEMOdelR	CTCGGAGACACAGGAACCAGCA
RAG1	RAG1- <i>ini</i> -F	CTCTATGATCAGCACCTAACATGA
<i>RAG1</i>	RAG1-1-RE	CTGCAGTTGGCGATCTTCTTC
<i>RAG1</i>	RAG1-2-FW	CTTCAGCCAAACTTGCAGCTC
<i>RAG1</i>	RAG1-2-RE	CCTCTTTGCAATGGTGACCAC
<i>RAG1</i>	RAG1-3-FW	GCATGCCCTTCGGAATGCTG
<i>RAG1</i>	RAG1-3-RE	GTGCATCTATGGAAGGGACTG
<i>RAG1</i>	RAG1-4-FW	CTGGCGTTCCAACCCTTACC
<i>RAG1</i>	RAG1-4-RE	ATGCAACCCAGAGGGAAACTC
RAG2	RAG2- <i>ini</i> -F	GCGTGTGGGAGGACTTAAAA
<i>RAG2</i>	RAG2-1-RE	AAGGCATGTATGAGCGTCCT
<i>RAG2</i>	RAG2-2-FW	TGAAGCCAGATATGGTCATTC
<i>RAG2</i>	RAG2-2-RE	CCTCTAAAGAGATGATGTTGC
<i>RAG2</i>	RAG2-3-FW	TGTCTCCAGTGCAATCCTGA
<i>RAG2</i>	RAG2-3-RE	GTGTCAAATTCATCATCACCAT
<i>RAG2</i>	RAG2-4-FW	GAAGAATTTTGTTCAGTGCAG
<i>RAG2</i>	RAG2-4-RE	TAATCAAACAACCTTCTAAGAAAG
SBDS	SBDSex2F	TCTGATTTTCAGGAGGTTTTGG
<i>SBDS</i>	SBDSex2R	GCAAATGGTAAGGCAAATACG
SH2D1A	SAP-1-FW	GCCCTACGTAGTGGGTCCACATACCAACAG
<i>SH2D1A</i>	SAP-1-RE	GCAGGAGGCCAGGAATGAAATCCCCAGC
<i>SH2D1A</i>	SAP-2-FW	GGAAACTGTGGTTGGGCAGATACAATATGG

<i>SH2D1A</i>	SAP-2-RE	GGCTAAACAGGACTGGGACCAAAATTCTC
<i>SH2D1A</i>	SAP-3-FW	GCTCCTCTTGCAGGGAAATTCAGCCAACC
<i>SH2D1A</i>	SAP-3-RE	GCTACCTCTCATTTGACTTGCTGGCTACATC
<i>SH2D1A</i>	SAP-4-FW	GACAGGGACCTAGGCTCAGGCATAAACTGAC
<i>SH2D1A</i>	SAP-4-RE	ATGTACAAAAGTCCATTTTCAGCTTTGAC
<i>TNFSF5</i>	CD40Lg-1FW	TAAGTCTATTGCTGGTGGATG
<i>TNFSF5</i>	CD40Lg-1RE	AGAACCAACCTATGAATTAGT
<i>TNFSF5</i>	CD40Lg-2FW	GCAGATATCATTAGCTGTATTC
<i>TNFSF5</i>	CD40Lg-2RE	AGTTTCCCGATCTAGCAAATGT
<i>TNFSF5</i>	CD40Lg-3FW	GATCTGAGTCTATATGATAATC
<i>TNFSF5</i>	CD40Lg-3RE	TAGGCATTCATAGAAATTAGC
<i>TNFSF5</i>	CD40Lg-4FW	GCACAGTCTCTATTACACAGTT
<i>TNFSF5</i>	CD40Lg-4RE	GAGTTTAACCATTAGGTAACAT
<i>TNFSF5</i>	CD40Lg-5FW	GAATGTGAACCATGCTCTGC
<i>TNFSF5</i>	CD40Lg-5RE	CCGCTGTGCTGTATTATGAA
<i>TNFSF5</i>	CD40L-951F	CACTGGGATTCAAGGA
<i>TNFSF5</i>	CD40L-2115F	GGGGTCTTTTCTCTGT
<i>TNFSF5</i>	CD40L-324F	GGAGCATCCCTCCTCC
<i>TNFSF5</i>	CD40L-4m-F	AAATTGCGGCACATGTCATA
<i>TNFSF5</i>	CD40L-629R	GGCACCAGTTATCGCAAGAT
<i>TNFSF5</i>	CD40L-4i-F	GCCTGACAGTTTTTGGTTCCAT
<i>TNFSF5</i>	CD40L-P1-F	AGAATTGTTTATTGCTTAAC
<i>TNFSF5</i>	CD40L-P3-F	AAAACAGATAGATCAACACA
<i>VGLL1</i>	VGLL1-F	TCTCAAATCAGTGGCGTTA
<i>VGLL1</i>	VGLL1-R	GAGGCAGGTTGAAGAGCAAC
<i>WASP</i>	W3S	GTGCCTCAGTGCCACTGTG
<i>WASP</i>	W3A	TTCCCATCTCCTCTCCACAC

WASP	W5S	CTAGAAAAGTCCCCTCTCATG
WASP	W6A	CTCTTACCCATCCATCCAGAG
WASP	W7S	ACACACAGATTTCCCTCAAG
WASP	W7A	AGGAATCTGTGGGTCCACTG
WASP	WASPm1-2F	CATTGCGGAAGTTCCTCT
WASP	WASPm1-2R	CTTGAAGCTATGGACACATATG
WASP	WASPm3-7F	TGCCTCAGTGCCACTGTG
WASP	WASPm3-7R	CAGGAATCTGTGGGTCCACT
WASP	WASPm8-9F	AAGGAAGGGCTGTGAGGATT
WASP	WASPm8-9R	CTAGAGAAGGGAGCGTATG
WASP	WASPm10-11F	TCCTTATGGGAGCACCTATACTG
WASP	WASPm10-11R	GCTGATGTCACTATTGGTGGT
WASP	WASPm12F	CCTCCCAGGGCATCTTATC
WASP	WASPm12R	GGGCAGAAGGAAACAAAGAA

9.4.- Detección de DNA/cDNA amplificado

Para determinar si hubo amplificación del DNA o cDNA, lo visualizamos en un gel de agarosa al 1,75% con Bromuro de Etidio sometido a electroforesis. El DNA está cargado negativamente debido a sus grupos fosfato y migra en un campo eléctrico hacia el polo positivo (ánodo). La velocidad de migración depende de su peso molecular, siendo mayor en aquellos fragmentos más pequeños.

El gel se preparó diluyendo la agarosa (*Seakem, USA*) en TBE 0,5x (Tris 0,5M, Ácido bórico 0,5M y EDTA pH=8 1mM) y calentándola a 100°C durante 3 minutos. Una vez la temperatura bajó a unos 50°C, se añadió el Bromuro de Etidio (1µg/mL, *Sigma, USA*), se incorporó al molde y se dejó solidificar el tiempo suficiente.

Las muestras se diluyeron en tampón *Blue Juice* (Azul de bromofenol 1mM, Xilencianol 1 mM y Glicerol 6%) antes de ser cargadas en el gel. La carrera tuvo lugar en una cubeta con TBE 0,5x a 200V durante 20 minutos. Para conocer el tamaño del producto amplificado utilizamos el marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL, USA)* (Figura III.2). Para poder ver las bandas de DNA se sometió el gel a radiación UV ya que esta radiación es absorbida por los dímeros de timidina que forma el Bromuro de Etidio en el DNA permitiendo su visualización.

Este sistema también nos permitió visualizar las digestiones enzimáticas de las enzimas de restricción que se indican en los apartados 9.7 y 9.8. En este caso los geles se prepararon a una concentración del 2% y del 1%, respectivamente.

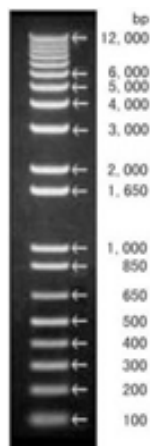


Figura III.2. Marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder*.

9.5.- Secuenciación de un producto de PCR o RT-PCR

Para secuenciar productos de PCR o RT-PCR previamente hubo que purificarlos. El método utilizado fue *EXOSAP-IT* (*Amersham Internacional, UK*). Este método se basa en una actividad exonucleasa que convierte las cadenas sencillas (los *primers*) en nucleótidos sueltos y en una actividad fosfatasa alcalina que elimina los grupos fosfato de los nucleótidos sueltos impidiendo una incorporación posterior. Las instrucciones del kit fueron:

1. Añadir 2 μ L de EXOSAP-IT a 5 μ L del producto de PCR.
2. Incubar 15 minutos a 37°C para que actúen las enzimas.
3. Incubar 15 minutos a 80°C para inactivar dichas enzimas.
4. Mantener a 4°C o congelar.

A continuación se preparó la reacción de secuencia en la que se incorporaron dideoxinucleótidos marcados que permitieron leer la secuencia nucleotídica. La lectura fue posible debido al marcaje fluorescente de los nucleótidos y a que no tienen extremo 3'OH libre, lo que impide que se incorporen más subunidades en este extremo. El kit de secuencia utilizado fue *Big Dye Terminator v1.1* (*Amersham Internacional, UK*). El protocolo consistió en:

1. Mezclar en un tubo de PCR, para cada muestra:

Big Dye v.1.1	2 μ L	
Primer 5 μ M	0,5 μ L	
Buffer Big Dye 5x	1 μ L	
H ₂ O	4 μ L	
Producto PCR purificado	2,5 μ L	
2. Introducir los tubos en el termociclador y aplicar el siguiente programa:

1. 96°C	10 segundos	}	x 25 ciclos
2. 96°C	10 segundos		
3. 50°C	10 segundos		
4. 60°C	2 minutos		
5. 4°C			

Antes de poder secuenciar se tuvieron que eliminar los restos de *primer* y de nucleótidos sueltos. Para ello utilizamos la precipitación con acetato/etanol:

1. Añadir al producto de secuenciación 1 μ L de NaOAc 3M y 1 μ L de EDTA 125mM.
2. Centrifugar 10 segundos a 16.000g.
3. Añadir 25 μ L de etanol absoluto frío. Vortear.
4. Centrifugar 30 minutos a 16.000g en frío.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Añadir 500 μ L de etanol al 70%.
7. Centrifugar 10 minutos a 16.000g en frío.
8. Descartar el sobrenadante y dejar secar el *pellet*.
9. Guardar las muestras en el congelador.

Justo antes de que las muestras fueran analizadas en el secuenciador *3130xl Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems, USA*), se resuspendieron en 15 μ L de formamida y se cargaron en la placa de secuenciación (ambos de *Applied Biosystems, USA*). Las secuencias se interpretaron en el software *Sequencing Analysis v.5.3.1* (*Applied Biosystems, USA*).

9.6.- Cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR)

Esta técnica permite, entre otras aplicaciones, realizar una cuantificación semicuantitativa del DNA amplificado. Nosotros utilizamos esta determinación para cuantificar el número de copias del gen *SAP/SH2D1A* en la madre del caso clínico 19 respecto a una mujer control, que tiene un número 2n de este gen, y respecto a un varón control, cuyo número es n, ya que este gen está codificado en el cromosoma X. Como control de la técnica analizamos un gen codificado por un autosoma, en este caso el *JAK3*.

La técnica consiste en una reacción de amplificación en la que se va incorporando una sustancia fluorescente que es medida a lo largo de todo el proceso (de ahí la denominación de tiempo real). La intensidad de fluorescencia es proporcional al número de copias del gen, por lo que es muy importante controlar la cantidad inicial de DNA de la muestra. Partimos de DNA ajustado a 10ng/ μ L y utilizamos el kit *LightCycler® Fast Start DNA Master^{Plus} SYBR GreenI* (*Roche, Alemania*). Las condiciones de las qPCR fueron las siguientes:

Mix SYBR Green 10x	2 μ L
MgCl ₂ 50mM	1 μ L
Primer forward 5 μ M	2 μ L
Primer reverse 5 μ M	2 μ L
DNA 10ng/ μ L	3 μ L
H ₂ O	hasta 20 μ L

Al igual que en las PCRs convencionales, la temperatura de *annealing* varía según la pareja de *primers*. Tanto la amplificación como la cuantificación y el análisis de los resultados se llevaron a cabo a través del *software* del termociclador *LightCycler® 1.5* (*Roche, Alemania*).

9.7.- Digestión de un producto de PCR con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son endonucleasas bacterianas que cortan el DNA de doble cadena en una posición concreta dentro de una secuencia nucleotídica denominada diana de restricción. Esta secuencia suele ser un palíndromo de 6 o 8 bases de longitud. Mediante la digestión de un producto de PCR con enzimas de restricción podemos identificar alteraciones que generen o destruyan una diana de restricción. En el gen *NCF1* existe una diana de restricción para la enzima *SspBI* (*Fermentas, Alemania*) justo en el lugar de recombinación con

su pseudogen. Esta recombinación comporta la pérdida de dos bases (GT) anulando así la diana de restricción para SspBI. De esta manera podemos identificar si existen alelos nativos del gen *NCF1*, ya que, a diferencia de los mutados, se cortaran. Las condiciones de la digestión fueron las siguientes:

SspBI (5U/μL)	1 unidad
Buffer B 10x	2μL
Producto de PCR	5μL
H ₂ O	hasta 20μL

La digestión se realizó a 37°C durante 1 hora. A continuación, sembramos el producto digerido en un gel de agarosa al 2%, tal y como se explica en el apartado 9.4.

9.8.- Clonaje de productos de PCR o RT-PCR

Esta técnica fue utilizada para secuenciar el fragmento del exón 3 de *CYBB* procedente del DNA extraído de la biopsia intestinal del hermano fallecido del caso clínico 20 y para secuenciar las formas de *splicing* alternativo obtenidas en la RT-PCR de p67^{phox} del caso clínico 25. En el primer caso se utilizó debido a que el pequeño tamaño del amplicón (80 bp) impedía la lectura de la secuencia de la zona mutada y lo subclonamos para luego secuenciarlo con *primers* propios del vector; mientras que en el segundo fue porque en la retrotranscripción no se consiguió un único producto de amplificación, por lo que no se pudo secuenciar directamente. Por ello, estos productos se clonaron en el vector pCR2.1 (Figura III.3) y luego se secuenciaron.

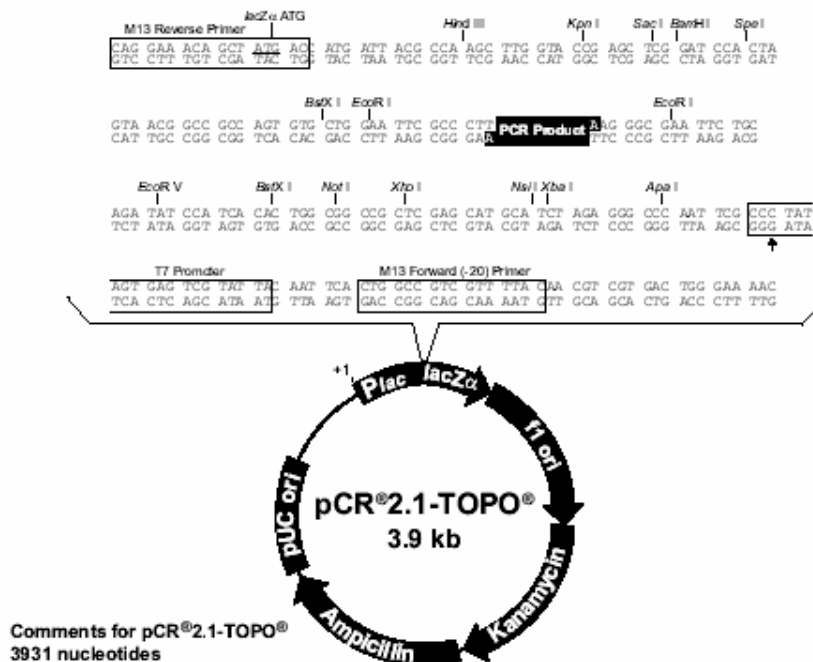


Figura III.3. Vector pCR2.1-TOPO

9.8.1.- Ligación y transformación bacteriana

Para introducir los productos de PCR en un vector se usó el sistema *TOPO TA Cloning* (Invitrogen, USA). Este sistema se basa en aprovechar la actividad transferasa terminal que

tienen las Taq polimerasas que añaden una cola poli A al extremo 3' de los productos de PCR. Esta cola poli A permite que la PCR se pueda ligar al vector pCR 2.1-TOPO que tiene Ts en sus extremos 3'. De esta manera, el inserto queda entre 2 dianas EcoRI (Figura III.3).

La reacción de ligación y la transformación consistió en:

1. Mezclar:

Producto PCR	1µL
Vector pCR2.1	0,5µL
Sal	0,5µL
H ₂ O estéril	1µL
2. Incubar 10 minutos a RT.
3. Descongelar las bacterias competentes *E. Coli* DH5α en hielo.
4. Añadir 1µL de la reacción de clonaje a 15µL de bacterias.
5. Incubar 1 hora en hielo y mezclar de vez en cuando.
6. Pasado este tiempo, realizar el choque térmico a 42°C durante 45 segundos.
7. Mantener las bacterias 5 minutos en hielo.
8. Añadir 150µL de medio SOC e incubar 1 hora a 37°C en agitación.
9. Sembrar 100µL sobre una placa a temperatura de LB (Luria-Bertani)-agar (*Sigma*, USA) con ampicilina 100µg/ml (*Sigma*, USA).
10. Incubar toda la noche en una estufa a 37°C.
11. Al día siguiente, picar las colonias en 2mL de medio LB con ampicilina e incubar durante 24 horas a 37°C en agitación.
12. A continuación, hacer la extracción del plásmido.

9.8.2.- Extracción de DNA plasmídico

Después de las transfecciones bacterianas el método de extracción utilizado fue el de la miniprep convencional. El protocolo fue el siguiente:

1. Pasar los cultivos a *eppendorfs* de 2mL y mantener 10 minutos en hielo.
2. Centrifugar 1 minuto a 16.000g a 4°C.
3. Descartar el sobrenadante y deshacer el *pellet*.
4. Añadir 100µL de la solución 1 de lisis (glucosa 50mM; EDTA pH 8, 10mM; Tris 25mM pH 8) hasta obtener una mezcla homogénea.
5. Añadir 200µL de la solución 2 de desnaturalización (NaOH 0.2N; SDS 1%), mezclar invirtiendo el tubo y dejar 5 minutos en hielo.
6. Añadir 150µL de la solución 3 (Acetato potásico 3M; Acético glacial 5M), mezclar con vortex invirtiendo el tubo e incubar 5 minutos en hielo.
7. Centrifugar 5 minutos a 16.000g a 4°C.
8. Pasar los sobrenadantes a tubos nuevos evitando arrastrar el *pellet*.
9. Añadir 450µL de fenol/cloroformo (vol/vol).
10. Vortear y centrifugar 2 minutos a 16.000g a RT.
11. Recuperar la fase acuosa que contiene el DNA plasmídico evitando coger restos de fenol.
12. Añadir 900µL de etanol absoluto y vortear.
13. Dejar 2 minutos a RT.
14. Centrifugar 15 minutos a 16.000g a 4°C.
15. Aspirar el sobrenadante y dejar secar los *pellets*.
16. Resuspender en 50µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM) + RNasa (10µg/mL, *Sigma*, USA).

Una vez extraídos los plásmidos se digirieron con la enzima de restricción EcoRI (*Fermentas, Alemania*) para saber si contenían el inserto:

EcoRI (5U/ μ L)	1 unidad
Buffer H 10x	2 μ L
Plásmido purificado	5 μ L
H ₂ O	hasta 20 μ L

La digestión se realizó a 37°C durante 1 hora y se sembró en un gel de agarosa al 1%. Esta extracción nos permitió seleccionar las clonas con el inserto que nos interesaba secuenciar. Una vez seleccionadas dichas clonas, reactivamos los cultivos y extrajimos el plásmido con un método de purificación más eficiente. El método escogido fue *QIAprep Miniprep Spin* (*QIAGEN, Alemania*), que es una purificación por columna. El protocolo fue el siguiente:

1. Reactivar los cultivos con 3mL de LB con ampicilina 100 μ g/ml durante 24 horas a 37°C en agitación.
2. Centrifugar a 16.000g durante 1 minuto.
3. Resuspender el *pellet* en 250 μ L del *Buffer* P1 y mezclar con vórtex.
4. Añadir 250 μ L del *Buffer* P2 invirtiendo los tubos no más de 5 veces.
5. Añadir 350 μ L del *Buffer* N3 invirtiendo el tubo 4-6 veces inmediatamente después.
6. Centrifugar 10 minutos a 16.000g.
7. Preparar las columnas y aplicar en ellas los sobrenadantes.
8. Centrifugar 1 minuto a 16.000g.
9. Añadir 500 μ L del *Buffer* PB y centrifugar 1 minuto a 16.000g.
10. Añadir 750 μ L del *Buffer* PE y centrifugar 1 minuto a 16.000g.
11. Sin añadir nada, volver a centrifugar a 16.000g 1 minuto más para eliminar los residuos de *buffers*.
12. Pasar las columnas a *ependorfs* nuevos bien rotulados.
13. Añadir 50 μ L de EB en el centro de la resina e incubar 5 minutos a RT.
14. Centrifugar 1 minuto a 16.000g.

Una vez eluido el plásmido, se volvió a comprobar que contenía el inserto mediante la digestión con EcoRI y la posterior visualización en un gel de agarosa.

9.8.3.- Secuenciación de DNA plasmídico

La secuenciación del DNA plasmídico se basa en los mismos principios que la secuenciación de productos de PCR. La única diferencia es que los plásmidos se secuenciaron directamente, no fue necesario ningún tratamiento previo. Los *primers* que se unían directamente al vector pCR2.1 fueron los siguientes:

Primer del vector	5' Secuencia 3'
M13Forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAG
M13Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

IV. Resultados

1.- Inmunodeficiencias Severas Combinadas

Las Inmunodeficiencias Severas Combinadas (SCID) son enfermedades caracterizadas por una depleción de los linfocitos T, que puede ir acompañada de niveles normales o disminuidos de linfocitos B y/o NK. Los pacientes con SCID sufren infecciones de aparición temprana que suelen estar causadas por microorganismos oportunistas como *Pneumocystis jiroveci*, *Aspergillus sp* o *Herpesviridae*.

La forma más frecuente de SCID es la ligada al sexo (X-SCID; MIM: 300400) con 1 afectado por cada 200.000 nacimientos, la mitad de todas las SCID. Se caracteriza por una ausencia de linfocitos T y NK e hipogammaglobulinemia, a pesar de la presencia en números normales e incluso elevados de linfocitos B. Está causada por alteraciones en la cadena gamma común del receptor de la IL-2 (IL-2R γ c) (Noguchi, 1993b; Puck, 1993) que forma también parte de los receptores de la IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Mutaciones puntuales en el dominio extracelular son suficientes para interrumpir el desarrollo de las células T y NK.

Otras formas de SCID presentan un fenotipo similar pero con una herencia autosómica recesiva, como la deficiencia en JAK3 (MIM: 600802) (Notarangelo, 2000). JAK3 se asocia a la molécula IL-2R γ c en la señalización de muchas interleucinas hematopoyéticas.

La Disgenesia Reticular (DR; MIM: 267500) está causada por mutaciones en la adenilato kinasa AK2 (Lagresle-Peyrou, 2009; Pannicke, 2009) que dan lugar a ausencia de granulocitos, niveles indetectables de células T y bajos o normales de B, con hipogammaglobulinemia y sordera bilateral neurosensorial. Es la manifestación más severa de SCID.

Las SCID causadas por alteraciones en los genes *RAG* (MIM: 601457) tienen las manifestaciones clínicas típicas de las SCID con ausencia tanto de linfocitos T y B, aunque no de NK. Las recombinasas RAG-1 y RAG-2 están implicadas en el reordenamiento de los segmentos V(D)J de los genes de los receptores de la célula T (TCR) y de la célula B (Ig).

El Síndrome de Omenn (OS; MIM: 603554) es una SCID autosómica recesiva caracterizada por la temprana aparición de erupciones cutáneas generalizadas, eritrodermia exudativa, nódulos linfáticos aumentados, hepatoesplenomegalia, infecciones respiratorias graves, diarrea, hiponatremia con edema y eosinofilia. Está causado por mutaciones hipomórficas en los genes responsables de SCID que permiten una expresión y función parcial que da lugar a algún reordenamiento de TCR y con ello la generación de linfocitos T oligoclonales con expansión periférica y de carácter autorreactivo, como por ejemplo los genes *RAG*.

1.1.- X-SCID: Caso clínico 1

1.1.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de un varón de origen caucásico nacido en el año 2009, que a los 7 meses de edad fue ingresado en la unidad de cuidados intensivos por una meningitis por *Listeria monocytogenes*. Previamente había sufrido una infección del tracto urinario y una bronquitis aguda. En el hospital de origen se detectó hipogammaglobulinemia, con bajos niveles de IgA (7mg/dL) e indetectables de IgG (<100mg/dL) e IgM (<5mg/dL), y una disminución muy marcada de linfocitos T (1,2%) y NK (0%). Ante estos hallazgos clínicos, se instauró tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas.

Se trata del primer hijo de padres no consanguíneos. La madre había sufrido 2 abortos previos sobre las 11-12 semanas de gestación. Como antecedentes familiares hay que destacar un tío materno, *exitus* a los 3 meses de vida en un contexto de fiebre y otitis, y 2 tíos abuelos maternos, también fallecidos a los pocos meses de edad.

Las manifestaciones clínicas del paciente junto con los antecedentes familiares, los análisis de poblaciones linfocitarias y los niveles de inmunoglobulinas, establecieron como diagnóstico presuntivo una Inmunodeficiencia Severa Combinada ligada al X (X-SCID).

Se decidió someterle a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) lo más precoz posible. Para ello, fue trasladado a nuestro hospital donde se inició la búsqueda de donante no emparentado y a los 10 meses de vida fue trasplantado con una unidad de sangre de cordón umbilical. La evolución hasta la fecha está siendo favorable.

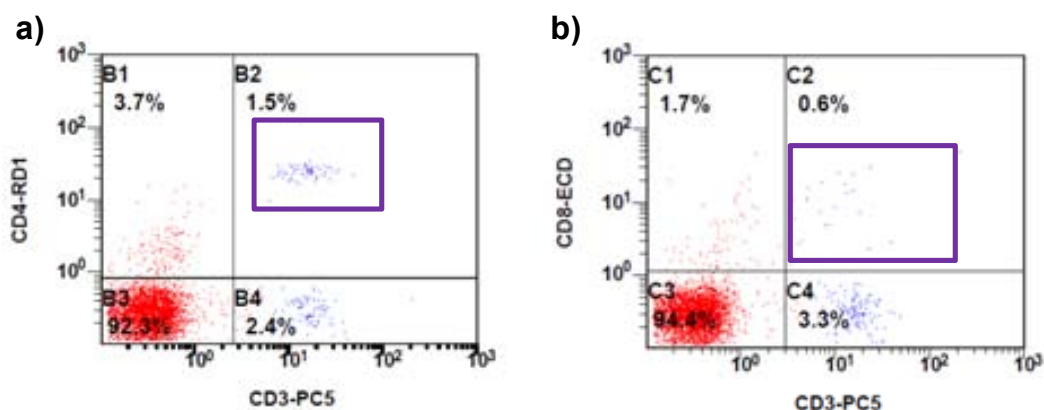
1.1.2.- Datos inmunológicos

El análisis de los niveles de inmunoglobulinas que realizamos en nuestro servicio a los 8 meses de vida mostró niveles muy bajos de IgM, indetectables de IgA e IgE y normales de IgG, debido, esto último, al tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas que recibió en el hospital de origen (Tabla IV.1)

	P1	Valores de referencia (0-1 año)
IgG	583*	200-1000 mg/dL
IgA	<7	16-85 mg/dL
IgM	12	25-149 mg/dL
IgE	<2	0,1-15 UI/mL

Tabla IV.1. La IgG estaba compensada debido al tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas *, mientras que los niveles de IgA, IgM e IgE eran muy bajos o indetectables.

El estudio de las poblaciones linfocitarias mostró un 4,1% de linfocitos T (1,5% CD4+, 0,6% CD8+, 1% TCRγδ), un 0,1% de células NK y un 91,5% de linfocitos B (Figura IV.1). La cifra absoluta de linfocitos era de $2.320 \cdot 10^6/L$, un número bajo para la edad del paciente (valores normales, v.n.: $4.000-10.500 \cdot 10^6/L$).



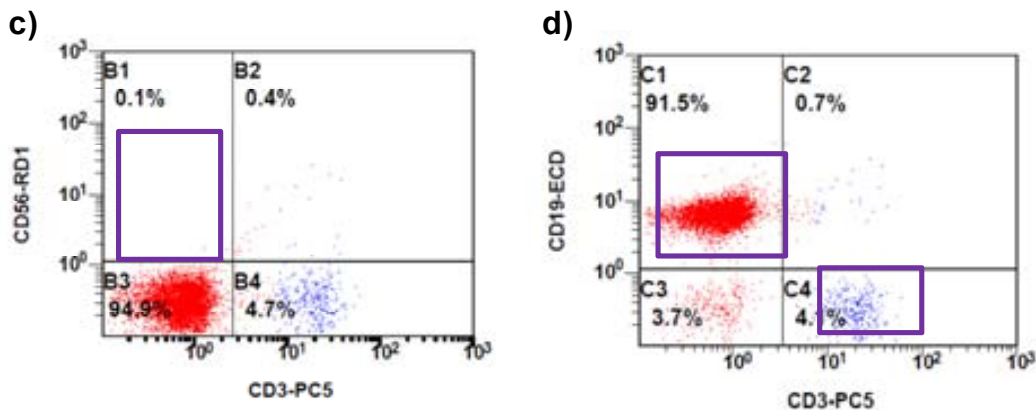


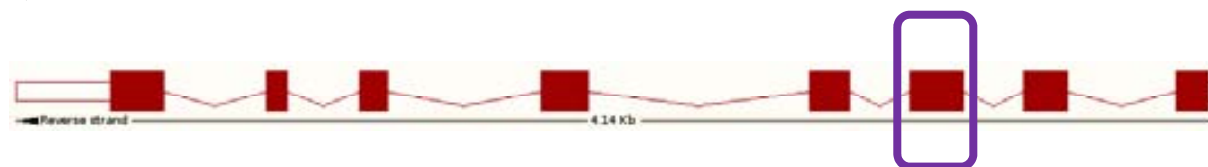
Figura IV.1 .Análisis de las poblaciones linfocitarias. El paciente tenía un 4,1% linfocitos T (d), un 1,5% de T CD4+ (a) y un 0,6% de T CD8+ (b), un 91,5% de linfocitos B (d) y un 0,1% de células NK (c).

Estos bajos niveles de linfocitos T y células NK indicaban que se trataba de una SCID con fenotipo T-B+NK-, concordante con el diagnóstico presuntivo de X-SCID.

1.1.3.- Análisis del gen *IL-2RG*

El X-SCID está causado por alteraciones en el gen *IL-2RG*. Todos los datos obtenidos hasta el momento confirmaban la sospecha diagnóstica de X-SCID. Por ese motivo, analizamos este gen. El estudio del gen de *IL-2RG* en el paciente mostró una alteración en el exón 3: existía una Adenina insertada en la posición 373 (c.373insA) (Figura IV.2). Esta inserción provocaba un desplazamiento en la pauta de lectura y con él, la aparición de un codón STOP prematuro 46 aminoácidos después (p.Lys120fsX46). Esta mutación ya había sido descrita previamente (Puck, 1997). La madre del paciente era portadora de la misma (Figura IV.2).

a)



b)

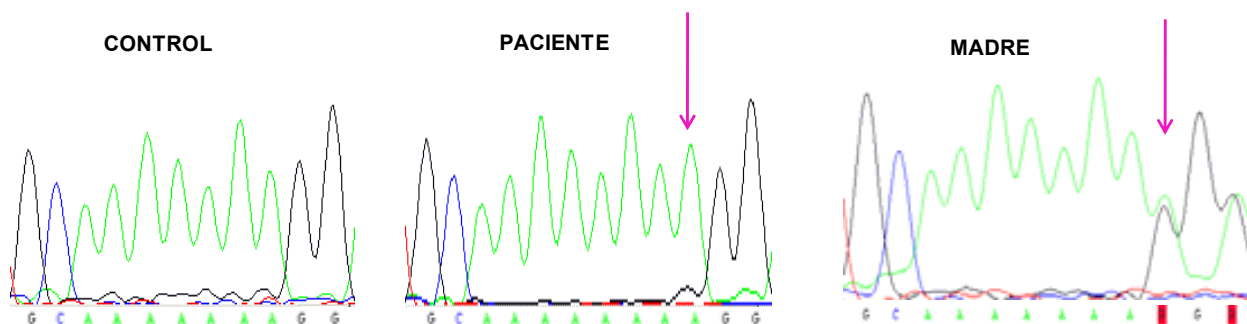


Figura IV.2. Esquema del gen *IL-2RG* (a). Análisis del exón 3 de *IL-2RG*. Se observaba la inserción de una A en hemicigosis en el paciente (c.373insA) y en heterocigosis en la madre de éste (b).

1.1.4.- Estudio de individuos portadores

Aunque el paciente tenía antecedentes familiares vía materna (un hermano de la madre *exitus* a los 3 meses de vida y 2 tíos abuelos, también fallecidos durante el primer año de vida), no pudimos estudiar la presencia de la mutación en ninguno de ellos al no disponer de muestras. Sin embargo, estudiamos a todas las mujeres de la rama materna del árbol genealógico: tanto la madre, como la abuela y la bisabuela eran portadoras de la mutación c.373insA (Figura IV.3). Se trataba, por tanto, de una mutación heredada durante al menos cuatro generaciones. Estos datos sugerían la presencia de la alteración en los familiares fallecidos antes mencionados.

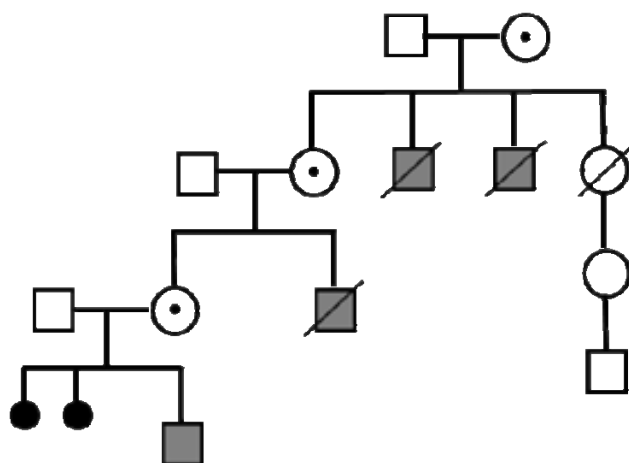


Figura IV.3. Árbol genealógico del caso clínico 1. Tanto la madre, como la abuela y la bisabuela materna eran portadoras de la alteración.

1.1.5.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos y evolución

Desde el diagnóstico de SCID, el paciente permaneció en una cámara de aislamiento con tratamiento profiláctico antibiótico, antifúngico y antivírico y con soporte de inmunoglobulinas intravenosas cada 3-4 semanas. El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) se realizó a los 10 meses de vida a partir de una unidad de sangre de cordón umbilical con una identidad HLA 9 de 10.

La evolución del trasplante está siguiendo una pauta correcta, de manera que las primeras células en aparecer en sangre periférica fueron los linfocitos T CD8+ y las células NK, posteriormente los linfocitos T CD4+ y por último las células B, que empezaron a ser detectadas 2 meses después del TPH. Los niveles de inmunoglobulinas, primero la IgM y luego el resto, también se incrementaron paulatinamente hasta alcanzar niveles normales, lo que indica una correcta implantación de las células B. No obstante, de momento la IgG se continúa aportando exógenamente para evitar posibles complicaciones.

La evolución del paciente está siendo muy buena y en la actualidad el estado general del paciente es excelente.

1.2.- X-SCID: Caso clínico 2

1.2.1.- Descripción del caso clínico

El caso clínico 2 es un varón caucásico nacido en el año 2009 que a los 6 meses de edad sufrió una neumonía por *Pneumocystis jiroveci* con infiltrado intersticial bilateral. El primer análisis realizado en el hospital de origen indicaba un número muy bajo de linfocitos T con unos niveles normales de linfocitos B y células NK. Además, estaba ausente la IgG, pero no la IgA ni la IgM. Ante la sospecha de Inmunodeficiencia Severa Combinada se le administraron inmunoglobulinas intravenosas.

Se trata del primer hijo de padres no consanguíneos. No existen antecedentes familiares relevantes.

El paciente fue remitido a nuestro hospital para confirmar el diagnóstico de Inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID) y para la búsqueda y trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) de donante no emparentado al carecer de hermanos. A los 10 meses de edad fue trasplantado de una unidad de sangre de un cordón umbilical con una identidad HLA 8 de 10. Hasta la fecha el paciente evoluciona satisfactoriamente.

1.2.2.- Datos inmunológicos

El estudio de las inmunoglobulinas realizado en nuestro servicio a los 9 meses de edad mostró niveles próximos al límite inferior de IgA e IgM y levemente elevados de IgE. Los de IgG eran normales, debido al tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas que se instauró en el hospital de origen (Tabla IV.2).

	P2	Valores de referencia (0-1 año)
IgG	397*	200-1000 mg/dL
IgA	18	16-85 mg/dL
IgM	33	25-149 mg/dL
IgE	34	0,1-15 UI/mL

Tabla IV.2. La IgG estaba compensada debido al tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas *, mientras que los niveles de IgA e IgM eran bajos, aunque dentro de los parámetros normales, y los de IgE levemente elevados.

El número de linfocitos era normal ($6.650 \cdot 10^6/L$; v.n.: $4.000-10.500 \cdot 10^6/L$). El análisis de las poblaciones linfocitarias mostró un 6,1% de linfocitos T (5,4% CD4+, 0,4% CD8+), un 3,9% de células NK y un 85,8% de linfocitos B (Figura IV.4). Los niveles de linfocitos T, y especialmente los de linfocitos T CD8+ eran anormalmente bajos.

Ante estos resultados, quisimos determinar si los linfocitos T presentes en el paciente tenían un fenotipo inmaduro, lo esperable en un niño de 9 meses, o si por el contrario se trataba de células con fenotipo memoria, lo que sugeriría un origen materno. Para ello, determinamos la expresión en superficie de los marcadores CD45RA (fenotipo *naive*) y CD45R0 (fenotipo memoria). Más del 90% de los linfocitos T del paciente eran de memoria. Además, si mirábamos específicamente estos marcadores en los linfocitos T CD4+, que eran los mayoritarios, este porcentaje subía al 95%. Por lo que se deduce que las pocas células T que tenían un fenotipo inmaduro eran CD8 (Figura IV.5).

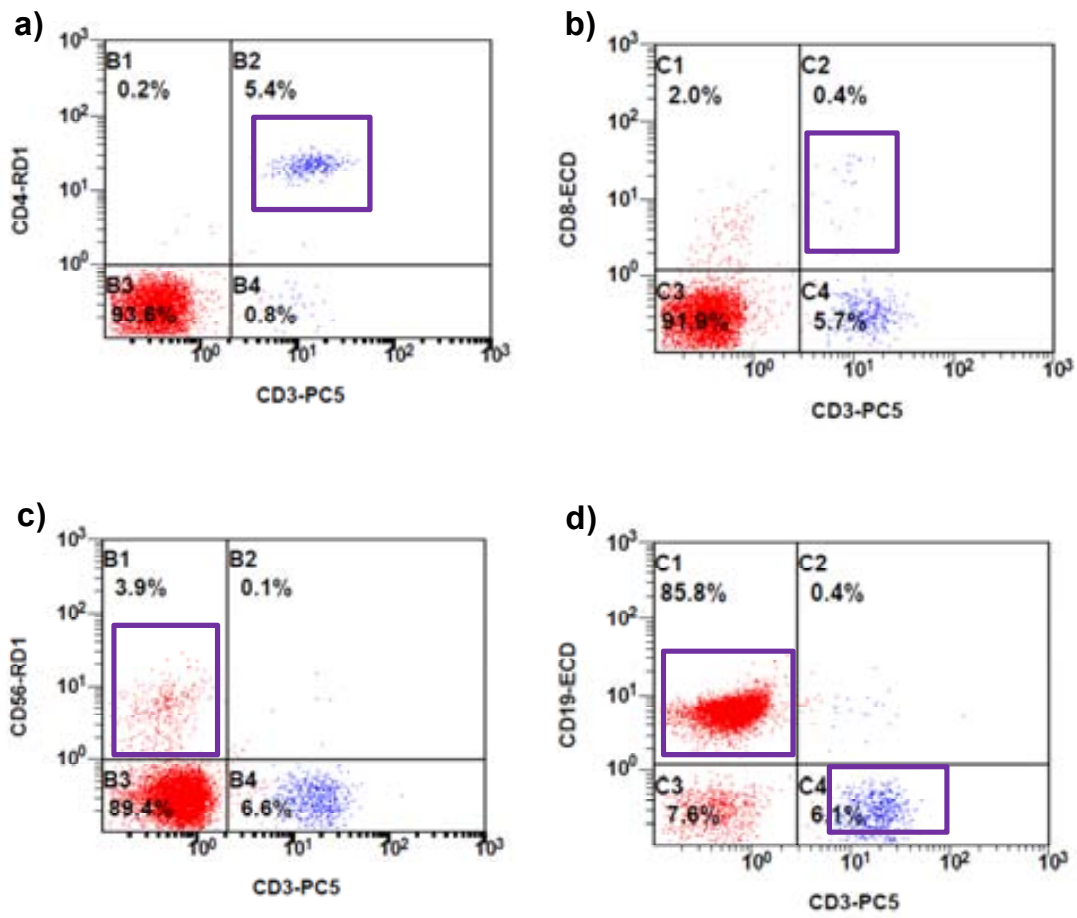
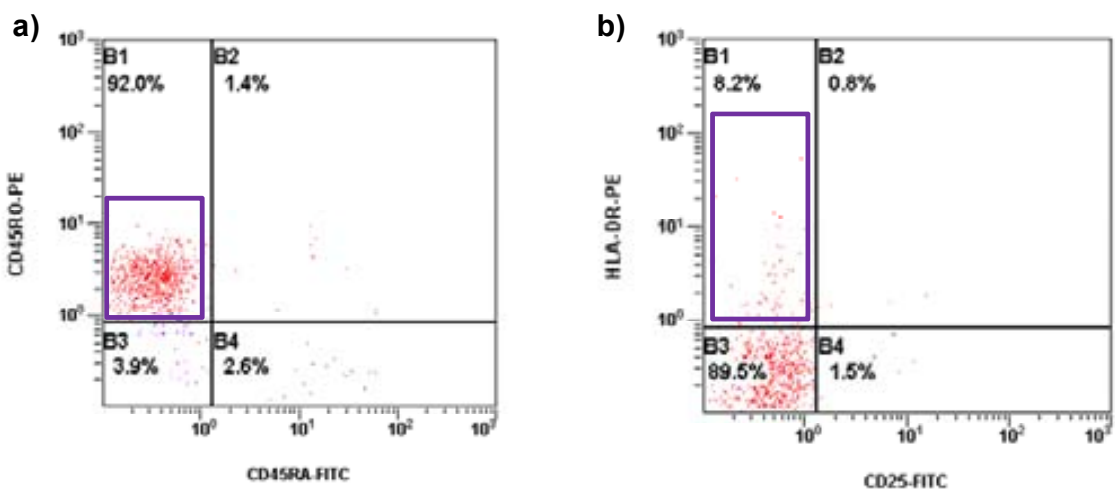


Figura IV.4 .Análisis de las poblaciones linfocitarias. El paciente tenía un 6,1% linfocitos T (d), un 5,4% de T CD4+ (a) y un 0,4% de T CD8+ (b), un 85,8% de linfocitos B (d) y un 3,9% de células NK (c).

Además, quisimos saber el grado de activación de estos linfocitos T a través del marcaje de las moléculas CD25 (activación temprana) y HLA-DR (activación tardía). Los linfocitos T del paciente no aparecían como activados y sólo un bajo porcentaje (8%) expresaban el marcador HLA-DR (Figura IV.5).



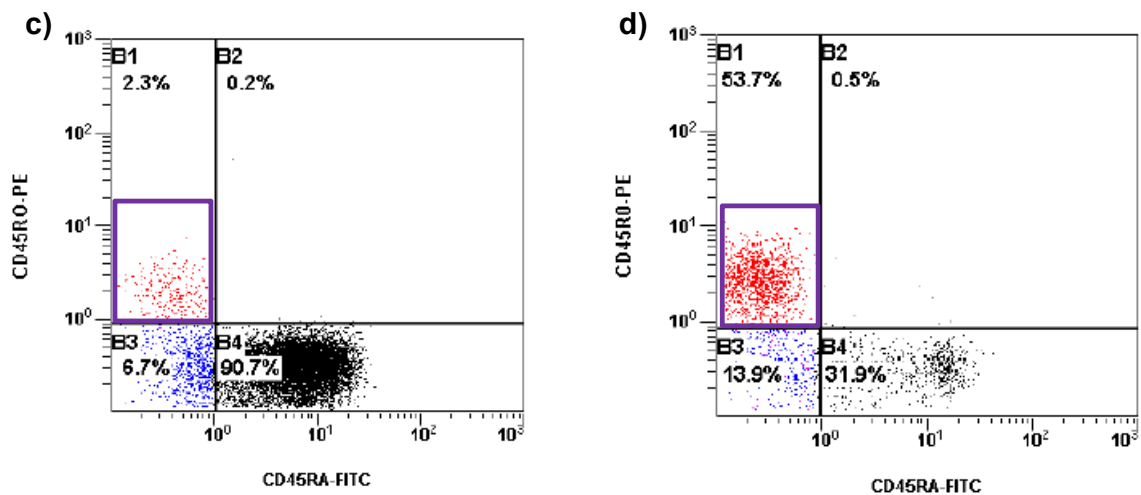


Figura IV.5. Estudio de los marcadores de memoria y activación. El 92% de los linfocitos T del paciente tenían un fenotipo memoria (CD45RO+) (a), lo que no concuerda con lo esperable en un niño de su edad (c), ni tan siquiera en un individuo de mediana edad (d). Sólo un 8% de estos linfocitos T estaban activados (HLA-DR+) (b).

Con este análisis, podíamos suponer que se trataba de linfocitos T de origen materno que habían pasado a la sangre del paciente vía transplacental.

Estos datos junto con los anteriores, nos indicaban que podía tratarse de un X-SCID, por ello, el siguiente paso fue analizar el gen *IL-2RG*.

1.2.3.- Análisis del gen *IL-2RG*

El estudio del gen *IL-2GR* mostró una alteración en el exón 5: la Citosina de la posición 664 estaba sustituida por una Timina (c.C664T) provocando la sustitución de la Arginina 222 por una Cisteína (p.Arg222Cys) (Figura IV.6). Esta mutación ya había sido previamente descrita (Clark, 1995). La madre era portadora del defecto genético (Figura IV.6).

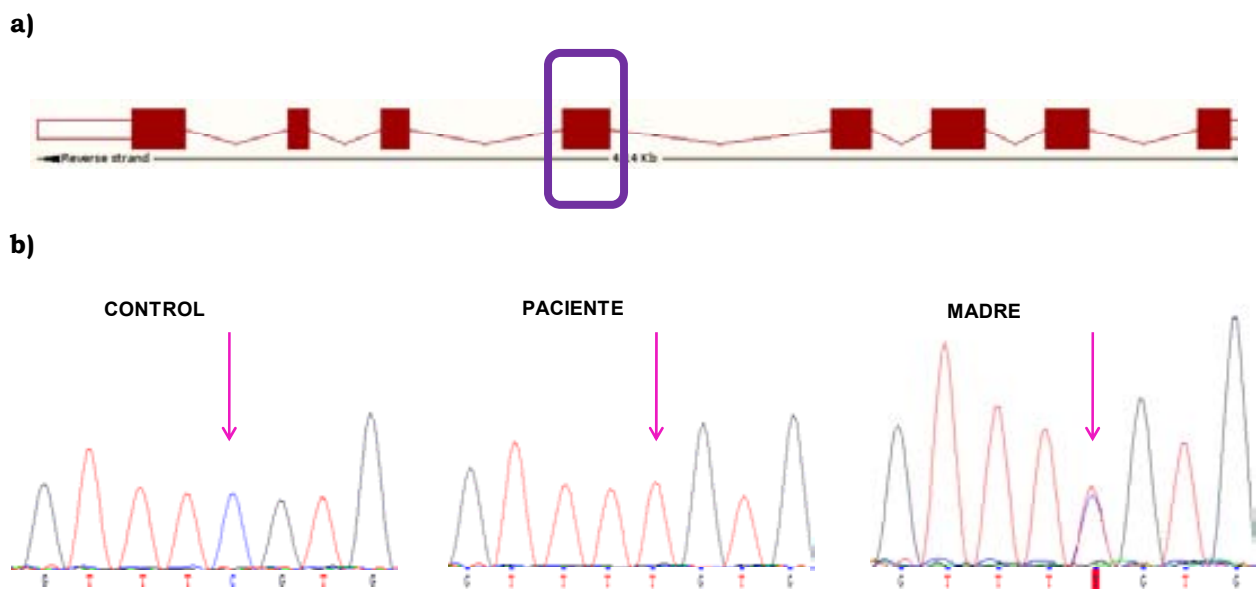


Figura IV.6. Esquema del gen *IL-2RG* (a). Análisis del exón 5 de *IL-2RG*. Se observaba la sustitución de una C por una T en hemicigosis en el paciente (c.C664T) y en heterocigosis en la madre de éste (b).

1.2.4.- Estudio de individuos portadores

Tal y cómo hemos visto anteriormente, la madre era portadora de la mutación p.R222C. Aunque el paciente no tenía hermanos, era de vital importancia analizar la rama materna, ya que existía el riesgo de que existieran otras portadoras en la familia. El estudio de la abuela materna resultó negativo para la alteración, por lo que podemos decir que se trataba de una mutación *de novo* en la madre y que nadie más estaba afectado (Figura IV.7).

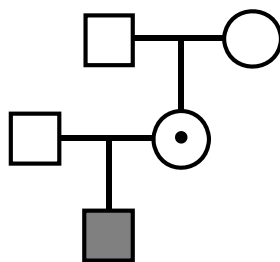


Figura IV.7. Árbol genealógico del caso clínico 2. Sólo la madre del paciente era portadora de la mutación (mutación *de novo* en la madre).

1.2.5.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos y evolución

Desde su diagnóstico el paciente estuvo en una cámara de aislamiento y con tratamiento profiláctico antibiótico, antifúngico y antivírico además de recibir inmunoglobulinas intravenosas cada 3 semanas. El trasplante se realizó a los 11 meses de vida a partir de una unidad de sangre de cordón umbilical con una identidad HLA 8 sobre 10.

Después del TPH el paciente sufrió una enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) aguda de tipo cutáneo, que se resolvió con tratamiento. La evolución está siendo favorable y la IgG continúa siendo de aporte exógeno. En la actualidad el estado general del paciente es bueno.

1.3.- AR-SCID: Caso clínico 3

1.3.1.- Descripción del caso clínico

El caso clínico 3 es una mujer de origen caucásico nacida en el año 2008 que al mes de vida sufrió un cuadro de gastroenteritis aguda y a los 5 fue ingresada por presentar candidiasis orofaríngea con 2 meses de evolución y refractaria al tratamiento. Durante el ingreso padeció una neumonitis por CMV. Es entonces cuando en el hospital de origen se le realizó un estudio inmunológico y se le diagnosticó una Inmunodeficiencia Severa Combinada en base a la linfopenia de células T y NK que presentaba. Posteriormente fue remitida a nuestro hospital para determinar la causa genética responsable.

Es la primera hija de padres consanguíneos (primos hermanos). Existía el antecedente de un feto muerto a los 8 meses de gestación por causas desconocidas.

Ante la gravedad de los síntomas, a la edad de 10 meses se le realizó un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). La evolución parecía buena, pero una infección por CMV a nivel de sistema nervioso central provocó un deterioro neurológico progresivo que acabó con su vida un año después del TPH.

1.3.2.- Datos inmunológicos

El análisis de los niveles séricos de inmunoglobulinas realizado en nuestro servicio a los 8 meses de vida mostró niveles indetectables de IgA e IgE, bajos de IgM y dentro del rango en el caso de la IgG, debido al tratamiento sustitutivo con inmunoglobulinas intravenosas (Tabla IV.3).

	P3	Valores de referencia (0-1 año)
IgG	708*	200-1000 mg/dL
IgA	<7	16-85 mg/dL
IgM	22	25-149 mg/dL
IgE	<2	0,1-15 UI/mL

Tabla IV.3. La IgG estaba compensada debido al tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas *, mientras que los niveles de IgA, IgM e IgE eran muy bajos o indetectables.

El estudio de las poblaciones linfocitarias mostraba un 47,5% de linfocitos T, con una casi completa ausencia de linfocitos T CD4 (0,7%) y un 42,6% de linfocitos T CD8, un 51,7% linfocitos B y unos niveles casi indetectables de células NK (0,1%) (Figura IV.8).

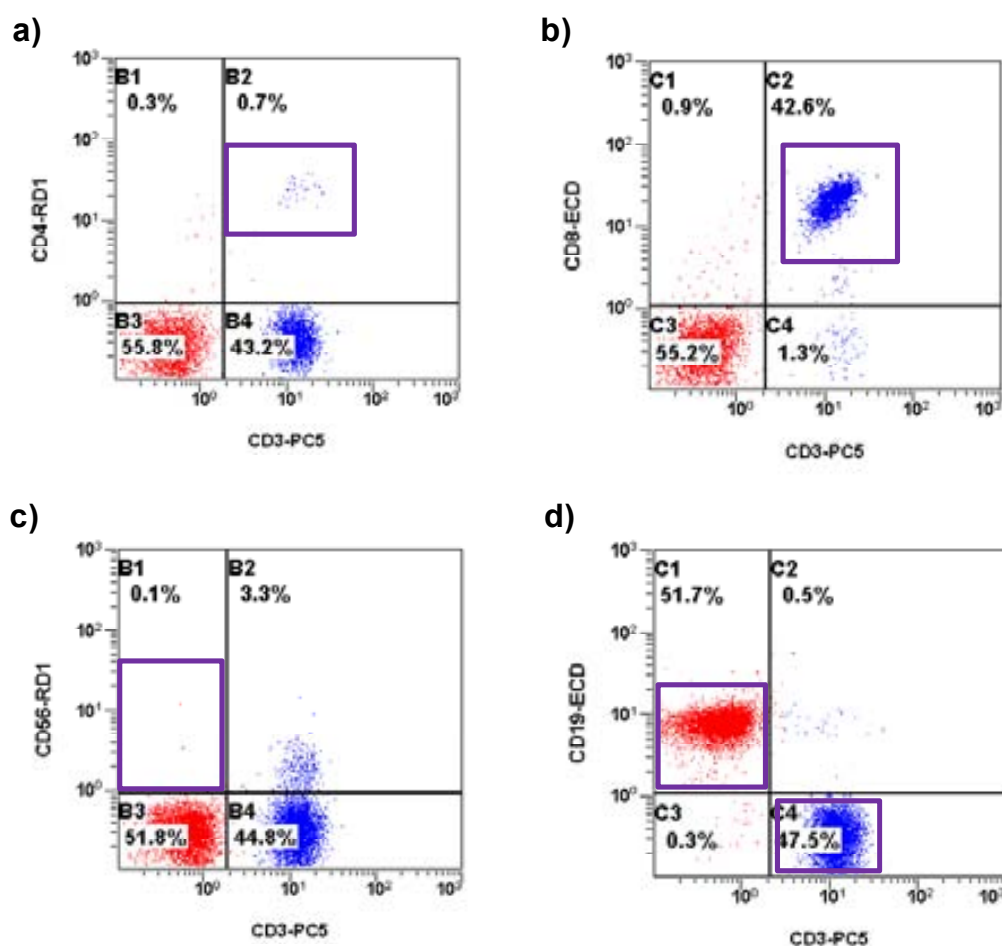


Figura IV.8. Análisis de las poblaciones linfocitarias. La paciente tenía un 47,5 % de linfocitos T (d), de los cuales sólo un 0,7% eran T CD4+ (a) y un 42,6% de T CD8+ (b); un 0,1% de células NK (c) y un 51,7% de linfocitos B (d).

El análisis de los marcadores CD25 y HLA-DR en las células T para determinar su grado de activación mostró que estaban activadas de forma temprana (CD25+), pero que no expresaban el marcador de activación tardía HLA-DR.

1.3.3.- Determinación de la señalización vía IL-2

Ante la sospecha de que podía tratarse de un caso de SCID T-B+NK- con implante de células T maternas, decidimos analizar la vía de señalización a través de la IL-2. No pudimos disponer de muestra fresca pre-trasplante para realizar este análisis. Sin embargo, antes del TPH sí que habíamos inmortalizado células B gracias a su transformación por el virus de Epstein Barr (EBV) donde si pudimos realizar este ensayo. Analizamos la fosforilación del factor de transcripción STAT5 (STAT5-P) en células de la paciente y de individuos control transformadas por EBV. El estímulo con IL-2 en los controles provocaba un incremento en STAT5-P, que se veía reflejado en un desplazamiento de la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, en las células de la paciente no había ningún desplazamiento, es decir que no había STAT5-P en respuesta a la IL-2 (Figura IV.9).

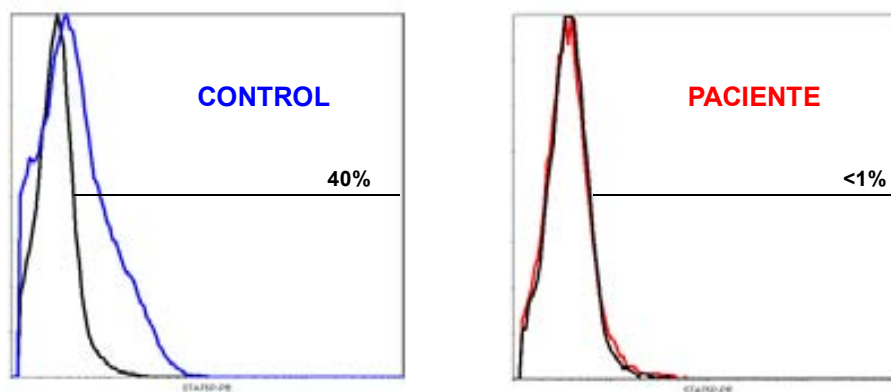


Figura IV.9. Determinación de STAT5-P en células EBV estimuladas con IL-2. Las células-EBV de la paciente, a diferencia de las del control, no respondían a la estimulación con IL-2 (10^5 U/mL) de manera adecuada.

Estos datos indicaban la existencia de un defecto en esta vía que podría estar provocado, probablemente, por alteraciones en la proteína JAK-3. Por este motivo, el siguiente paso fue analizar el gen que la codifica.

1.3.4.- Análisis del gen *JAK3*

El análisis del gen *JAK3* en la paciente mostró una inserción de 4 bases (GGCA) en la secuencia codificante del exón 10 en homocigosis (Figura IV.10). Esta inserción (c.1367insGGCA) es en realidad una duplicación de las 4 bases anteriores. Como resultado de esta alteración se producía un desplazamiento en la pauta de lectura de la proteína que llevaba a la aparición de un codón STOP más de 60 aminoácidos después (p.Thr456fsX520). Ambos padres presentaban en la secuencia de este exón una superposición de picos que indicaba que eran portadores de la alteración en heterocigosis (Figura IV.10). Esta mutación no ha sido reportada hasta la fecha.

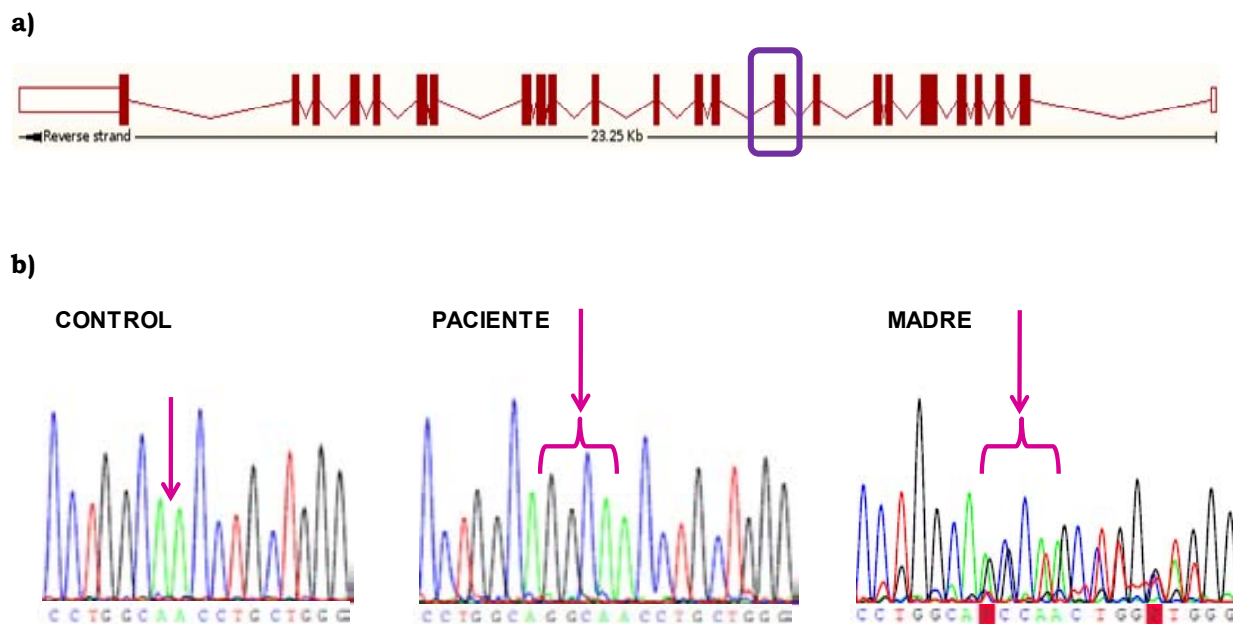


Figura IV.10. Esquema del gen *JAK3* (a). Análisis del exón 10 de *JAK3*. Se observaba la inserción de 4 bases (GGCA) en homocigosis en la paciente (c.1367insGGCA) y en heterocigosis en ambos progenitores (sólo se muestra la madre, b).

1.3.5.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos y evolución

La paciente fue sometida a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) a los 10 meses de vida. La fuente fue una unidad de sangre de cordón umbilical que presentaba una compatibilidad HLA 5 sobre 6. A pesar del tratamiento profiláctico, desde el inicio hubo múltiples complicaciones infecciosas post-TPH. En ningún momento la paciente mostró signos de recuperación inmunológica óptima, manteniéndose los linfocitos en niveles muy bajos. Medio año después del TPH se le detectó una infección por citomegalovirus (CMV), que no pudo ser controlada y que degeneró en una encefalopatía causando un deterioro neurológico progresivo que acabó con su vida, 1 año después del TPH.

1.4.- Disgenesia Reticular: Caso clínico 4

1.4.1.- Descripción del caso clínico

El caso clínico 4 es una niña de origen caucásico nacida en el año 2009, que a los 2 meses de vida sufrió una infección por *Bordetella parapertusis* que requirió ingreso en UCI. Los análisis realizados mostraron linfopenia y una grave neutropenia, agammaglobulinemia y ausencia de sombra tímica. Con estos datos fue diagnosticada de Inmunodeficiencia Severa Combinada. Se estudiaron algunos de los genes responsables (*JAK3*, *IL7RA* y *IL-2RGC*) descartándose mutaciones en todos ellos.

Paralelamente, se inició la búsqueda de donante de precursores hematopoyéticos para realizar un trasplante. A los 6 meses de vida fue trasplantada de una unidad de cordón umbilical siendo favorable la evolución hasta la fecha.

Es la tercera hija de padres consanguíneos (primos hermanos). No existen antecedentes de fallecidos en la infancia en la familia y sus hermanos son sanos.

Posteriormente el caso fue remitido a nuestro hospital y se nos envió muestra de los padres para intentar identificar la causa genética, ya que la paciente estaba trasplantada y se había establecido un quimerismo mixto entre donante y receptor.

1.4.2.- Datos inmunológicos

La paciente fue evaluada inmunológicamente en el hospital de origen durante su ingreso a los 2 meses de edad. Los datos facilitados muestran un 32% de linfocitos T (5% T CD4 y 18% T CD8), un 60% de linfocitos B y un 7% de células NK, de un total de $2.800 \cdot 10^6$ linfocitos/L (v.n.: $4.000-13.500 \cdot 10^6$ /L). El valor de neutrófilos era de $105 \cdot 10^6$ /L (v.n.: $1.000-8.500 \cdot 10^6$ /L), lo que indicaba una neutropenia muy severa. Ante todos estos datos, sobre todo a la grave neutropenia asociada a linfopenia, sospechamos de una forma de SCID denominada Disgenesia Reticular, cuyo gen responsable, denominado *AK2*, ha sido descrito recientemente (Lagresle-Peyrou, 2009; Pannicke, 2009) y que se asocia a sordera. Aunque inicialmente se pensó que la niña no era sorda, posteriormente, y mediante la técnica de potenciales evocados, se demostró que sí lo era.

1.4.3.- Análisis del mRNA de AK2

Puesto que no disponíamos de muestra pre-trasplante de la paciente para analizar el mRNA de *AK2*, estudiamos a ambos padres, ya que al ser consanguíneos, se presentaban como portadores obligados de la alteración. *AK2* presenta dos isoformas, *AK2A* y *AK2B*, resultantes de 2 procesamientos del mRNA diferentes. El análisis del mRNA de ambas isoformas en los padres mostró alteraciones en la secuencia que no se reproducían en los individuos control (Figura IV.11).

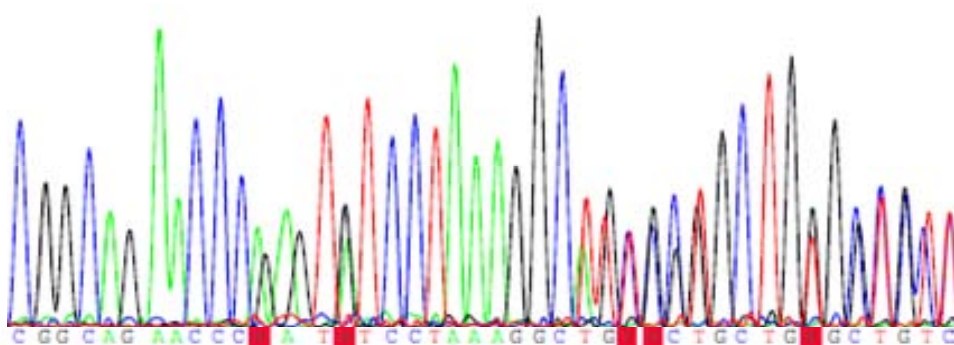


Figura IV.11. Análisis del mRNA de *AK2* en la madre de la paciente donde se observaban alteraciones en heterocigosis que se iniciaban en el exón 1 de ambas isoformas.

Estas alteraciones no parecían corresponder a ningún tipo de *splicing* alternativo, ya que se iniciaban a nivel del exón 1. Tampoco sabíamos si podía tratarse de una posible recombinación entre *AK2* y su pseudogen, con el que comparte gran homología. Puesto que la interpretación no era fácil, decidimos ampliar el estudio a nivel de DNA para intentar dilucidar qué es lo que estaba sucediendo.

1.4.4.- Análisis del gen AK2

El análisis del exón 1 del gen *AK2* en los padres de la paciente mostró una mutación en heterocigosis en la primera base del codón de inicio de la proteína: la Adenina estaba sustituida por una Guanina (c.A1T), lo que invalidaba el inicio de la traducción (ATG→GTG) y con ella, la expresión de la forma nativa de la proteína. En este caso, sí que pudimos analizar el exón 1 de *AK2* de la paciente pre-trasplante ya que en el centro donde se le realizó tenían este tipo de muestra. El estudio del DNA pre-trasplante de la paciente mostró la presencia de esta mutación en homocigosis (Figura IV.12) y estableció el diagnóstico definitivo de Disgenesia Reticular. En esta secuencia se podía observar un pequeño pico de A que correspondería a las células T de implante materno. Esta mutación ya había sido descrita en uno de los artículos originales, pero no en homocigosis (Pannicke, 2009).

a)



b)

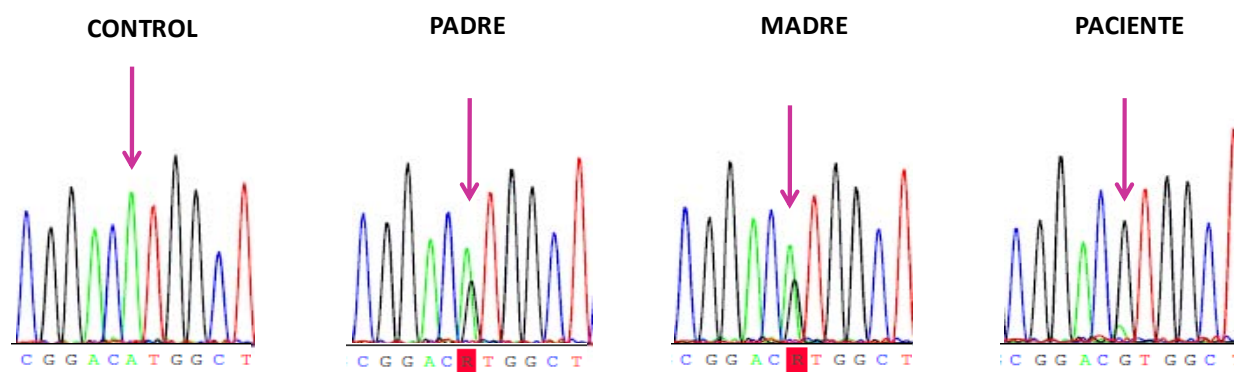


Figura IV.12. Esquema del gen *AK2* (a). Análisis del exón 1 de *AK2*. En el paciente había una sustitución de una A por una G en homocigosis (c.A1G) y en heterocigosis en ambos padres (A+G=R) (b).

1.4.5.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos y evolución

La paciente fue diagnosticada de SCID a los 2 meses de vida y rápidamente se inició la búsqueda de una fuente de progenitores hematopoyéticos compatible. A partir de entonces se mantuvo en aislamiento, se inició tratamiento sustitutivo con inmunoglobulinas y profiláctico. A los 6 meses se le realizó la infusión de progenitores de una unidad de cordón umbilical, siendo favorable la evolución.

El análisis de la quimera post-TPH indicaba una diferente proporción de células del donante y del receptor en función de la población estudiada. De manera que a los 7 meses post-TPH en los granulocitos el 84% pertenecían al donante y el 16% eran de la receptora, mientras que en los linfocitos el 35% eran del donante y el 65% de la receptora. Por ese motivo, nos planteamos analizar el exón 1 de *AK2* en estas poblaciones celulares independientes. Para ello, separamos neutrófilos y células mononucleares por gradiente de ficoll y secuenciamos *AK2*. En el DNA de los neutrófilos se identificaba mayoritariamente la secuencia nativa del gen, lo que indicaba que derivaban del donante; sin embargo, el DNA de las células mononucleares presentaba la

mutación junto con la secuencia nativa, ya que en esta fracción había células del donante (linfocitos T), pero también del receptor (linfocitos B y monocitos) (Figura IV.13).

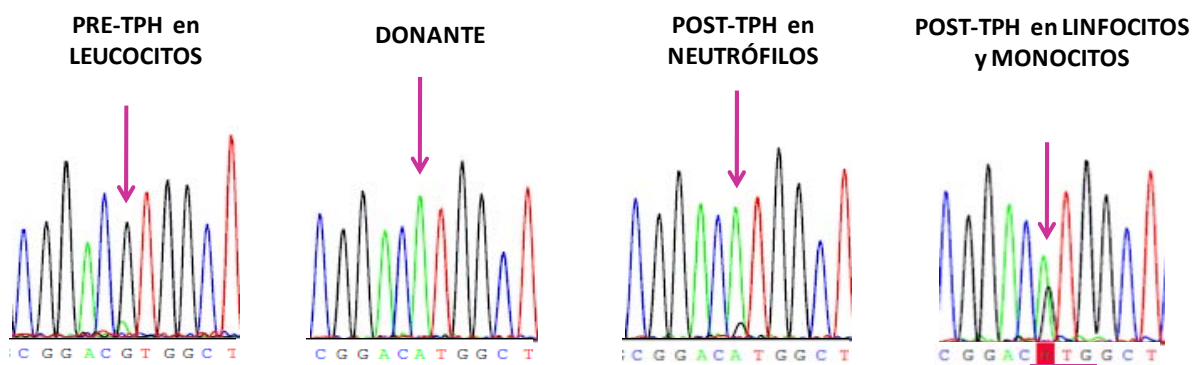


Figura IV.13. Análisis del exón 1 de AK2 antes y después del TPH y del donante. Los neutrófilos tras el TPH presentaban mayoritariamente la secuencia nativa (sólo se observaba un pequeño pico de G correspondiente a células del receptor), mientras que las células mononucleares (linfocitos y monocitos) tenían una secuencia mixta.

Es decir, que durante el implante de los leucocitos después del TPH sólo se sustituían aquellas poblaciones que estaban gravemente alteradas por la mutación (neutrófilos y linfocitos T), no siendo sustituidas aquellas en las que la mutación no parecía afectar a su desarrollo y/o funcionalidad (monocitos y linfocitos B) que continuaban siendo del receptor. Esta observación ya había sido descrita previamente por nuestro grupo en otro paciente con Disgenesia Reticular (De La Calle-Martin, 1997).

1.5.- Síndrome de Omenn: Casos clínicos 5 y 6

1.5.1.- Descripción de los casos clínicos

El caso clínico 5 es un varón de origen caucásico nacido en el año 2004, que desde el nacimiento presentaba una especie de dermatitis atópica severa. A partir del 2º mes de vida sufrió múltiples cuadros infecciosos: pielonefritis por *Citrobacter koseri*, síndrome febril sin foco, muguet oral, enteritis y sepsis. La exploración física no mostró masas localizadas ni megalias en ningún momento.

Los primeros análisis inmunológicos que realizamos a los 4 meses de vida mostraban una ausencia de linfocitos B y un bajo número de linfocitos T, mientras que el número de células NK no estaba alterado. Los niveles de inmunoglobulinas eran bajos en el caso de la IgG e indetectables en el resto. En el hospital de procedencia se le había iniciado un tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas. Con todos estos datos se estableció un diagnóstico de Inmunodeficiencia Severa Combinada.

Se trata del noveno hijo de padres consanguíneos. La pareja ya había sufrido la pérdida de dos lactantes (un niño de 2 meses y una niña de 1 mes y medio) por causas desconocidas. Además, la madre tenía dos hermanos que fallecieron a edades tempranas por causas no determinadas.

Ante la gravedad de los síntomas se decidió someter al paciente a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) de uno de sus hermanos que presentaba una compatibilidad HLA 9 sobre 10. Se realizó a los 10 meses de vida y el paciente se recuperó

normalmente. Sin embargo, un rebrote muy agresivo de la enfermedad acabó con su vida 23 meses después del TPH.

Posteriormente, la pareja tuvo otro hijo más en el año 2009. El caso clínico 6 fue un varón prematuro (31 semanas de gestación) que desde el nacimiento sufrió eritrodermia exfoliativa generalizada con descamación (Figura IV.14) acompañado de complicaciones sistémicas. Este paciente murió en el segundo mes de vida antes de poder iniciarse el acondicionamiento para el trasplante de progenitores hematopoyéticos de un hermano HLA idéntico.



Figura IV.14. Fotografía que muestra la eritrodermia exfoliativa generalizada que padecía el caso clínico 6.

1.5.2.- Datos inmunológicos

El análisis de los niveles séricos de inmunoglobulinas en los 2 hermanos realizado a los 4 meses y 1 mes de vida, respectivamente, mostró niveles indetectables IgA, IgM e IgE y normales de IgG, debido al tratamiento sustitutivo con inmunoglobulinas intravenosas (Tabla IV.4).

	P5	P6	Valores de referencia (0-1 año)
IgG	393*	333*	200-1000 mg/dL
IgA	<7	<7	16-85 mg/dL
IgM	<4	5	25-149 mg/dL
IgE	<2	<2	0,1-15 UI/mL

Tabla IV.4. La IgG estaba compensada debido al tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas *, mientras que los niveles de IgA, IgM e IgE eran muy bajos o indetectables en ambos hermanos.

Caso 5: El número absoluto de linfocitos en el caso 5 era muy bajo ($660 \cdot 10^6/L$; v.n.: $4.000-13.500 \cdot 10^6/L$). El estudio de las poblaciones linfocitarias mostraba una ausencia de linfocitos B (0%), una disminución de los linfocitos T (27%) con inversión del cociente CD4/CD8 (9% CD4+, 16% CD8) y unos niveles elevados de células NK (54,5%) (Figura IV.15).

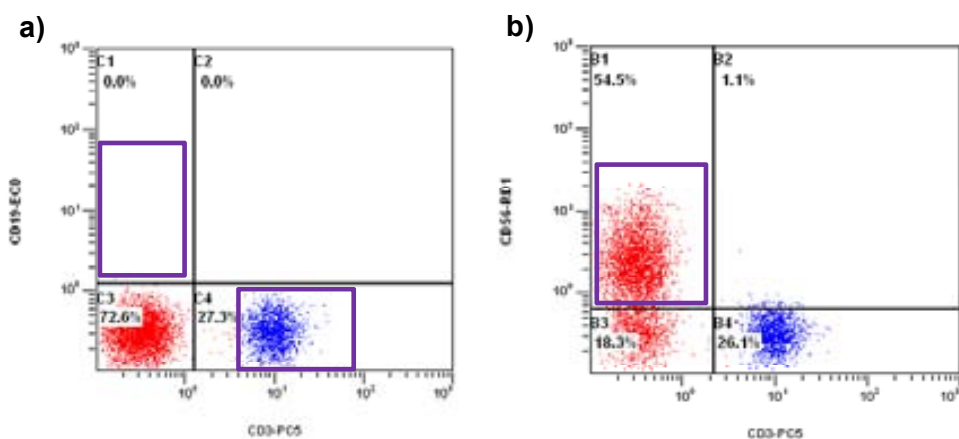


Figura IV.15. Análisis de las poblaciones linfocitarias. Este paciente presentaba un 27% de linfocitos T (a), un 0% de linfocitos B (a) y un 54,5% de células NK (b).

La ausencia de linfocitos B se corroboró con varios marcadores de superficie (CD19, CD20 y CD21). El análisis de los marcadores CD45RA y CD45RO en las células T, para determinar si se trataba de linfocitos inmaduros (CD45RA+) o de memoria (CD45RO+), mostró que más de un 92% de ellas eran de fenotipo memoria (linfocitos previamente activados), dato no esperable en un paciente de 4 meses de edad en el que sus células deberían ser mayoritariamente inmaduras (Figura IV.16).

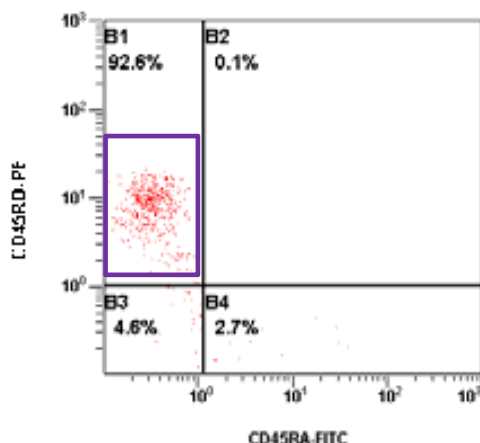


Figura IV.16. Estudio de marcadores de madurez. El 92,6% de los linfocitos T del paciente tenían un fenotipo memoria (CD45RO+).

Con estos datos podía tratarse de un SCID T-B-NK+ con implante materno de linfocitos T. Por ello, estudiamos el origen de estas células mediante un análisis de microsatélites de diversos cromosomas. El estudio descartó que los linfocitos T del paciente fueran de origen materno.

Caso 6: El análisis de las poblaciones linfocitarias en el caso 6 arrojó resultados muy diferentes al de su hermano, ya que presentaba linfocitosis ($14.950 \cdot 10^6/L$; v.n.: $4.000-13.500 \cdot 10^6/L$) con un 90% de linfocitos T sin inversión del cociente CD4/CD8 (55% T CD4+ y 35% T CD8+). El número de linfocitos B también era indetectable (0%) y el de células NK era de un 5% (Figura IV.17).

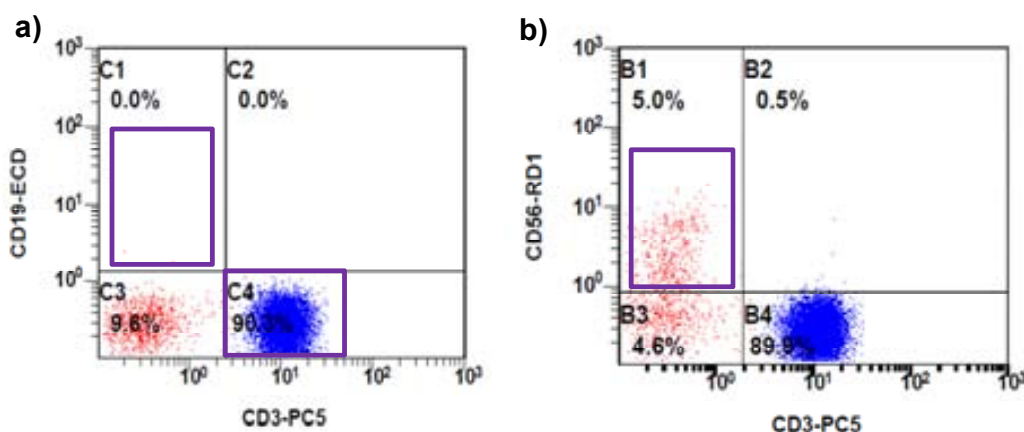


Figura IV.17. Análisis de las poblaciones linfocitarias. El paciente tenía un 90% de linfocitos T (a), un 0% de linfocitos B (a) y un 5% de células NK (b).

Sin embargo, sí que se repetía la anomalía en la distribución en los marcadores CD45RA (fenotipo inmaduro) y CD45RO (fenotipo memoria), siendo sus linfocitos T mayoritariamente de memoria. Además, un 2% eran CD25+ (activación temprana) y un 36% expresaban HLA-DR (activación tardía) (Figura IV.18).

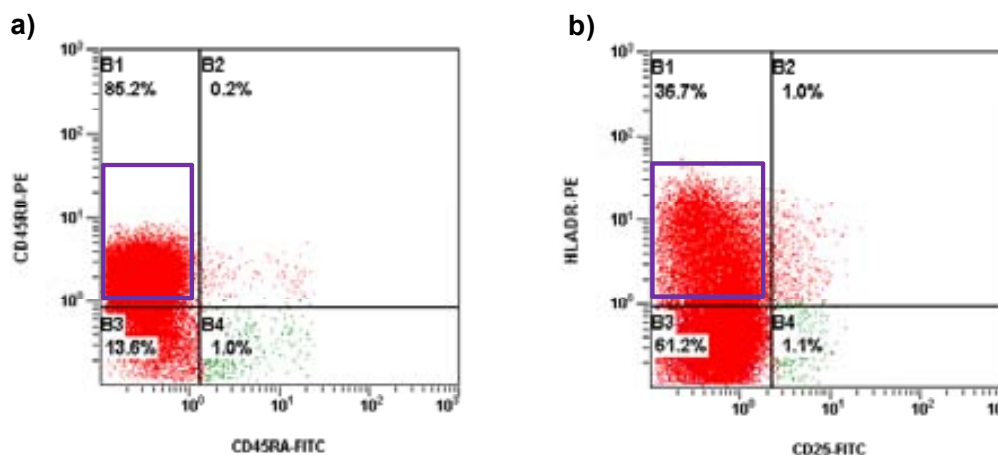


Figura IV.18. Estudio de marcadores de memoria y activación. El 85% de los linfocitos T del paciente tenían un fenotipo memoria (CD45RO+) (a). Más de un 36% de los linfocitos T estaban activados (HLA-DR+) (b).

Todos estos datos indicaban que los linfocitos T de los pacientes eran linfocitos T propios que habían sufrido una expansión periférica y que tenían un fenotipo autoreactivo. Estos datos contrastan con los obtenidos en el caso 2, en el que se observaban también linfocitos T con fenotipo memoria, pero que no estaban tan activados, y que, probablemente, eran de origen materno.

1.5.3.- Estudio de la capacidad proliferativa de los linfocitos T

Quisimos saber si las células T presentes en los pacientes proliferaban de manera adecuada al ser estimuladas o si por el contrario, eran anérgicas. Para ello enfrentamos los linfocitos T del caso clínico 5 a una amplia gama de mitógenos.

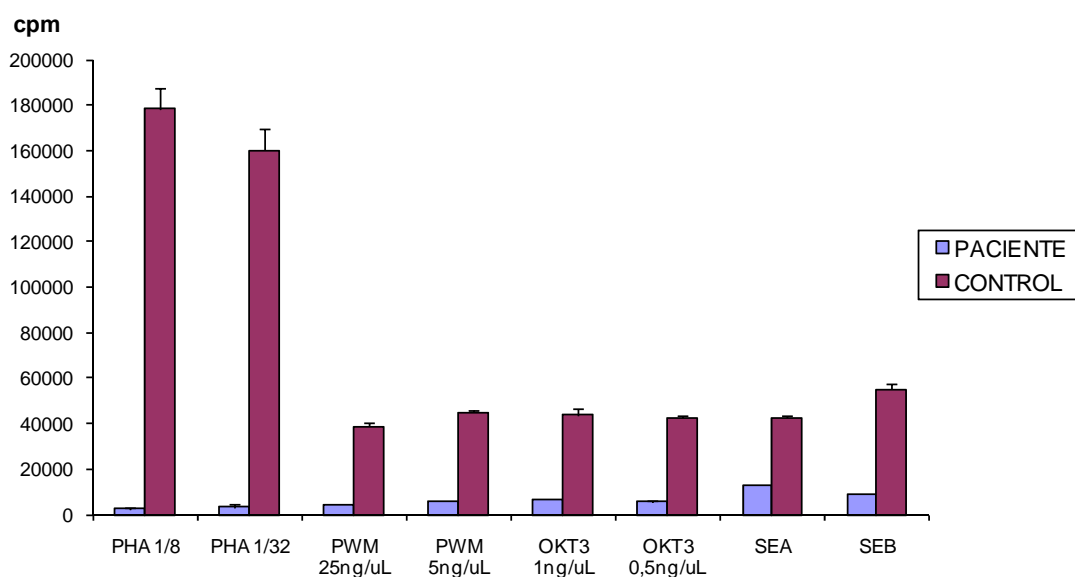


Figura IV.19. Estudio de proliferación. Los linfocitos T del paciente no respondían a ninguno de los mitógenos testados.

El estudio mostró una ausencia casi total de respuesta, respecto a los controles, frente a todos los estímulos probados: Fitohemaglutinina (PHA), Pokewed (PWN), Superantígeno de *Estafilococo aureus* A y B (SEA y SEB) y anti-CD3 (OKT3) (Figura IV.19). Por ello, podemos afirmar que las células T de los pacientes eran anérgicas.

1.5.4.- Análisis de los genes *RAG-1* y *RAG-2*

El diagnóstico genético fue realizado durante el desarrollo de la enfermedad del caso clínico 5. En el caso clínico 6 se llevó a cabo una mera confirmación de la existencia de la misma mutación.

Tal y como hemos comentado anteriormente, las manifestaciones clínicas del caso 5 eran compatibles con SCID. La forma más frecuente es la ligada al X, sin embargo, el hecho de que los padres fueran consanguíneos y de que hubieron perdido previamente a una niña, nos hicieron dejar a esta entidad en un segundo plano. Es por ello que decidimos analizar otras posibilidades basándonos, además de en la herencia AR, en que también presentaba linfocitos T activados y anérgicos, típicos del Síndrome de Omenn (OS), aunque faltaban otros signos característicos de esta enfermedad como la eritroderma exudativa generalizada, la hepatoesplenomegalia, la eosinofilia y los niveles elevados de IgE (indetectables en ambos hermanos).

Las mutaciones en los genes *RAG* pueden causar SCID o OS según el grado de afectación de la actividad recombinasa. Por esta dualidad decidimos estudiar los genes *RAG-1* y *RAG-2*. Toda la región codificante de ambos genes se encuentra en sus segundos exones, que son de gran tamaño. Por ello hubo que dividirlos en 4 fragmentos. En *RAG-2* no encontramos ninguna alteración. Sin embargo, en el gen *RAG-1* de ambos pacientes hallamos una delección del nucleótido T de la posición 631 en homocigosis (c.631delT). Tanto el padre como la madre de los pacientes eran portadores de la alteración (Figura IV.20). La delección provocaba un desplazamiento en la pauta de lectura y la aparición de un codón STOP, 27 aminoácidos más adelante (p.Glu174fsX27). Esta mutación fue descrita y ampliamente estudiada por Noordzij en el año 2000 (Noordzij, 2000).

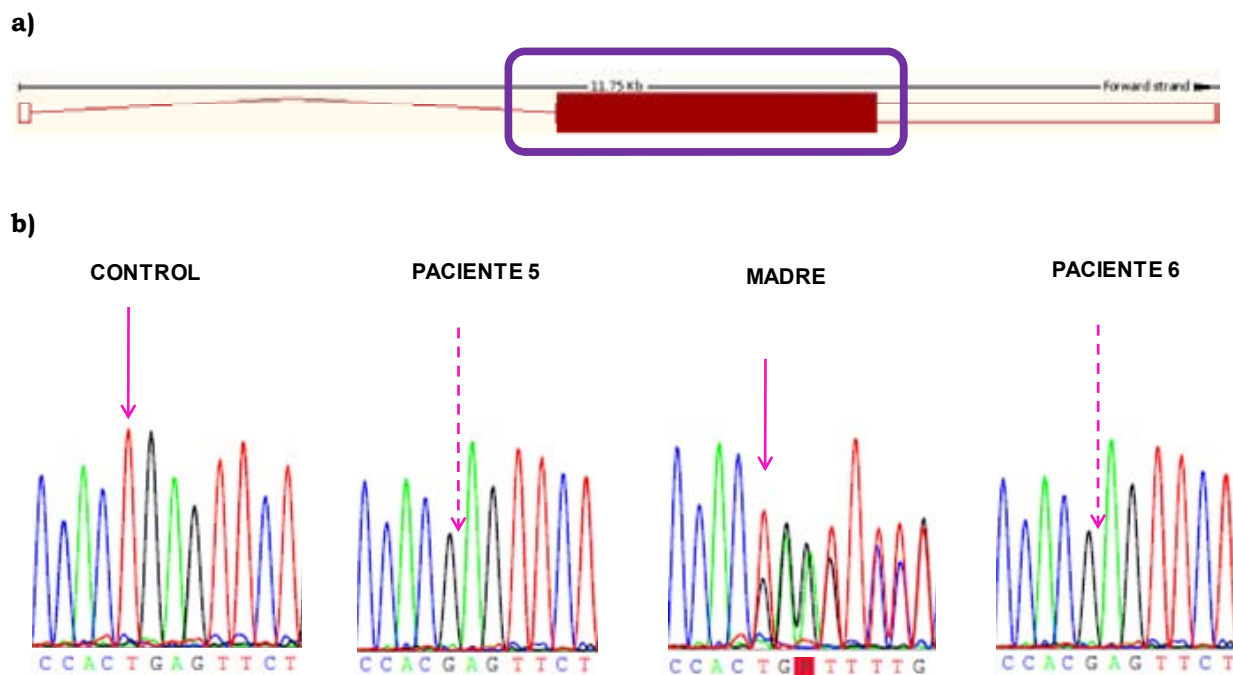


Figura IV.20. Esquema del gen *RAG-1* (a). Análisis del exón 2 de *RAG-1*. Los pacientes 5 y 6 presentaban una delección de una T (c.631delT) en homocigosis y la madre de ambos en heterocigosis (b).

1.5.5.- Estudio de individuos portadores

Una vez identificada la mutación, pasamos a analizar toda la familia. El análisis del exón 2 de *RAG-1* mostró que tanto los dos progenitores como tres de los seis hermanos vivos, concretamente las hermanas, eran portadores de la alteración. Los otros 3 hermanos sanos presentaban la secuencia nativa (Figura IV.21). Aunque no dispusimos de muestras biológicas para comprobarlo, todo hace suponer que los dos hermanos fallecidos anteriormente también presentaban la misma delección en homocigosis.

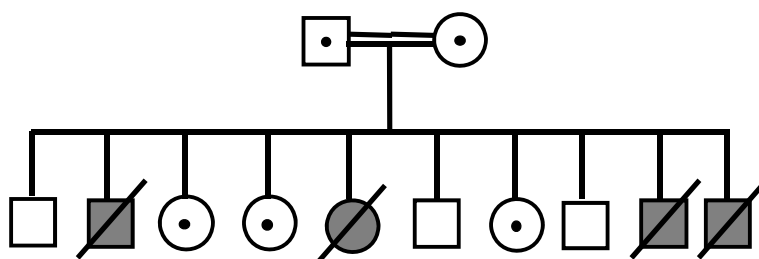


Figura IV.21. Árbol genealógico de los casos clínicos 5 y 6. Tanto los progenitores como las hermanas de los pacientes eran portadores de la alteración.

A principios del año 2010, fue remitida a nuestro servicio una niña de 3 días, prima hermana de los casos clínicos 5 y 6, que también presentaba eritrodermia exfoliativa generalizada y cuyo nacimiento había sido prematuro. Tenía linfopenia ($893 \cdot 10^6$ linfocitos/L; v.n.: $2.000 - 11.500 \cdot 10^6$ /L), con un 68% de linfocitos T (56% CD4+, 12% CD8+), un 11% de NK y una ausencia total de linfocitos B (0%). La IgG era normal (604 mg/dL) puesto que era de origen materno, pero la IgA y la IgM eran indetectables. Sin embargo, los niveles de IgE estaban muy

elevados (364 UI/mL). El análisis del gen *RAG-1* mostró que era homocigota para la misma mutación que sus primos: c.631delT. Con todos estos datos establecimos el diagnóstico de Síndrome de Omenn. El estudio de los padres, también consanguíneos, determinó que ambos eran portadores de la alteración en *RAG-1* (c.631delT).

1.5.6.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos y evolución

El tratamiento de todos estos casos es el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). El caso clínico 5 tenía un haplotipo HLA materno que no había heredado ninguno de sus hermanos. Sin embargo, al ser la madre homocigota para todos los *loci* HLA menos para el HLA-A, el paciente pudo recibir un trasplante de un hermano compatible 9 sobre 10. La evolución del trasplante fue excelente, tanto desde el punto de vista clínico como de implante de linfocitos, con una quimera total a los 25 días del TPH. A los 2 meses fue dado de alta. A los 21 meses post-TPH el paciente fue ingresado por una fiebre que no remitía y se le detectó una adenopatía laterocervical y un infiltrado alveolo-intersticial en ambos pulmones. El análisis del quimerismo en leucocitos de sangre periférica mostró una ausencia de células del donante, lo que sugería una pérdida del implante. Es importante resaltar que el paciente había perdido los linfocitos B, mientras que los niveles de IgE sérica estaban muy elevados (364 UI/mL) (Figura IV.22). La enfermedad parecía haber reaparecido, pero esta vez como un Síndrome de Omenn, tal y como indicaban los altos niveles de IgE. El paciente falleció 23 meses después del TPH por fallo multiorgánico provocado por un infiltrado linfocitario masivo.

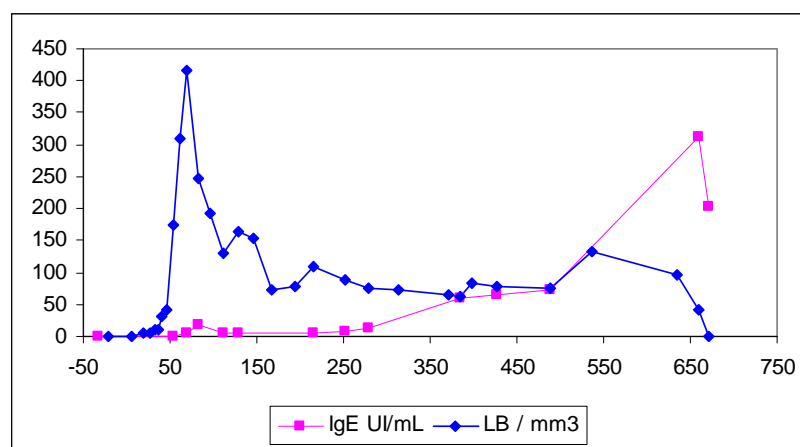


Figura IV.22. Evolución de los linfocitos B del paciente y de los niveles séricos de IgE. A los 21 meses post-TPH (630 días) había una disminución de los linfocitos B (LB) y un aumento de la IgE.

El caso clínico 6 falleció antes de poder iniciar el tratamiento acondicionador para el TPH de un hermano HLA idéntico (10 sobre 10). La prima de los casos clínicos 5 y 6 también falleció, en este caso tras iniciarse el tratamiento acondicionador para el TPH que iba a realizársele a partir de un donante no emparentado con identidad 10 sobre 10.

2.- Síndromes de hiper-IgM

Los Síndromes de hiper-IgM son un grupo de inmunodeficiencias primarias caracterizadas por infecciones recurrentes por gérmenes patógenos o saprófitos, con niveles séricos muy bajos de IgG, IgA e IgE y normales o elevados de IgM (Notarangelo, 1992).

Son consecuencia de distintos defectos moleculares que llevan a un fallo en la maduración de las células B y, por tanto, en la generación del repertorio de anticuerpos. La más frecuente es la forma ligada al X (XHIM o HIGM-1; MIM: 308230) que está causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína CD40 ligando (CD40L) y que se expresa en la superficie de las células T CD4⁺ activadas. Las mutaciones en la molécula con la que interacciona CD40L, denominada CD40 y que se expresa constitutivamente en las células B, causan el HIGM-3 (MIM: 606843). El HIGM-2 (MIM: 605258) y el HIGM-5 (MIM: 608106) están causados por mutaciones en los genes que codifican las enzimas AID (*activation-induced cytidine deaminasa*) y UNG (*Uracil DNA glycosilase*) respectivamente, y que están selectivamente expresadas en las células B de los centros germinales. Se desconoce cuál es la causa del HIGM-4 (MIM: 608184) aunque se supone que se trata de un defecto posterior a la actividad de la enzima AID relacionado con la reparación del DNA. Todas estas otras formas tienen una herencia autosómica recesiva.

2.1.- XHIM: Casos clínicos 7 y 8

2.1.1.- Descripción de los casos clínicos

Presentamos el caso de dos hermanos varones de origen caucásico, hijos de padres no consanguíneos, nacidos en el año 1999 (P7) y en el 2002 (P8), que habían sufrido infecciones recurrentes acompañadas de neutropenia severa desde el primer año de vida.

El hermano mayor había padecido bronquitis recurrentes y tres episodios severos de neumonía, así como otitis y diarreas intermitentes desde los 18 meses de edad. El primer análisis de los niveles séricos de inmunoglobulinas realizado a los 3 años de edad, indicaba niveles bajos de IgG (123 mg/dL), indetectables de IgA (<6 mg/dL) y elevados de IgM (462 mg/dL). Fue catalogado como un Síndrome de hiper-IgM y se inició un tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas. Para corregir la neutropenia se administró G-CSF. Previamente se había sospechado de enfermedad celíaca, aunque posteriormente no se confirmó el diagnóstico.

El hermano menor había sufrido bronquitis con episodios de broncoespasmo a los 6 meses de edad. En la determinación de las inmunoglobulinas se observaron niveles muy bajos de IgG (51 mg/dL), indetectables de IgA (<6 mg/dL) y los de IgM se encontraban dentro de la normalidad (67 mg/dL). Los bajos niveles de IgG e IgA, junto con la historia clínica de su hermano, fueron decisivos para instaurar el tratamiento sustitutivo con inmunoglobulinas intravenosas con tan sólo 6 meses de vida. Al igual que el hermano mayor, padecía neutropenia por lo que también se le administró G-CSF.

Debido a la gravedad de la enfermedad, en el año 2004 se inició el estudio para llevar a cabo un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) por lo que fueron remitidos a nuestro hospital.

2.1.2.- Datos inmunológicos

Cuando los dos hermanos fueron derivados a nuestro hospital ya estaban recibiendo terapia sustitutiva con inmunoglobulinas intravenosas, por lo que los niveles de IgG estaban dentro de la normalidad. Sin embargo, los de IgA e IgE eran muy bajos o indetectables. En el hermano mayor se observaban unos niveles muy altos de IgM, cosa que no ocurría en el pequeño (Tabla IV.5). Este hecho es debido, probablemente, al temprano inicio de la terapia en este último.

	P7	P8	Valores de referencia (1-5 años)
IgG	480*	397*	420-1200 mg/dL
IgA	<7	8	25-154 mg/dL
IgM	895	84	35-192 mg/dL
IgE	<2	<2	3-56 UI/mL

Tabla IV.5. La IgG estaba compensada debido al tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas *, mientras que los niveles de IgA e IgE eran indetectables. Los niveles de IgM en el hermano mayor estaban muy incrementados pero en el menor se mantenían dentro de rangos de normalidad.

El estudio de las poblaciones linfocitarias no mostró ninguna alteración. El hermano mayor (P7) presentaba un 68% de linfocitos T (51% de T CD4+ y 14% de T CD8+), un 22% de linfocitos B y un 8% de células NK; y el hermano menor (P8) tenía un 69% de linfocitos T (53% de T CD4+ y 13% de T CD8+), un 25% de linfocitos B y un 3% de células NK.

2.1.3.- Evaluación de la expresión de CD40L

Puesto que se trataba de dos pacientes varones hijos de padres no consanguíneos, sospechamos de un Síndrome de hiper-IgM ligado al X (XHIM). La prueba diagnóstica para esta enfermedad es la evaluación de la expresión de CD40L, la proteína alterada en el XHIM.

Esta prueba consiste en la estimulación de las células mononucleares con PMA y ionomicina durante 4 horas y el posterior marcaje con anticuerpos monoclonales, entre ellos el dirigido contra CD40L. Las células que expresan CD40L son las células T CD4+ activadas. La estimulación con PMA y ionomicina es muy agresiva y provoca la disminución de la expresión de la molécula CD4. Así, para determinar la expresión de CD40L en las células T CD4+ activadas, se analizaron las células CD3+ que eran negativas para el marcador CD8. En el individuo control, estas células CD3+CD8- expresaban CD40L, mientras que las células CD3+CD8- de los pacientes mostraban una incapacidad para expresarlo (Figura IV.23).



Figura IV.23. Expresión de CD40L en las células T CD4+ tras la estimulación con PMA + ionomicina. La expresión era nula en los dos pacientes.

Las células del padre y de la abuela materna expresaban correctamente CD40L, mientras que en la madre se observaban dos poblaciones de linfocitos T CD4+: unos que expresaban CD40L y otros que no, en una proporción aproximada del 50% (Figura IV.24). Este hecho se explica por la inactivación aleatoria del cromosoma X en estas células, y también a que CD40L no influye en la maduración de los linfocitos T. Por ello, la alteración se manifiesta en sangre periférica.

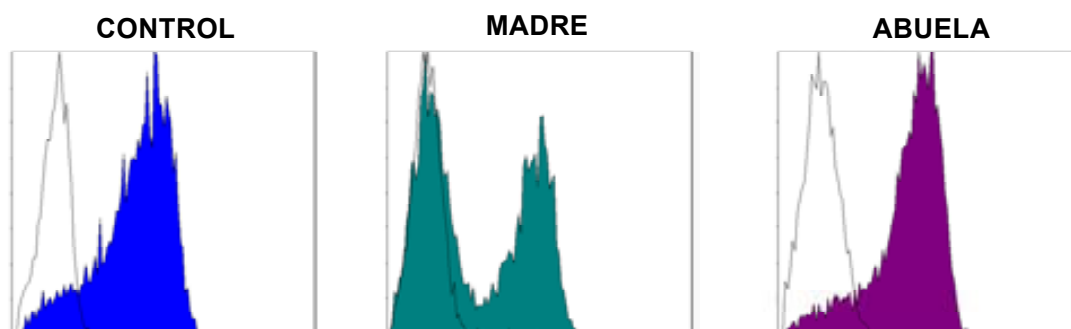


Figura IV.24. Expresión de CD40L en las células T CD4+ tras la estimulación con PMA + ionomicina. La expresión en la abuela materna era equivalente a los individuos control, mientras la de la madre tenía una forma bimodal.

Para comprobar si había habido estimulación en las células de los pacientes, se tiñeron con el marcador de activación CD69. Las células estimuladas de los pacientes se marcaban con CD69 de igual modo que las de los controles (Figura IV.25), por lo que se puede decir que las células T CD4+ de los pacientes se activaban adecuadamente, pero que no eran capaces de expresar CD40L.



Figura IV.25. Expresión de CD69 en las células T CD4+ después de la estimulación con PMA + ionomicina. CD69 se expresaba en los pacientes de manera equivalente a los individuos control.

2.1.4.- Análisis del mRNA de CD40L

Para determinar si esta ausencia en la expresión de CD40L se justificaba por alteraciones a nivel genético pasamos a estudiar el gen *TNFSF5* y comenzamos por su expresión a nivel de mRNA. Para analizar el mRNA se repitió la estimulación con PMA y ionomicina durante 3 horas y se extrajo el RNA total. A continuación se hizo una retrotranscripción seguida de amplificación (RT-PCR) para CD40L.

El resultado de la RT-PCR de CD40L en los individuos control fue una banda de aproximadamente 1 Kb. Esta banda era indetectable en los pacientes (Figura IV.26).

Para comprobar que la extracción de RNA y el proceso de RT-PCR en los pacientes habían sido correctos, hicimos una RT-PCR de un gen control y vimos que sí había amplificación y que esta era cualitativa y cuantitativamente correcta (Figura IV.26). Entonces, pasamos a estudiar el gen *TNFSF5* a partir de DNA genómico.

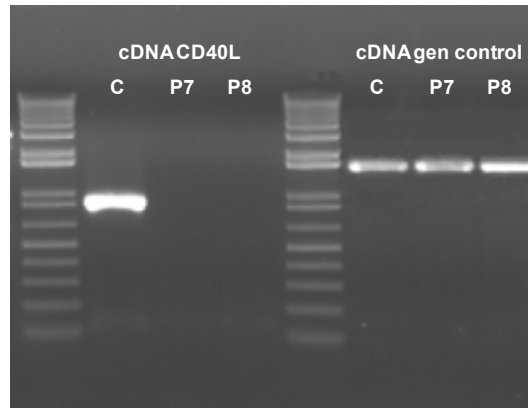


Figura IV.26. Análisis del cDNA de CD40L y del gen control *TNFRSF6* (Fas). En los pacientes no había amplificación de cDNA de CD40L, a pesar del correcto procesamiento de las muestras.

2.1.5.- Análisis del gen *TNFSF5*

En primer lugar, amplificamos los 5 exones del gen por separado incluyendo las zonas dadoras y receptoras de *splicing*. En los pacientes sólo había amplificación del exón 5 (Figura IV.27). Esto nos indicaba que había una delección muy grande que incluía la mayor parte del gen y que afectaba total o parcialmente a los 4 primeros exones.

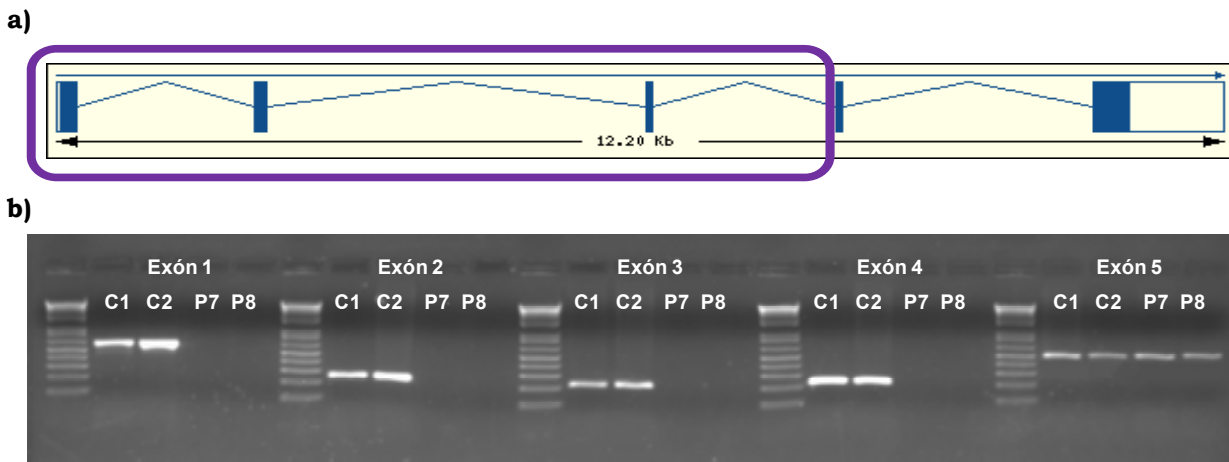


Figura IV.27. Esquema del gen *TNFSF5* (a). Amplificaciones de los 5 exones de *TNFSF5*. En los pacientes sólo había amplificación del último de ellos (b).

Intentamos delimitar la delección haciendo combinaciones entre estos *primers*, por ejemplo con 1F y 4R, pero no fue posible detectar productos de amplificación en ninguno de los dos pacientes. A continuación pasamos a analizar las regiones intrónicas adyacentes. Para ello, diseñamos *primers* a lo largo de todo el intrón 4, del exón 4 y del final del intrón 3 (Figura IV.28).

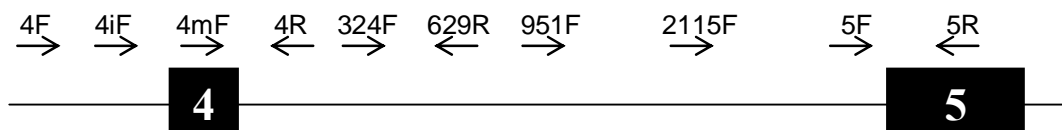


Figura IV.28. Esquema de la unión de los primers diseñados en las regiones intrónicas.

En ambos pacientes había amplificación con aquellos *primers* que se unían al intrón 4 (2115F, 951F y 324F) y también con aquellos que lo hacían específicamente al exón 4 (4mF) o a la zona aceptora de *splicing* del intrón 3 (4iF), pero no con el *primer* que se unía 30 bp antes de dicha zona (4F) (Figura IV.29).

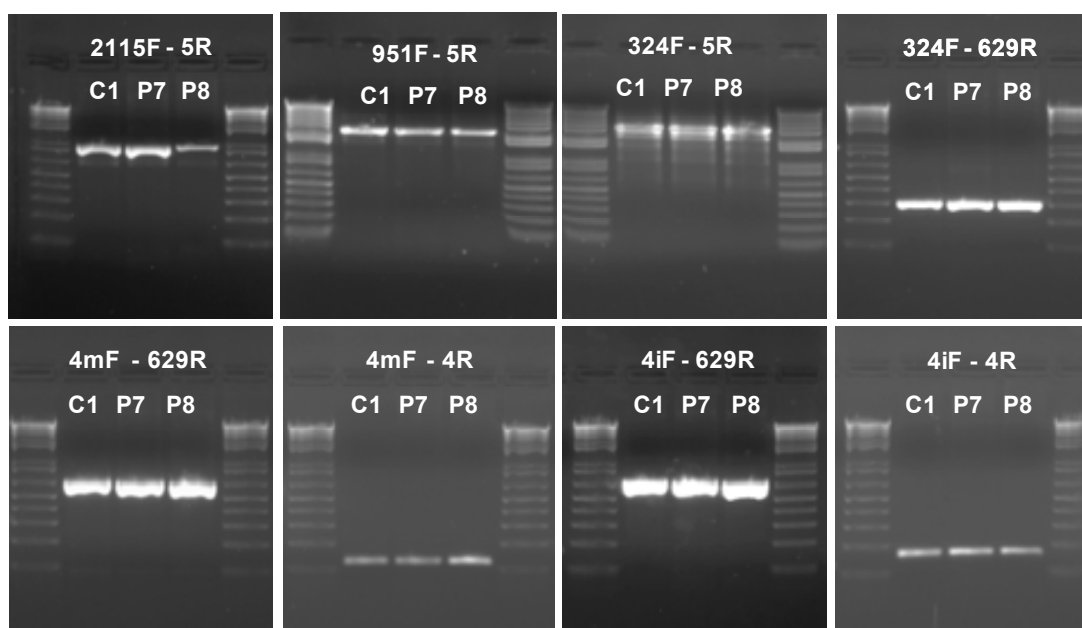


Figura IV.29. Amplificaciones con combinaciones de los *primers* citados anteriormente. En los pacientes había amplificación con todos ellos.

Estos datos nos indicaban que los pacientes conservaban el exón 5, el intrón 4 y todo el exón 4, ya que el *primer* que cubría las bases situadas justo antes del exón 4 (4iF) sí que se unía. Se secuenció el exón 4 y se comprobó que la secuencia era correcta. Por lo tanto, el extremo distal de la delección estaba situado justo antes de la zona aceptora de *splicing* del intrón 3.

Después analizamos la región promotora para intentar delimitar el extremo proximal de la delección. En estas amplificaciones no podíamos utilizar un control adecuado, ya que nos vimos obligados a usar el *primer reverse* del exón 1 (1R) en los controles y el del exón 4 (4R) en los pacientes, al ser el *primer reverse* que se encontraba más próximo a la delección. A diferencia de lo ocurrido en los controles, no hubo amplificaciones con ninguno de los *primers* situados a 1 y 3 Kb del inicio del exón 1 en los pacientes (Figura IV.30).

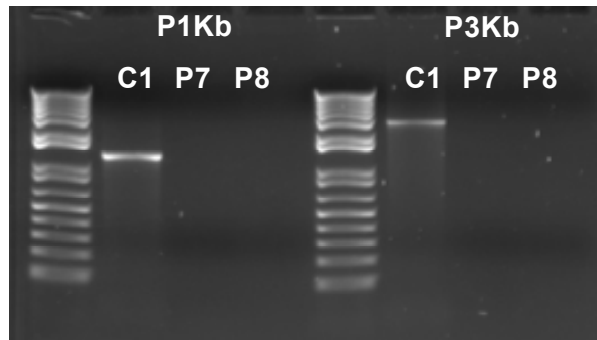


Figura IV.30. Amplificaciones con los 2 *primers* situados en la región promotora (P1Kb y P3Kb). No había amplificación en los pacientes con ninguno de ellos.

Para determinar si la delección implicaba a una extensa región del cromosoma X amplificamos un exón del gen *SAP/SH2D1A*, ya que este gen se encuentra a 5' de *TNFSF5*, en una posición más centromérica. En ambos pacientes hubo amplificación (Figura IV.31). Además, amplificamos un exón del gen inmediatamente anterior a *TNFSF5* denominado *VGLL-1* (*Vestigial like 1*) cuya función es desconocida y que se encuentra a algo menos de 100 Kb de él. También hubo amplificación en los dos pacientes (Figura IV.31).

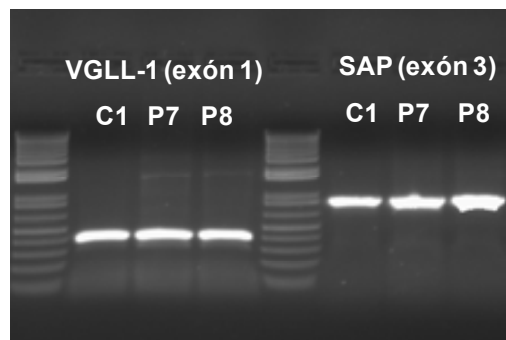


Figura IV.31. Amplificaciones de dos genes situados en la región proximal de la delección. Existía amplificación de estos genes en los 2 pacientes.

Por lo tanto, la delección abarcaba desde el final del intrón 3 del gen *TNFSF5* hasta un punto no determinado situado por delante de las regiones reguladoras de dicho gen. Anteriormente se había descrito una gran delección de este gen por encima del exón 4, aunque no pudimos saber si se trataba exactamente de la misma alteración (Seyama, 1998).

2.1.6.- Estudio de individuos portadores

Estos pacientes pertenecían a una familia numerosa (Figura IV.32), por lo que era muy importante realizar el estudio de posibles mujeres portadoras de la enfermedad. Los tíos maternos no estaban afectados, pero las tías maternas, o alguna de ellas, podrían ser portadoras de la enfermedad y transmitirla a sus hijos varones. Por ese motivo, se amplió el estudio a las hermanas de la madre de los pacientes.

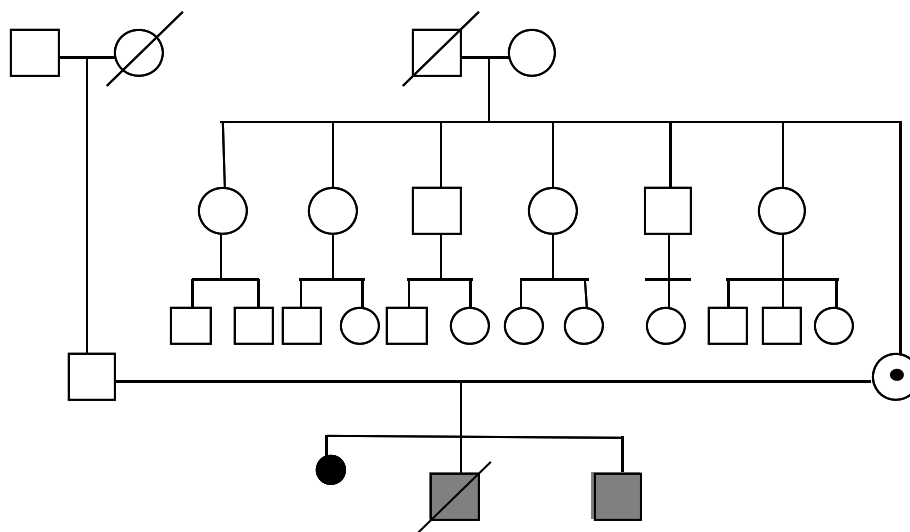


Figura IV.32. Árbol genealógico de los casos clínicos 7 y 8. Sólo la madre de los pacientes parecía ser portadora de la deleción (mutación *de novo* en la madre).

Ante la imposibilidad de detectar esta mutación en heterocigosis mediante técnicas de PCR, decidimos analizar a las cuatro tías maternas mediante la prueba funcional para la determinación de la expresión de CD40L ya que esta prueba nos había permitido reconocer a la madre de los pacientes como portadora de la deleción. Estimulamos las células mononucleares de las cuatro tías con PMA y ionomicina y vimos que en todas ellas había una expresión de CD40L equivalente a la de los individuos control, sin que se reprodujera la expresión bimodal observada en la madre (Figura IV.33).

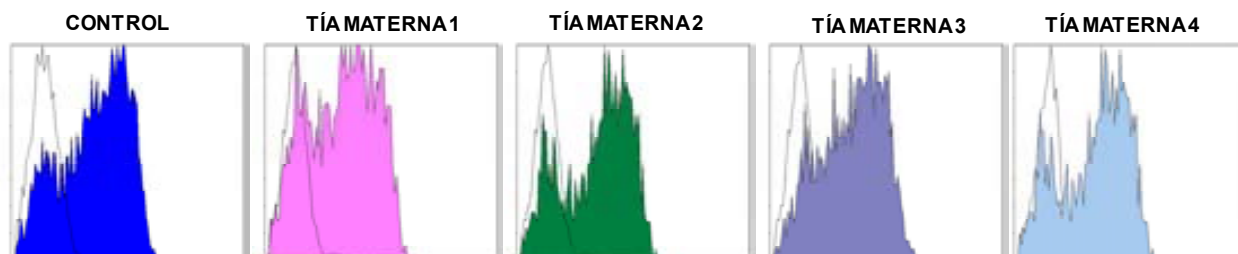


Figura IV.33. Expresión de CD40L en las células T CD4⁺ tras la estimulación con PMA + ionomicina. Las cuatro tías maternas expresaban CD40L a niveles equivalentes al individuo control.

Todas estas observaciones indicaban que se trataba de una mutación *de novo* en la madre, sin embargo no podíamos descartar a sus hermanas como portadoras al no disponer de un estudio genético que lo avalara. Por ello, decidimos indagar en el origen de la deleción para ver si nos aportaba más datos.

2.1.7.- Determinación del origen de la deleción

Para detectar el origen de la deleción, estudiamos polimorfismos en el gen *TNFSF5* que nos permitieran diferenciar los alelos de origen materno de los de origen paterno. Con este fin se secuenciaron los exones 4 y 5 de los dos pacientes, de su madre, sus tías maternas y la abuela materna. En el caso del abuelo materno no disponíamos de muestra por haber fallecido.

En las secuencias del exón 5 correspondientes a la madre de los pacientes, a dos de las cuatro tías y a la abuela materna se encontró una posición heterocigota (Figura IV.34). El cambio nucleotídico c.G655A originaba un cambio en la secuencia primaria de la proteína a nivel del dominio extracelular (p.Gly219Arg), que había sido ya descrito (Lin, 1996).

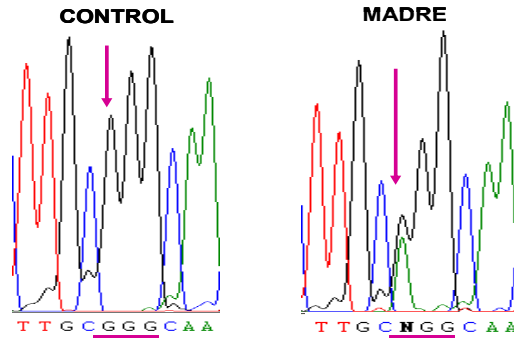


Figura IV.34. Análisis del exón 5 de *TNFSF5*. El polimorfismo c.G655A estaba presente en la madre de los pacientes.

Considerando que se trataba de un polimorfismo muy poco frecuente, la madre de los pacientes debió heredarlo de su madre (abuela materna). Por lo tanto, el otro cromosoma con la secuencia nativa provenía de su padre (abuelo materno). El único cromosoma X presente en los varones se hereda de la madre, y en él, los dos pacientes tenían una G en la posición 655. Es decir, que el cromosoma con la G en la posición 655, procedente del abuelo materno, es sobre el que se produjo la deleción, y es el que aparece en la madre y en los dos pacientes (Figura IV.35).

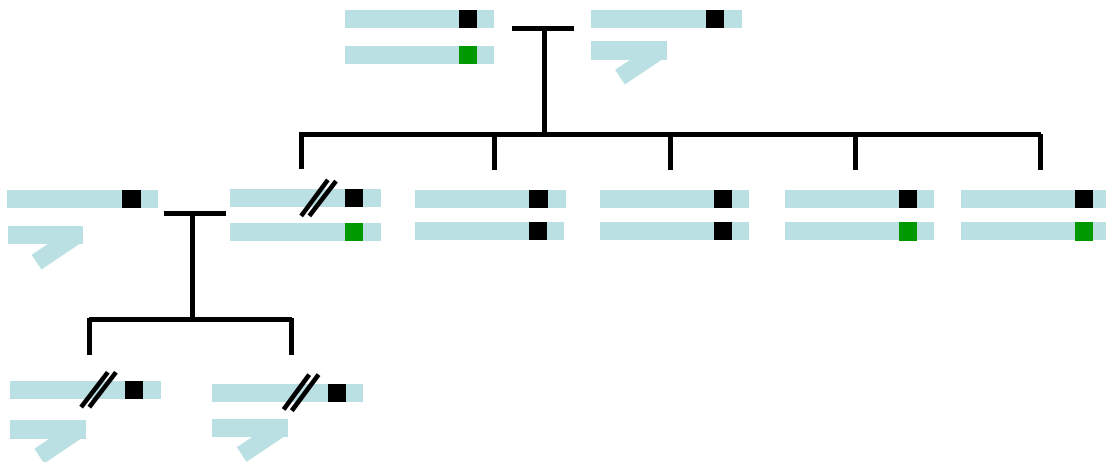


Figura IV.35. Esquema de las características de los cromosomas X en esta familia: en negro el nucleótido G en la posición 655 y en verde la A. Las dos barras (//) corresponden a la deleción.

El abuelo materno no padecía la enfermedad, habiendo fallecido a una edad avanzada por causas no relacionadas. Puesto que la madre era portadora de la deleción, suponemos que ésta se debió originar durante el proceso de formación del espermatozoide a partir del cual se concibió la madre.

Como sabíamos que la deleción derivaba del abuelo materno, podíamos descartar totalmente a la abuela materna como individuo portador. Y puesto que la deleción se produjo con toda

probabilidad durante la espermatogénesis, podíamos descartar a las tías maternas de los pacientes como portadoras de la enfermedad, lo que coincidía con los datos de expresión de CD40L.

No está descrito como afecta el cambio p.Gly219Arg a la funcionalidad de la proteína CD40L. Pero si tenemos en cuenta que la única proteína CD40L que expresaba la madre era la que tenía la sustitución p.Gly219Arg y que no padecía ninguna sintomatología, podemos deducir que esta mutación no afecta a la funcionalidad de la proteína CD40L, al menos de manera crítica. Asimismo, basándonos en las citometrías obtenidas en las pruebas de expresión de CD40L, podemos decir que los niveles de expresión del CD40L^{219Arg} son equivalentes a los de la proteína CD40L nativa, ya que en la abuela materna, así como en las dos tías heterocigotas, sólo se observaba un pico de expresión que era totalmente equivalente al de los individuos control.

2.1.8.- Estudio del polimorfismo c.G655A en la población española

Finalmente, quisimos analizar la presencia del polimorfismo en nuestra población a través del estudio de 50 varones y 50 mujeres sanos no relacionados entre ellos. No encontramos esta sustitución ni en homocigosis ni en hemicigosis. Sin embargo, hallamos 2 mujeres portadoras de dicho polimorfismo. Por tanto, la frecuencia alélica de c.G655A en nuestra población era de 2 por cada 150 cromosomas estudiados (Tabla IV.6).

	Mujeres	Hombres	Frecuencia
A	2	0	2/150
G	98	50	148/150

Tabla IV.6. Frecuencia alélica del nucleótido 655 en la población española.

2.1.9.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos y evolución

Debido a la gravedad de la enfermedad se decidió someter a ambos pacientes a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). El estudio HLA de los hermanos indicó que eran distintos entre ellos y que carecían de donante compatible en la familia. Por ello, se inició la búsqueda de uno no emparentado. La presencia de un alelo HLA poco frecuente (HLA-A*02:05) retrasó el hallazgo. Durante la espera ambos hermanos sufrieron una diarrea severa por Criptosporidios debido a la ingesta accidental de agua estancada. Recibieron tratamiento con paramomicina que permitió su recuperación, al menos de forma aparente.

En julio de 2007 el hermano mayor fue sometido a un TPH procedente de un donante no relacionado con una identidad HLA 9 de 10. No presentó ni reacción transfusional ni enfermedad del injerto contra el huésped. Diez días después del trasplante se detectó *Cryptosporidium* en heces y empezó un empeoramiento progresivo que le llevó a la muerte cincuenta días después de habersele realizado el TPH.

Por voluntad expresa de la familia, la búsqueda de donante no relacionado para el hermano menor fue interrumpida. En la actualidad continúa con la terapia sustitutiva de inmunoglobulinas intravenosas y G-CSF y se ha iniciado un proceso de selección de embriones HLA compatibles sanos.

3.- Agammaglobulinemia ligada al X

Las agammaglobulinemias son un grupo de inmunodeficiencias primarias caracterizadas por una profunda deficiencia de todos los isotipos de inmunoglobulinas, asociada a una ausencia de linfocitos B y células plasmáticas. La mayoría de los pacientes debutan con infecciones bacterianas graves a edades muy tempranas.

La Agammaglobulinemia ligada al X (XLA; MIM: 300755) fue la primera inmunodeficiencia primaria reportada allá por los años 50 (Bruton, 1952). Fue el coronel Odgen Bruton el que mediante una electroforesis del suero observó una ausencia total de inmunoglobulinas. Es el prototipo de inmunodeficiencia primaria y fue la primera en la que se identificó el defecto responsable: una tirosina kinasa citoplasmática que fue designada con el nombre de tirosina kinasa de la Agammaglobulinemia de Bruton (BTK) (Tsukada, 1993; Vetrie, 1993). A pesar de que la proteína Btk también se expresa en otros linajes hematopoyéticos aparte de las células B, no existen evidencias demostradas de que defectos en otras células contribuyan al fenotipo XLA. Su incidencia es de 1 cada 100.000 nacimientos.

Las agammaglobulinemias autosómicas recesivas (MIM: 601495) tienen las mismas manifestaciones clínicas y analíticas: deficiencia de todos los isotipos de Igs y ausencia de células B y plasmáticas. Se da tanto en varones como en mujeres y existen varios genes asociados. Se han descrito mutaciones en la cadena pesada μ de las Igs, en el complejo pre-BCR (concretamente en la proteína $\lambda 5$, en Iga y en Ig β) o en sus moléculas adaptadoras, como BLNK (Conley, 2009) y recientemente en CD20 (Kuijpers, 2010).

3.1.- XLA: Caso clínico 9

3.1.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de un varón de origen caucásico nacido en el año 2006 que a los 15 meses de edad fue ingresado debido a un cuadro de diarrea crónica acompañada de fiebre. El coprocultivo resultó positivo para *Campylobacter*. El primer análisis inmunológico realizado en el hospital de origen mostró una ausencia de linfocitos B, así como unos bajos niveles de IgG (134 mg/dL), IgA (2 mg/dL) e indetectables de IgM (<5 mg/dL). Se inició un tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas que permitió la remisión de los síntomas. Fue remitido a nuestro servicio con sospecha diagnóstica de Enfermedad de Bruton (XLA).

Se trata del primer hijo de padres no consanguíneos. No existen antecedentes de muertes perinatales ni abortos previos en la familia. En la actualidad continua con terapia sustitutiva de inmunoglobulinas intravenosas.

3.1.2.- Datos inmunológicos

Lo primero que hicimos fue repetir el análisis de los niveles de inmunoglobulinas del paciente. Todas eran indetectables, a excepción de la IgG que era de aporte exógeno (Tabla IV.7).

El número absoluto de linfocitos era de $12.300 \cdot 10^6/L$, estando dentro de los rangos de normalidad (v.n.: $4.000-10.500 \cdot 10^6/L$). Sin embargo, el análisis de las poblaciones linfocitarias mostró un 92% de linfocitos T (57% CD4+ y 34% CD8+), un 0,5% de linfocitos B y un 6% de células NK.

	P9	Valores de referencia (1-5 años)
IgG	711*	420-1200 mg/dL
IgA	<7	25-154 mg/dL
IgM	<20	35-192 mg/dL
IgE	<2	3-56 UI/mL

Tabla IV.7. La IgG estaba compensada debido al tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas *, mientras que los niveles de IgA, IgM e IgE eran indetectables.

La ausencia de linfocitos B en el paciente no era completa, aunque estaban muy disminuidos (Figura IV.36). Esta drástica reducción es típica de los pacientes con XLA. Se corroboró la escasa presencia de estas células mediante la tinción con otros anticuerpos contra moléculas específicas de este linaje como CD20, CD21 y CD22, siendo el resultado equivalente para todos ellos. Además, quisimos estudiar el estado de maduración de estas células mediante el marcaje de IgM en superficie. La gran mayoría de linfocitos B tenían IgM en superficie, lo que indicaba que eran células inmaduras que no habían realizado el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas (Figura IV.36).

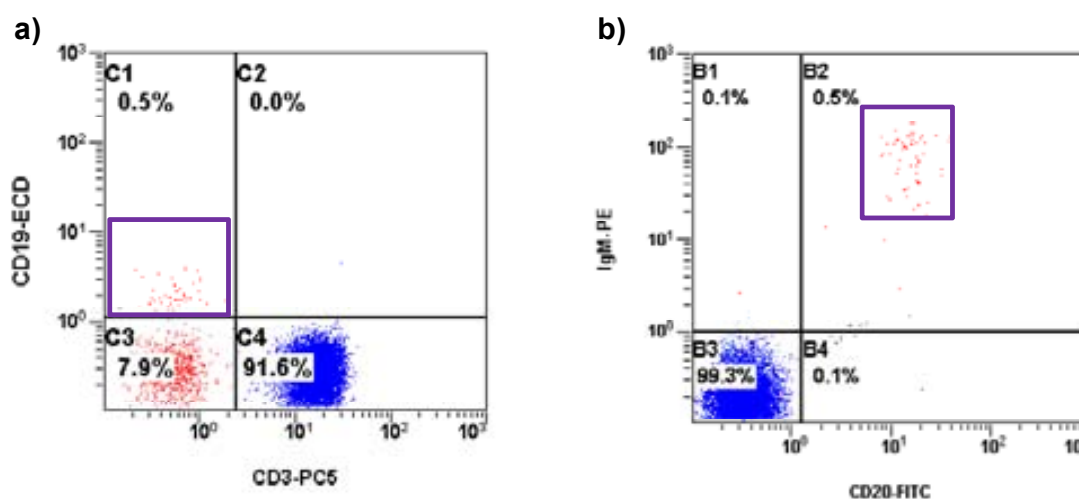


Figura IV.36. Análisis de los linfocitos B. El paciente tenía un 0,5% de linfocitos B (CD19⁺ CD3⁻) (a), y la gran mayoría de ellos expresaban IgM en superficie (CD20⁺ IgM⁺) (b).

3.1.3.- Tinción intracelular indirecta de Btk

Ante la sospecha diagnóstica de XLA, pasamos a estudiar la proteína Btk. Esta proteína se expresa en el citoplasma de los linfocitos B pero también de las células mieloides. Puesto que el número de linfocitos B del paciente estaba muy disminuido, analizamos la expresión de esta proteína en los monocitos. Debido a su localización citoplasmática debimos permeabilizar y fijar las células para poder realizar esta tinción. Los monocitos del paciente expresaban bastante menos proteína Btk que los de los individuos control; sin embargo, la expresión era superior a la del control de isotipo utilizado en la técnica. En la madre se observaban dos picos de expresión: uno mayoritario (82%) que era de intensidad muy disminuida y equivalente al observado en su hijo, y otro minoritario (18%) de intensidad equivalente a los individuos control (Figura IV.37). De todos modos, y a pesar de que la expresión de Btk se encontraba muy disminuida en el paciente, era claramente superior a la del control de isotipo. Para

determinar el grado de afectación real de la proteína, pasamos a analizarla en extractos de células del paciente mediante *western blot*.

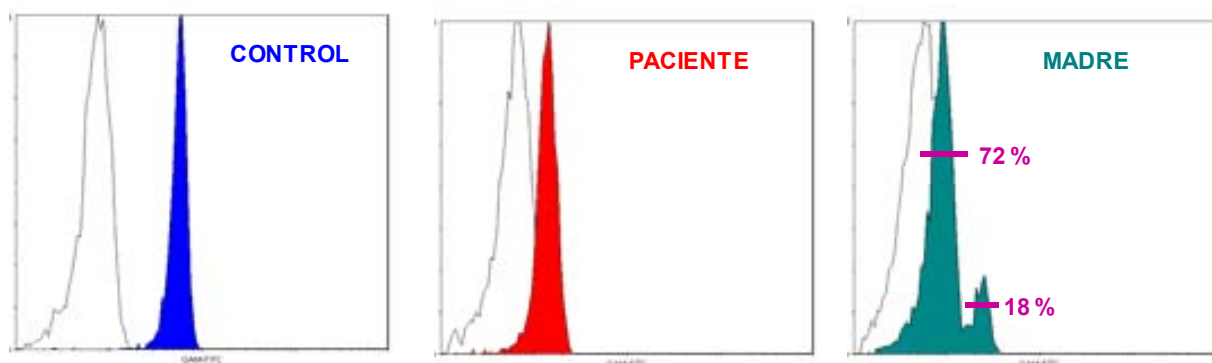


Figura IV.37. Expresión de Btk mediante citometría de flujo en monocitos. La expresión de Btk en el paciente era inferior al individuo control, aunque superior al control negativo de la técnica. La madre del paciente presentaba una expresión bimodal.

3.1.4.- Western blot para Btk

Realizamos esta prueba a partir de extractos de células mononucleares (linfocitos y monocitos) y utilizamos como control un donante sano de edad equivalente a la del paciente. En el paciente no se observaba ni proteína Btk nativa (77 KDa) ni formas truncadas. Así mismo, la cantidad de proteína Btk detectada en la madre era muy inferior a la del individuo control (Figura IV.38).

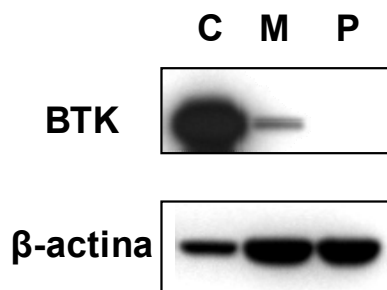


Figura IV.38. Expresión de Btk y β -actina mediante *western blot* en células mononucleares. El paciente no expresaba Btk y su madre lo hacía de una manera muy minoritaria.

La detección de la proteína β -actina sobre la misma membrana indicaba que, tanto el extracto del paciente como el de la madre, habían sido procesados correctamente (Figura IV.38). La cantidad de Btk detectada en el control era mucho mayor que la detectada en la madre. Éste hecho es debido a la expresión limitada de la proteína en la madre, ya que, tal y cómo se ha observado anteriormente en la tinción intracelular, sólo un bajo porcentaje de las células de la madre expresan Btk de manera correcta (18%).

3.1.5.- Análisis del mRNA de Btk

El siguiente paso fue analizar el mRNA de Btk extraído de células mononucleares. Dado su gran tamaño (2.579 bp) lo dividimos en cuatro fragmentos para poder abordarlo más fácilmente. No encontramos ninguna alteración de *splicing*. Sin embargo, al secuenciarlos

hallamos una duplicación de una Adenina en la posición 557 (c.557dupA) (Figura IV.39). Esta mutación, que afecta al exón 7, provocaba un cambio en la pauta de lectura de la proteína que llevaba a la aparición de un STOP ocho codones después (p.Lys186fsX8). Esta alteración ya había sido previamente asociada a XLA (Conley, 1994). En la madre se observaba una superposición de picos a partir de esta Adenina, lo que indicaba que era portadora de dicha alteración (Figura IV.39).

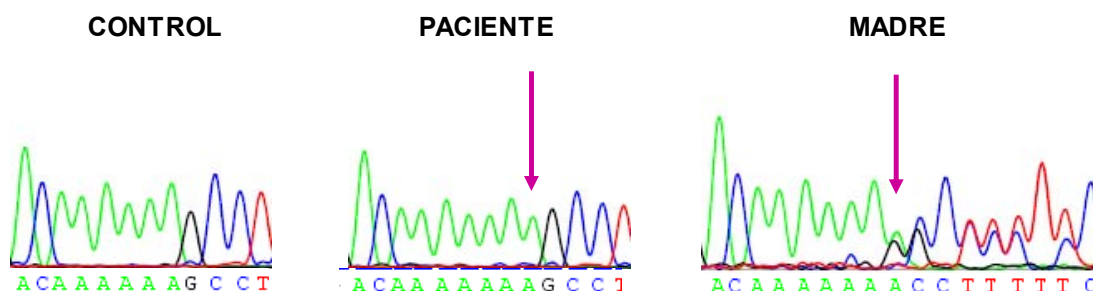
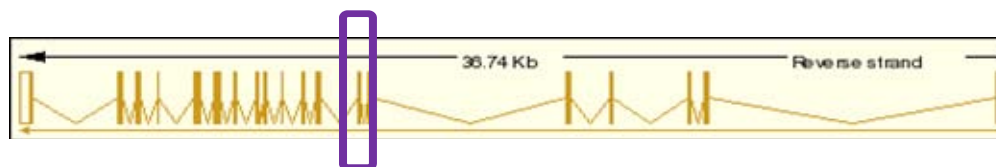


Figura IV.39. Análisis del cDNA de Btk. En el paciente había una duplicación de una A (c.557dupA) en hemigocis y en su madre en heterocis.

3.1.6.- Análisis del gen *BTK*

A continuación analizamos el exón 7 del gen *BTK* para confirmar la presencia de la mutación observada anteriormente (c.557dupA). El paciente presentaba la mutación p.Lys186fsX7 en hemigocis y la madre en heterocis (Figura IV.40).

a)



b)

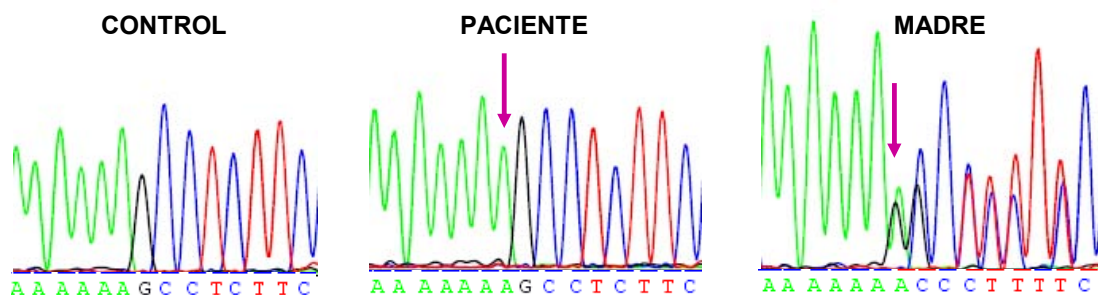


Figura IV.40. Esquema del gen *BTK* (a). Análisis del exón 7 de *BTK*. Se confirmaba la duplicación en hemigocis de la A 557 (c.557dupA) en el paciente y en heterocis en la madre de éste (b).

No pudimos establecer si la mutación en la madre era una mutación *de novo*, al no disponer de muestra de la abuela materna.

3.2.- XLA: Caso clínico 10

3.2.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de un varón de origen caucásico nacido en el año 1972 que desde antes del primer año de edad había presentado infecciones respiratorias de vías altas con afectación bronquial y episodios diarreicos recurrentes. Según su familia, padeció dos veces el sarampión durante la infancia. A los 9 años fue diagnosticado de giardiasis intestinal, sinusitis y bronquiectasias, requiriendo lobectomía inferior izquierda. A los 15 años padeció una pericarditis purulenta por *Streptococcus pneumoniae*. Es entonces cuando se le realizó el primer análisis de inmunoglobulinas séricas donde se detectaron unos niveles muy bajos de IgG (54 mg/dL) y normales de IgA (90 mg/dL) y de IgM (66 mg/dL). Todas las subclases de IgG estaban por debajo de la normalidad. Las isohemaglutininas eran negativas.

Un año después se analizaron por primera vez sus poblaciones linfocitarias y se observó que el porcentaje de linfocitos B era inferior al 0,5%. A pesar de estos datos, fue inexplicablemente diagnosticado de Inmunodeficiencia Común Variable e iniciaron un tratamiento sustitutivo con inmunoglobulinas intravenosas cuando el paciente contaba ya con 16 años. Posteriormente, sufrió una tuberculosis pulmonar y ganglionar.

Se trata del segundo hijo, primer varón, de padres no consanguíneos.

En el verano del 2009 y ya casi con 40 años de edad, trasladó su residencia a Barcelona y fue remitido a nuestro hospital para continuar su tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas. La ausencia de linfocitos B junto con la hipogammaglobulinemia y el tipo de infecciones sufridas hicieron replantearnos el diagnóstico previo y establecer la sospecha diagnóstica de Agammaglobulinemia ligada al X (XLA).

3.2.2.- Datos inmunológicos

En primer lugar, se determinaron las inmunoglobulinas en suero. El paciente mostraba una ausencia de IgA e IgE y niveles muy bajos de IgM. La IgG era de aporte exógeno (Tabla IV.8). Los niveles de IgM se mantenían constantes a lo largo del tiempo entre 18 y 20 mg/dL.

	P10	Valores de referencia (adulto)
IgG	956*	723-1685 mg/dL
IgA	<7	69-382 mg/dL
IgM	20	40-230 mg/dL
IgE	<2	3-160 UI/mL

Tabla IV.8. La IgG estaba compensada debido al tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas *, mientras que los niveles de IgA, IgM e IgE eran muy bajos o indetectables.

El análisis de las poblaciones linfocitarias mostró un 73% de linfocitos T (33% CD4+ y 38% CD8+), un 21% de células NK y una ausencia total de linfocitos B (Figura IV.41). No había tinción con ninguno de los marcadores de linaje de linfocitos B utilizados (CD19, CD20, CD21 y CD22). Los números absolutos de linfocitos eran normales ($2.400 \cdot 10^6/L$; v.n.: $1.000-4.000 \cdot 10^6/L$).

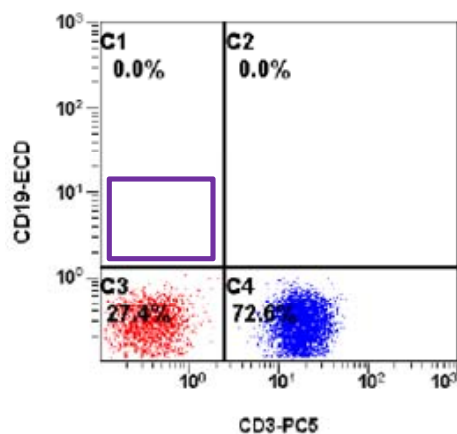


Figura IV.41. Análisis de los linfocitos B. El paciente no tenía linfocitos B (CD19⁺ CD3⁻).

3.2.3.- Tinción intracelular indirecta de Btk

Ante la sospecha diagnóstica de XLA, pasamos a estudiar la proteína Btk. Tal y como se ha mencionado en el caso anterior, esta proteína se expresa en el citoplasma de los linfocitos B y también de las células mieloides. Debido a la ausencia de linfocitos B en el paciente, analizamos la expresión de esta proteína en los monocitos. Los monocitos del paciente expresaban la proteína Btk en niveles equivalentes a los de los individuos control (Figura IV.42).

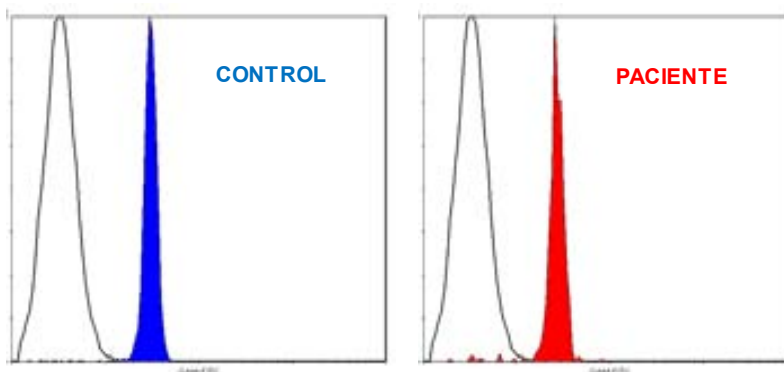


Figura IV.42. Expresión de Btk mediante citometría de flujo en monocitos. El paciente expresaba Btk a niveles equivalentes a los del individuo control.

Este dato no descartaba el diagnóstico de XLA, ya que una expresión correcta no significa que dicha proteína sea funcional. De esta manera, pensamos en una mutación que no afectara a la expresión de la proteína pero sí a su función, por eso pasamos directamente al análisis genético y empezamos a nivel de mRNA.

3.2.4.- Análisis del mRNA de Btk

Estudiamos el mRNA de Btk a partir de extractos de células mononucleares. No encontramos alteraciones de *splicing*. Sin embargo, hallamos una sustitución de la Guanina 863 por una Adenina (c.G863A) (Figura IV.43). Esta mutación situada en el exón 10 provocaba el cambio de la Arginina 288 por una Glutamina (p.Arg288Gln), mutación que ya había sido previamente asociada a XLA (Conley, 1998b).

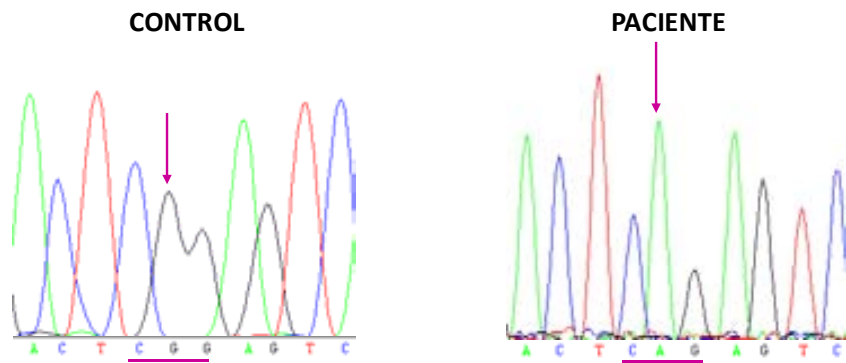
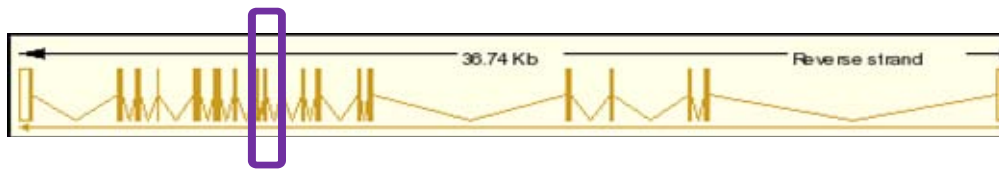


Figura IV.43. Análisis del cDNA de Btk. El paciente mostraba una sustitución de una G por una A (c.G863A) en hemicigosis.

3.2.5.- Análisis del gen *BTK*

A continuación analizamos el exón 10 del gen *BTK* para confirmar la presencia de la mutación. Como era de esperar, el paciente presentaba la mutación p.Arg288Gln en hemicigosis (Figura IV.44).

a)



b)

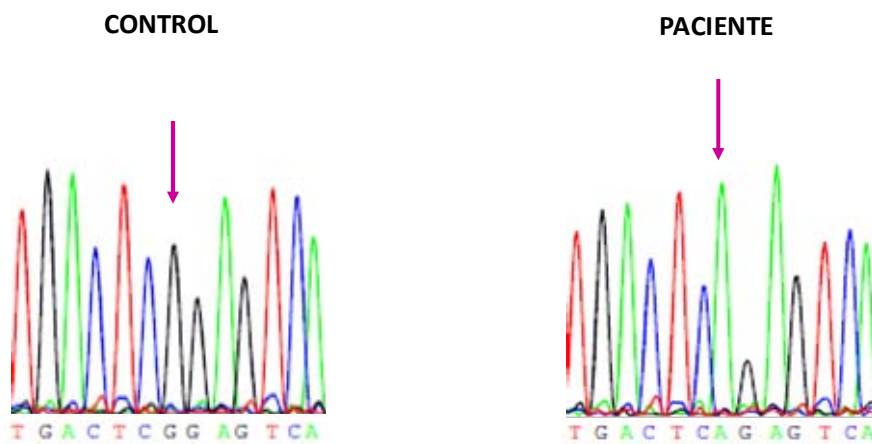


Figura IV.44. Esquema del gen *BTK* (a). Análisis del exón 10 de *BTK*. Se observaba la mutación p.Arg288Gln en hemicigosis en el paciente (b).

3.2.6.- Estudio de individuos portadores

Una vez establecido el diagnóstico de XLA, nos fue remitida muestra de la madre del paciente para determinar si era portadora de la enfermedad. El análisis del exón 10 del gen *BTK* mostró que la madre era portadora de la mutación p.Arg288Gln en heterocigosis y por tanto de la XLA (Figura IV.45).

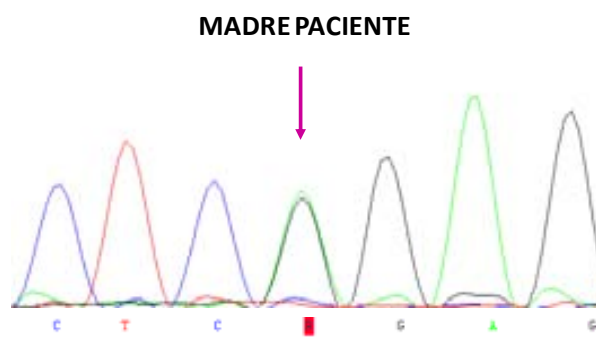


Figura IV.45. Análisis del exón 10 de *BTK* en la madre del paciente. La madre es portadora de la enfermedad ya que presenta la mutación p.Arg288Gln en heterocigosis.

Puesto que no se trataba de una mutación *de novo* en el paciente, decidimos rastrear su presencia en toda la familia materna, aunque hasta la fecha no hemos recibido las muestras necesarias para llevar a cabo el estudio.

4.- Síndrome de Wiskott-Aldrich

La primera descripción del Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS; MIM: 301000) publicada en 1937 definía claramente el fenotipo clínico de esta enfermedad: 3 hermanos varones, pero no sus hermanas, presentaban poco después del nacimiento trombocitopenia, diarreas sanguinolentas, eczema e infecciones recurrentes del oído (Wiskott, 1937). Diecisiete años después, Aldrich describió una gran familia con múltiples varones afectados, demostrando así la herencia ligada al X de esta enfermedad (Aldrich, 1954). Los pacientes con WAS tienen trombocitopenia con plaquetas pequeñas, presentan eczema, probablemente de origen alérgico puesto que va acompañado de eosinofilia y elevados niveles de IgE y existe un riesgo incrementado a padecer enfermedades autoinmunes y tumores, principalmente linfomas.

La Trombocitopenia ligada al X (XLT; MIM: 313900) es una entidad parecida al WAS pero mucho menos grave. La característica común es la trombocitopenia con plaquetas pequeñas, que puede ser intermitente (Notarangelo, 2002). El eczema, si lo presentan, es poco severo. Las funciones inmunológicas no están afectadas y no hay ni alteraciones autoinmunes ni riesgo incrementado de tumores.

Tanto WAS como XLT están causados por alteraciones en el gen *WAS*, que codifica la proteína WASP. WASP se expresa constitutivamente en el citoplasma de todas las células hematopoyéticas y pertenece a una familia de proteínas reguladoras del citoesqueleto.

La Neutropenia ligada al X (XLN; MIM: 300299) es otra entidad causada por alteraciones en el gen *WAS* y se caracteriza, básicamente, por una intensa neutropenia (Devriendt, 2001).

4.1.- WAS: Caso clínico 11

4.1.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de un varón de origen caucásico nacido en el año 2006 que a los 3 meses de vida fue ingresado a causa de diarreas sanguinolentas de etiología desconocida acompañadas de una fuerte anemia (69g/L; v.n.: 105-125g/L). Presentaba un eczema de grado medio-severo. El examen hematológico mostró trombocitopenia ($75 \cdot 10^9/L$; v.n.: $140-350 \cdot 10^9/L$) con plaquetas pequeñas (5,1 fl; v.n.: 6-10,5 fl). A partir de esta triada de datos se estableció la sospecha diagnóstica de Síndrome de Wiskott-Aldrich. Ante el incremento de la gravedad de los síntomas ese mismo año se decidió someterlo a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH).

Se trata del segundo hijo de padres no consanguíneos. Los dos hermanos son HLA idénticos, lo que favoreció una actuación rápida ya que el paciente fue trasplantado con tan sólo 10 meses de edad. La evolución post-TPH ha sido muy buena, tal y como demuestran los datos clínicos e inmunológicos.

4.1.2.- Datos inmunológicos

Cuando el paciente fue remitido a nuestro servicio los niveles de inmunoglobulinas se encontraban dentro de los valores de normalidad correspondientes a su edad de 3 meses, a excepción de la IgE que estaba incrementada (Tabla IV.9).

	P11	Valores de referencia (0-1 año)
IgG	610	200-1000 mg/dL
IgA	75	16-85 mg/dL
IgM	62	25-149 mg/dL
IgE	764	0,1-15 UI/mL

Tabla IV.9. Los niveles de inmunoglobulinas presentaban valores normales, a excepción de los de IgE que estaban muy elevados.

El número de leucocitos estaba aumentado ($28.560 \cdot 10^6/L$; v.n.: $6.000-17.500 \cdot 10^6/L$) debido a un elevado número de linfocitos ($19.180 \cdot 10^6/L$; v.n.: $4.000-13.500 \cdot 10^6/L$) y a una leve eosinofilia ($1.600 \cdot 10^6/L$). La proteína C reactiva tenía valores de 138 mg/mL (v.n.: <5) lo que indicaba un proceso inflamatorio, debido probablemente a infección, lo que también explicaría la linfocitosis antes mencionada.

El análisis de las poblaciones linfocitarias no mostraba alteraciones importantes aunque presentaba un 35% de linfocitos T (25% CD4+ y 9% CD8+), un 28% de linfocitos B y un 31% de células NK, un porcentaje elevado para su edad.

4.1.3.- Estudio de la capacidad proliferativa de los linfocitos T

En el WAS se han descrito alteraciones en la funcionalidad de los linfocitos, y en especial de los linfocitos T. Por ello decidimos analizar la respuesta de los linfocitos T del paciente al ser estimulados, y así como la de las células NK.

El estudio de la función de los linfocitos T se realizó a través de la evaluación de la inmunidad celular frente a aloantígenos (cultivo mixto) y frente a potentes estimuladores (mitógenos). El paciente respondía a los mitógenos, tanto a fitohematoglutina (PHA) como a pokeweed (PWM), de manera similar a los individuos control, ya que la disminución observada no era estadísticamente significativa (Figura IV.46).

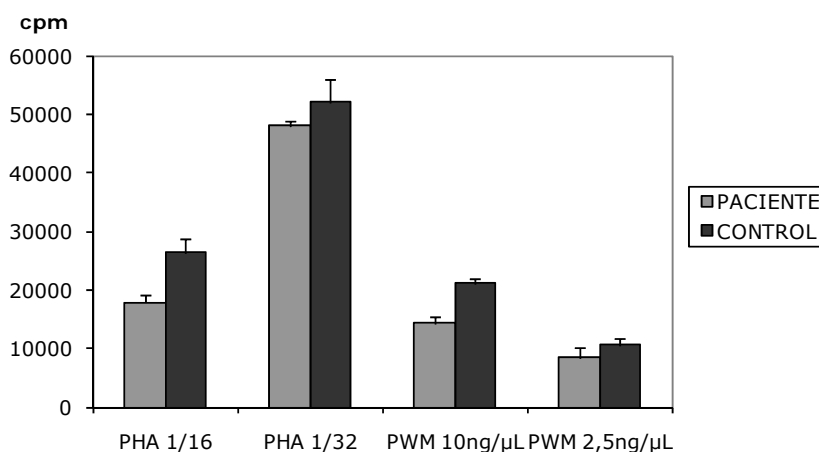


Figura IV.46. Estudio de proliferación frente a mitógenos. Los niveles de proliferación frente a los mitógenos PHA y PWM no diferían significativamente de los controles.

Sin embargo, cuando enfrentábamos los linfocitos del paciente a linfocitos irradiados de controles (PACIENTE + CONTROL*), la respuesta se encontraba claramente disminuida. De hecho, en el cultivo mixto bilateral (PACIENTE + CONTROL) la actividad detectada al enfrentar linfocitos del paciente y linfocitos del control ambos sin irradiar, podía ser atribuida casi en su totalidad

a la de los linfocitos del control, ya que era equivalente a la presentada por los linfocitos del control frente a los del paciente irradiados (CONTROL + PACIENTE*) (Figura IV.47). Es decir, que los linfocitos T del paciente no se activaban correctamente frente a aloantígenos, aunque sí lo hacían frente a mitógenos.

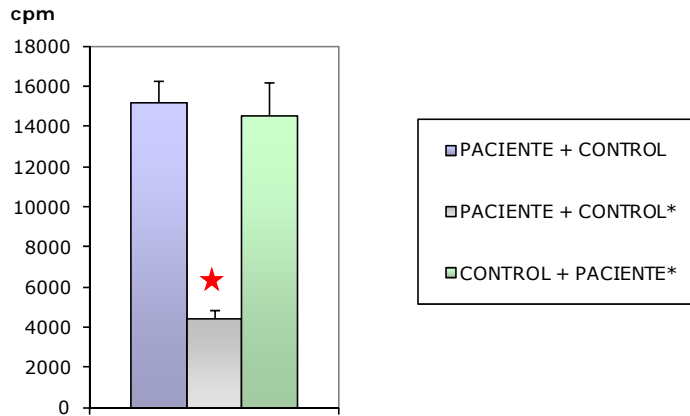
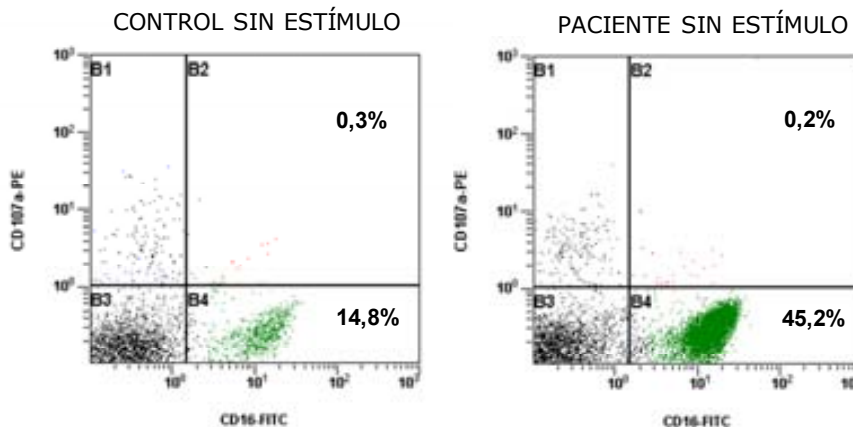


Figura IV.47. Estudio de aloreactividad. Los niveles de proliferación frente a células extrañas (aloantígenos) estaban muy disminuidos respecto a los controles *.

4.1.4.- Movilización de gránulos citotóxicos en células NK

El estudio de la función de los linfocitos NK se realizó mediante el análisis de la movilización de sus gránulos citotóxicos. Para ello, se estimularon las células NK con la línea celular K562 y se tiñó con el anticuerpo anti-CD107a, molécula expresada en los gránulos y que sólo llega a superficie si ha habido estimulación correctamente. El resultado de esta prueba en los individuos control es que aproximadamente un 10% de las células NK (CD16+) expresan CD107a tras la estimulación (1,8% sobre un 14,8% de células NK). Las células NK del paciente respondían de manera equivalente a los individuos control y debido a su elevado número, el número absoluto de células estimuladas era aún mayor, aunque el porcentaje relativo era similar (4% sobre 45,2%) (Figura IV.48).



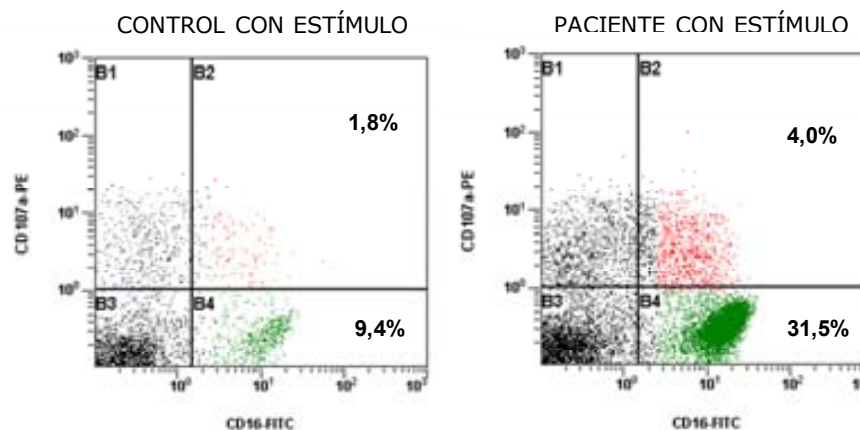


Figura IV.48. Expresión de CD107a en células NK activadas. El paciente respondía de forma equivalente al control.

En la literatura se ha descrito que la alteración de las células NK es debido a una deficiencia en la formación del conjugado en esta célula y su célula diana (Orange, 2002). Mediante esta prueba no determinamos la eficiencia de esta unión, si no simplemente la movilización de los gránulos citotóxicos, que no equivale a la destrucción de la célula diana. Así pues, no podemos confirmar si la actividad de las células NK del paciente estaba o no alterada.

4.1.5.- Tinción intracelular indirecta de WASP

Ante la concordancia de los datos clínicos e inmunológicos con WAS decidimos estudiar la proteína WASP, cuya alteración es responsable de esta enfermedad. La proteína WASP se expresa abundantemente en linfocitos T activados. Experimentalmente podemos recrear esta situación estimulando con PHA e IL-2 durante 3 días. WASP es una proteína intracelular, por lo que para detectarla debimos permeabilizar las células. Los linfocitos T del paciente, a diferencia de los de los controles, no expresaban WASP. Los linfocitos T de la madre del paciente presentaban una expresión correcta de la proteína, sin que existiera una forma bimodal (Figura IV.49).

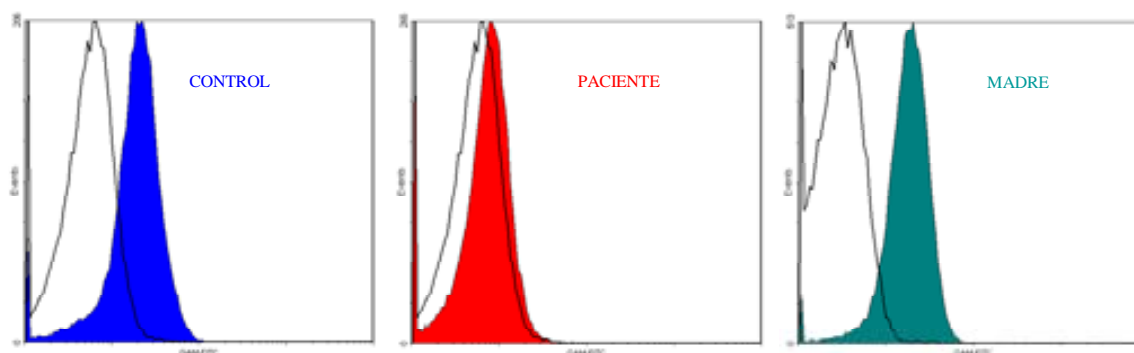


Figura IV.49. Expresión de WASP mediante citometría de flujo en linfocitos T activados. No había expresión de WASP en el paciente, sin embargo sí que la había en todas las células de su madre.

La expresión de proteína WASP en la madre correspondía a la de un individuo control o a la de una mujer portadora de WAS. En este último caso, la ausencia de bimodalidad es explicada por el papel esencial de WASP en la selección de los linfocitos T. Aquellos linfocitos T que

tienen aleatoriamente inactivado el cromosoma X que contiene la copia alterada del gen *WAS*, sólo expresan proteína WASP nativa y pasan a periferia. Sin embargo, aquellos que tienen inactivado el otro cromosoma X que tiene la copia no alterada, no expresan WASP nativa y no llegan a madurar, por lo que no los encontramos en periferia.

En las mujeres portadoras de XLT, la expresión sí es bimodal puesto que la proteína WASP alterada mantiene parte de sus funciones, permitiendo así que los linfocitos T que únicamente expresan la proteína mutada puedan madurar y lleguen a periferia.

4.1.6.- Western blot para WASP

Para corroborar la ausencia de proteína WASP en el paciente, realizamos un *western blot* a partir de extractos de linfocitos T activados con PHA e IL-2 durante 3 días. Como control de la técnica utilizamos la β -actina. A partir de este análisis vimos que los linfocitos T activados del paciente no expresaban la forma nativa de WASP (54 KDa) ni otras formas truncadas de la proteína. La presencia de β -actina (45 KDa) en el extracto validaba este resultado. (Figura IV.50).

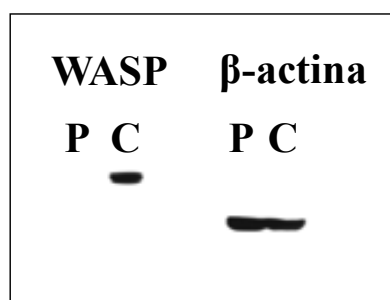


Figura IV.50. Expresión de WASP y β -actina mediante *western blot* en linfocitos T activados. En el paciente no se detectaba ninguna forma de proteína WASP.

Llegado este punto decidimos analizar el gen *WAS* y comenzamos por su expresión a nivel de cDNA.

4.1.7.- Análisis del mRNA de WASP

Para llevar a cabo este análisis, extrajimos RNA total de linfocitos T estimulados con PHA e IL-2 durante 3 días. El estudio del cDNA de WASP en un solo paso resultó muy difícil de realizar debido a su gran extensión (1.821 bp). Por ese motivo, decidimos dividirlo en varios fragmentos. Cuando realizamos la amplificación correspondiente a los exones 4 al 7, en el paciente sólo se observaba una banda tenue de unos 40-50 bp por encima del peso molecular esperado. Esta banda tenía una intensidad mucho menor que la de la madre o el control, sugiriendo un menor nivel de expresión de este mRNA alterado. La ausencia de mRNA de tamaño correcto era completa (Figura IV.51).

Para saber con que se correspondía este fragmento, secuenciamos los productos de amplificación correspondientes a estos exones.



Figura IV.51. Análisis del cDNA de WASP. El paciente sólo expresaba un transcrito de mayor tamaño y de menor intensidad que el control o su madre.

Lo que se observó fue que mientras en la madre y el control había una transición correcta entre los exones 6 y 7, en el paciente había un fragmento del intrón 6 entre ambos (Figura IV.52). Estas 38 bp incorporaban un codón STOP prematuro, lo que explicaría la total ausencia de proteína WASP nativa que habíamos observado previamente.

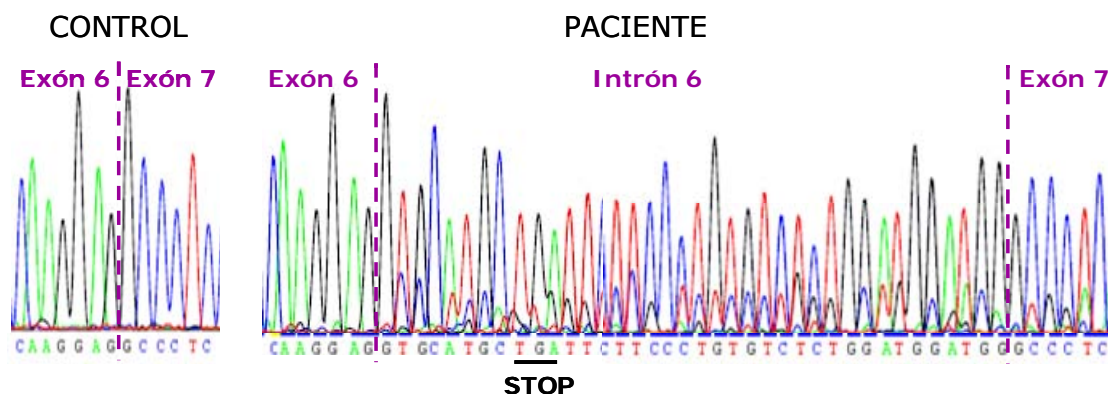
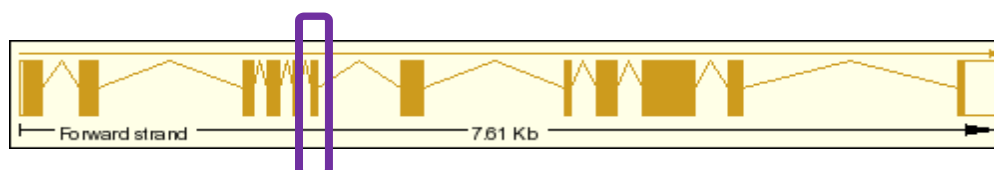


Figura IV.52. Análisis del cDNA de WASP. El paciente contenía 38bp del intrón 6 entre los exones 6 y 7, con la consecuente incorporación de un codón STOP.

4.1.8.- Análisis del gen WAS

Para determinar cuál era la alteración genética que provocaba la incorporación de las 38 bp del intrón 6 a la secuencia codificante, estudiamos a nivel genómico los exones 6 y 7 de WAS, incluyendo las regiones adyacentes. En el paciente observamos que el quinto nucleótido del intrón 6, que originalmente es una Guanina, estaba sustituido por una Adenina (IVS6+5:G>A). Esta mutación se hallaba en heterocigosis en la madre (Figura IV.53).

a)



b)

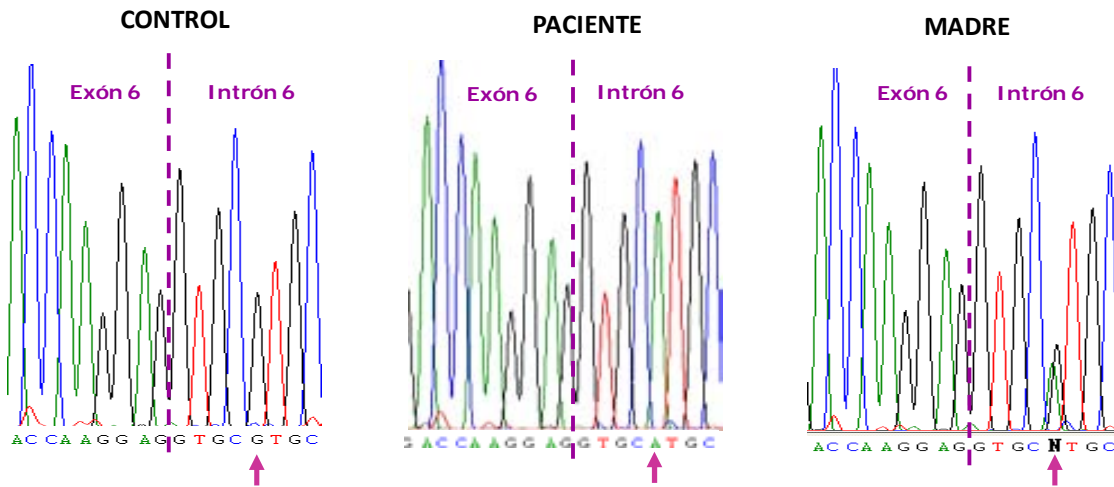


Figura IV.53. Esquema del gen WAS (a). Secuencia del exón 6 y del intrón 6 de WAS. El paciente presentaba una sustitución en hemigiosis de la 5ª base del intrón (IVS6+5:G>A) y su madre en heterocigosis (b).

Esta alteración ya había sido descrita en pacientes de diferentes grupos étnicos afectados de XLT (Imai, 2003a; Kwan, 1995), pero no en pacientes con WAS, como era nuestro caso. En los pacientes XLT con una alteración de *splicing* existe una producción residual de la proteína debido a la formación de transcritos de tamaño correcto. Esta expresión residual mantiene parte de las funciones de la proteína WASP e impide el fenotipo WAS. En nuestro paciente no había producción de proteína, a pesar de que en la secuencia se podía observar que existía mRNA nativo por debajo de los picos de la secuencia mutada (Figura IV.52). Probablemente, la existencia de tan poco mRNA nativo, que no llegaba a apreciarse en el gel de amplificación (Figura IV.51), no permitía la formación de suficiente proteína. El no mantenimiento de las funciones de WASP da lugar al fenotipo WAS anteriormente descrito en nuestro paciente.

4.1.9.- Estudio de individuos portadores

Los estudios realizados mostraban que la madre del paciente era portadora de la enfermedad. Por ello, el siguiente paso fue ampliar el estudio a toda la familia materna para identificar otras posibles portadoras. Ningún miembro más de la familia tenía la mutación (Figura IV.54). Es decir, que la alteración era una mutación *de novo* en la madre del paciente.

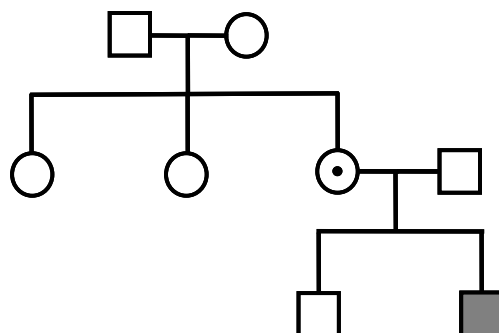


Figura IV.54. Árbol genealógico del caso clínico 9. Sólo la madre era portadora (mutación *de novo* en la madre).

4.1.10.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos y evolución

Ante la mala evolución del paciente, se decidió someterle a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). El TPH se realizó a partir de precursores procedentes de su hermano mayor, ambos HLA idénticos, cuando el paciente tenía 10 meses de vida. La evolución del trasplante ha sido correcta. La IgM disminuyó en el primer mes post-TPH como consecuencia de la inmunosupresión, pero luego fue incrementado de manera progresiva lo que indica la correcta implantación de las células B en la médula ósea. La IgA tardó más en disminuir y también más en reaparecer. Lo más significativo es que los niveles de IgE han descendido drásticamente hasta alcanzar valores normales (<2 UI/mL). La IgG está siendo compensada con inmunoglobulinas intravenosas.

A las 3 semanas del trasplante realizamos la tinción intracelular de la proteína WASP en linfocitos T activados con PHA e IL-2 durante 3 días. El paciente expresaba dicha proteína a niveles totalmente equivalentes a los de los individuos control (Figura IV.55). Esta prueba demostraba la adecuada implantación del injerto.

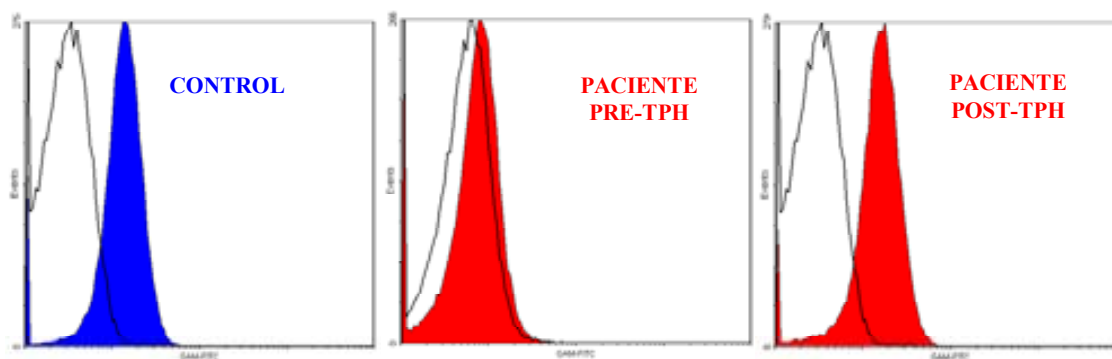


Figura IV.55. Expresión de WASP mediante citometría de flujo. El paciente había recuperado la expresión de WASP tan sólo 3 semanas después del TPH.

A los 6 meses realizamos un *western blot* para la proteína WASP en las condiciones anteriormente descritas. Comparamos la expresión de proteína WASP entre extractos anteriores y posteriores al TPH en el paciente y respecto al control. Los linfocitos T activados del paciente después del TPH (post) expresaban WASP a niveles totalmente equivalentes a los individuos control (Figura IV.56).

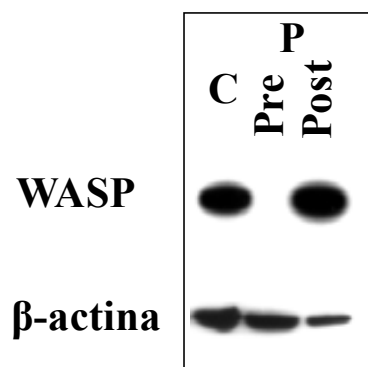


Figura IV.56. Expresión de WASP y β -actina mediante *western blot* en linfocitos T activados. La expresión de WASP en el paciente después del TPH era equivalente a los controles.

Además, el TPH ha permitido la normalización de la clínica y de las plaquetas. En la actualidad el paciente está muy bien y ya ni siquiera recibe inmunoglobulinas intravenosas.

4.2.- WAS: Caso clínico 12

4.2.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de un varón hispano-americano nacido en el año 1996 que desde los 7 meses de edad presentaba un eczema cutáneo generalizado, múltiples cuadros de sobreinfecciones respiratorias (neumonías, sinusitis) y abscesos cutáneos de repetición. A los 10 meses fue diagnosticado de Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI).

El paciente y su familia se trasladaron a nuestro país en el año 2007. El examen hematológico realizado en el año 2008 reveló trombocitopenia ($51 \cdot 10^9/L$; v.n.: $140-350 \cdot 10^9/L$) con plaquetas pequeñas (6,3 fl; v.n.: 6-10,5 fl). Además tenía anemia (67g/L; v.n.: 115-155g/L) de probable etiología autoinmune y ferropenia importante. A partir de estos datos se estableció la sospecha diagnóstica de Síndrome de Wiskott-Aldrich y fue remitido a nuestro hospital para realizar el estudio genético.

Se trata del segundo hijo de padres no consanguíneos. Su hermana mayor es HLA compatible, por lo que fue la donante ideal para llevar a cabo el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH).

4.2.2.- Datos inmunológicos

El estudio de los niveles de inmunoglobulinas del paciente realizado en nuestro servicio a los 11 años de edad mostraba una IgA y una IgE muy por encima de los rangos de normalidad, mientras que los de IgG eran normales y los de IgM bajos (Tabla IV.10).

	P12	Valores de referencia (>5 años)
IgG	1120	723-1685 mg/dL
IgA	997	69-382 mg/dL
IgM	27	40-230 mg/dL
IgE	3390	3-160 UI/mL

Tabla IV.10. Los niveles de IgG estaban dentro de los valores esperados, pero los de IgM eran un poco bajos y los de IgA e IgE muy elevados.

En el análisis de las poblaciones linfocitarias vimos que éstas eran normales. El paciente presentaba un 55% de linfocitos T (44% de CD4+ y 10% de CD8+), un 13% de linfocitos B y un 23% de células NK. El número de linfocitos era un poco bajo para su edad ($1.120 \cdot 10^6/L$; v.n.: $1.500-6.800 \cdot 10^6/L$).

4.2.3.- Tinción intracelular indirecta de WASP

Ante la sospecha de que el paciente podía padecer un WAS, decidimos analizar la proteína WASP. Al igual que en el caso anterior, estudiamos la expresión de dicha proteína en linfocitos

T estimulados con PHA e IL-2 durante 3 días. Los linfocitos T del paciente no expresaban WASP (Figura IV.57).

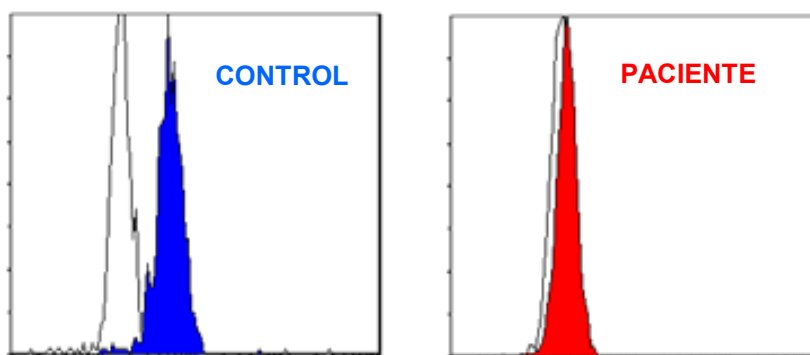


Figura IV.57. Expresión de WASP mediante citometría de flujo en linfocitos T activados. La expresión de WASP en el paciente era nula.

4.2.4.- Western blot para WASP

Para corroborar la ausencia de proteína WASP en el paciente realizamos un *western blot* a partir de extractos de linfocitos T activados con PHA e IL-2 durante 3 días. Los linfocitos T activados del paciente no expresaban WASP nativa (54 KDa) ni otras formas de la proteína. El análisis de la β -actina en la misma membrana demostraba que el extracto celular estaba correctamente procesado (Figura IV.58).

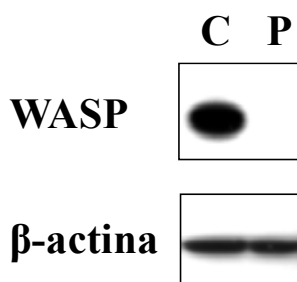


Figura IV.58. Expresión de WASP y β -actina mediante *western blot* en linfocitos T activados. En el paciente no había expresión de WASP.

El siguiente paso fue analizar el cDNA del gen *WAS* para saber cuál era la causa genética responsable de esta alteración.

4.2.5.- Análisis del mRNA de WASP

Al igual que en el caso anterior, extrajimos RNA total de linfocitos T estimulados con PHA e IL-2 durante 3 días. El estudio del cDNA de WASP del paciente correspondiente a los exones 2 al 7 mostró una banda de tamaño inferior al esperado (Figura IV.59). Esta banda era unos 100 bp más pequeña que la banda encontrada en los individuos control. La ausencia de mRNA de tamaño correcto era completa.

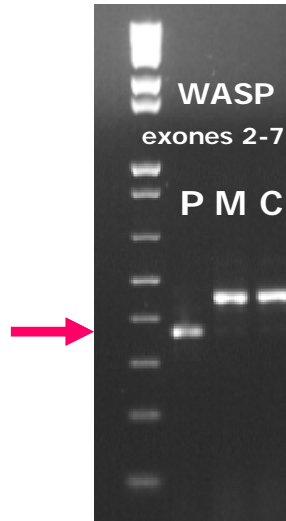


Figura IV.59. Expresión del cDNA de WASP. El paciente sólo presentaba un producto de amplificación unas 100 bp menor al esperado.

La secuenciación de este producto mostró la ausencia del exón 3 en el paciente, ya que mientras en la secuencia reversa del individuo control se observaba el paso del exón 3 al 4, en el paciente se pasaba del 2 al 4. (Figura IV.60).

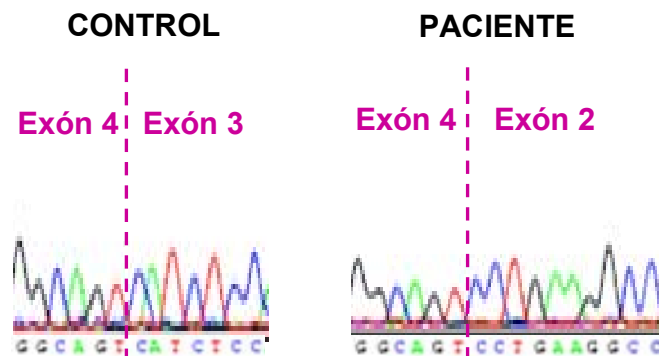


Figura IV.60. Secuencia del cDNA de WASP en secuencia reversa. El paciente carece del exón 3, ya que pasa del exón 4 al 2 directamente.

La falta del exón 3 tenía como consecuencia un cambio en la pauta de lectura y la aparición de un codón STOP prematuro, lo que explicaría la completa ausencia de proteína WASP en los linfocitos T del paciente.

4.2.6.- Análisis del gen WAS

La falta de un exón suele estar provocada por alteraciones en los intrones adyacentes. Por eso, estudiamos los intrones 2 y 3 en las proximidades del exón 3. En el paciente había una inserción de una Timina entre la segunda y la tercera posición del intrón 3 (Figura IV.61). Esta mutación, denominada IVS3+2-3insT, ha sido descrita en pacientes con WAS (Remold-O'Donnell, 1997). La madre era portadora de la alteración (Figura IV.61).

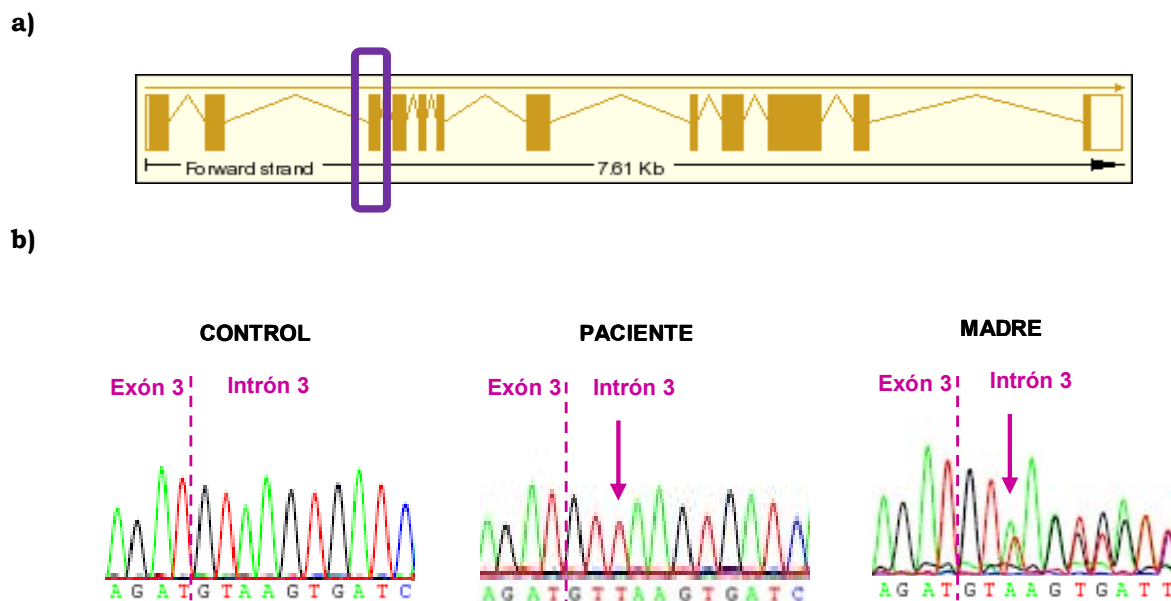


Figura IV.61. Esquema del gen WAS (a). Secuencia del exón 3-intrón 3 de WAS. En el paciente había una inserción de una T después de la 2ª base del intrón 3 (IVS3+2-3insT) en hemicigosis. La madre era portadora de la alteración (b).

4.2.7.- Estudio de individuos portadores

El estudio familiar fue muy limitado ya que sólo pudimos estudiar a la familia más directa del paciente: padre, madre y hermana. Tal y como se ha comentado anteriormente, la madre era portadora de la mutación. Sin embargo, la hermana no era portadora ya que tenía las dos copias del gen WAS en su forma nativa.

4.2.8.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos y evolución

El paciente fue sometido a un trasplante de progenitores hematopoyéticos de su hermana HLA idéntica. El tratamiento fue realizado en otro hospital y la evolución clínica ha sido buena. No hemos podido realizar las pruebas de expresión de la proteína después del TPH al carecer de muestra post-TPH.

4.3.- WAS: Caso clínico 13

4.3.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de un varón de origen hispano-americano nacido en el año 2008, que a los 18 meses fue ingresado por un síndrome febril acompañado de una hemorragia digestiva baja. En sus antecedentes personales destacan una trombocitopenia crónica, con una media de $50 \cdot 10^9/L$, pero siempre entre $13 \cdot 10^6 \cdot 10^9/L$ (v.n.: $140\text{-}350 \cdot 10^9/L$), con plaquetas pequeñas y hemorragias digestivas bajas recurrentes desde la época neonatal. Por este motivo fue diagnosticado de una Púrpura Trombocitopénica Idiopática Crónica (PTI) al mes de vida. No presentaba eczemas.

Se trata del primer hijo de padres no consanguíneos. Fue remitido a nuestro hospital en el año 2009 para la confirmación diagnóstica de Síndrome de Wiskott-Aldrich versus Trombocitopenia

ligada al X. Posteriormente, en el año 2010 y con casi 3 años de edad, el paciente fue sometido a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) de una unidad de sangre de cordón umbilical en otro hospital y su evolución es buena hasta el momento.

4.3.2.- Datos inmunológicos

Cuando el paciente fue remitido a nuestro hospital los niveles de inmunoglobulinas se encontraban dentro de los valores de normalidad correspondientes a su edad, a excepción de la IgE que estaba incrementada (Tabla IV.11).

	P13	Valores de referencia (1-5 años)
IgG	945	420-1200 mg/dL
IgA	91	25-154 mg/dL
IgM	44	35-192 mg/dL
IgE	364	3-56 UI/mL

Tabla IV.11. Los niveles de inmunoglobulinas presentaban valores normales, a excepción de los de IgE que estaban muy elevados.

El número de linfocitos era un poco bajo para la edad del paciente ($2.600 \cdot 10^6/L$; v.n.: $4.000-10.500 \cdot 10^6/L$). El análisis de las poblaciones linfocitarias no mostraba ninguna alteración importante, aunque el porcentaje de linfocitos T era bajo (25%), en especial el de linfocitos T CD8 (3%), al igual que el de linfocitos B (5%). Sin embargo el número de células NK era bastante elevado (58%). Los linfocitos T CD4+ eran el 20% del total de linfocitos.

4.3.3.- Tinción intracelular indirecta WASP

A continuación analizamos la expresión de la proteína WASP en linfocitos T estimulados con PHA e IL-2 durante 3 días. Los linfocitos T del paciente no expresaban WASP. Sin embargo, los de la madre lo hacían a un nivel totalmente equivalente al de los individuos control (Figura IV.62).

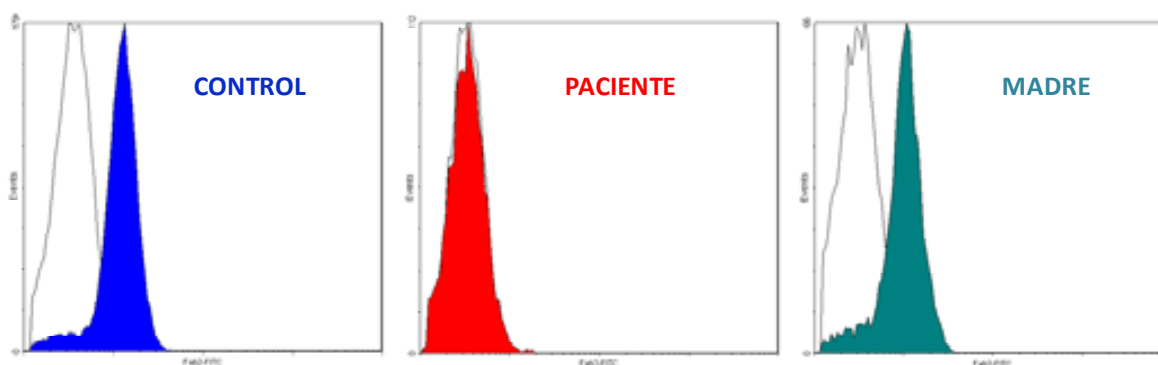


Figura IV.62. Expresión de WASP mediante citometría de flujo en linfocitos T activados. La expresión de WASP en el paciente estaba ausente, mientras que en la madre era equivalente al control.

4.3.4.- Western blot para WASP

El siguiente paso fue corroborar la ausencia de proteína WASP en el paciente mediante *western blot* a partir de extractos de linfocitos T activados con PHA e IL-2 durante 3 días. Los

linfocitos T activados del paciente no expresaban WASP nativa (54 KDa) ni otras formas truncadas. Para corroborar el correcto procesamiento de los extractos proteicos, realizamos el análisis de la β -actina en la misma membrana. Este análisis demostraba que el extracto celular del paciente había sido correctamente procesado (Figura IV.63).

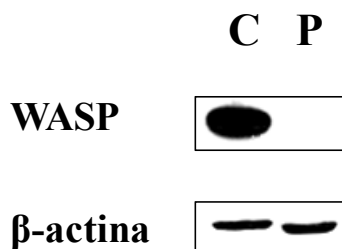


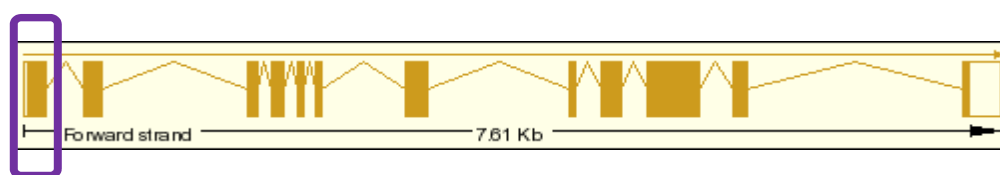
Figura IV.63. Expresión de WASP y β -actina mediante *western blot* en linfocitos T activados. En los extractos celulares del paciente no había nada de proteína WASP.

A continuación, pasamos a analizar el gen *WAS* para determinar cuál era la causa genética responsable de esta alteración. A diferencia de los casos anteriores no empezamos a nivel de mRNA porque es una técnica complicada que retrasaba el diagnóstico.

4.3.5.- Análisis del gen *WAS*

El análisis del gen *WAS* se realizó con unos *primers* diseñados para una PCR multiplex (Proust, 2007) que eran mucho más eficientes que los utilizados anteriormente. El estudio del exón 1 del gen *WAS* en el paciente mostró la sustitución de la Citosina número 100 por una Timina (c.C100T) que provoca el cambio de la Arginina 34 por un codón STOP (p.Arg34STOP). Esta alteración ya había sido previamente descrita en pacientes con WAS (Derry, 1995). La madre no era portadora de la alteración, por lo que se trataba de una mutación *de novo* en el paciente (Figura IV.64).

a)



b)

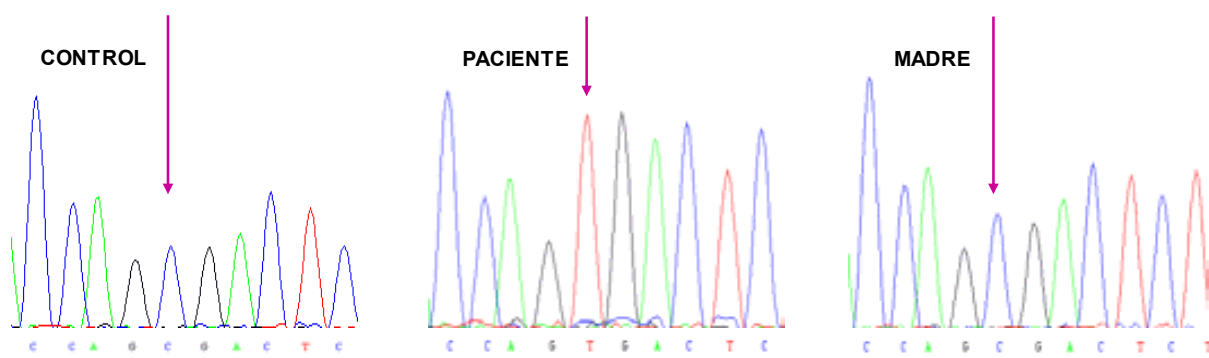


Figura IV.64. Esquema del gen *WAS* (a). Secuencia del exón 1 de *WAS*. El paciente presentaba una sustitución de una C por una T (c.C100T) en hemicigosis. La madre tenía la secuencia nativa (b).

4.4.- WAS: Caso clínico 14

4.4.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso clínico de un varón caucásico nacido en el año 2009, que a los 4 meses de edad fue ingresado por una taquicardia supraventricular. En la analítica realizada en el hospital de origen detectaron trombocitopenia con plaquetas pequeñas. Además, observaron que cuando tosía, debido a una faringitis aguda, le aparecían petequias. Es entonces cuando fue remitido a nuestro servicio para confirmar el diagnóstico de Síndrome de Wiskott-Aldrich o Trombocitopenia ligada al X.

Se trata del primer hijo de padres no consanguíneos. No existen antecedentes familiares de interés. Para evitar posibles complicaciones de la enfermedad, se sometió al paciente a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) cuando sólo tenía 11 meses de vida.

4.4.2.- Datos inmunológicos

El análisis de los niveles séricos de inmunoglobulinas realizado a los 4 meses de edad, mostraba que todas ellas estaban dentro de los rangos de normalidad (Tabla IV.12)

	P14	Valores de referencia (0-1 año)
IgG	477	200-1000 mg/dL
IgA	57	16-85 mg/dL
IgM	90	25-149 mg/dL
IgE	<2	0,1-15 UI/mL

Tabla IV.12. Los niveles de inmunoglobulinas estaban en rangos de normalidad.

El número de linfocitos era bajo ($1.279 \cdot 10^6/L$; v.n.: $4.000-13.500 \cdot 10^6/L$). No obstante, los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias eran normales: 45% de linfocitos T (41% CD4+, 4% CD8+), 35% de linfocitos B y 15% de células NK.

4.4.3.- Tinción intracelular indirecta WASP

Ante la sospecha de WAS/XLT, y al igual que en los casos anteriores, analizamos la expresión de la proteína WASP en linfocitos T activados durante 3 días con PHA e IL-2. Los linfocitos T del paciente no expresaban proteína WASP (Figura IV.65).

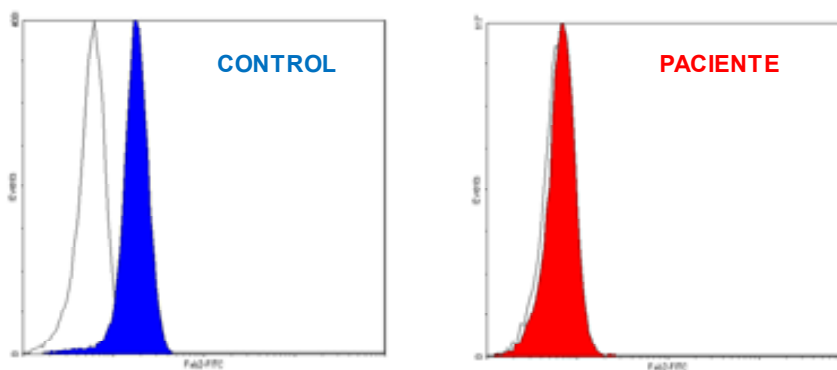


Figura IV.65. Expresión de WASP mediante citometría de flujo en linfocitos T activados. En el paciente no había expresión de WASP.

4.4.4.- Western blot para WASP

Al igual que los casos anteriores en los que no se detectaba proteína WASP en los estudios de citometría, analizamos la presencia de esta proteína mediante *western blot*. Los extractos de los linfocitos T activados con PHA e IL-2 del paciente no expresaban proteína WASP nativa (54 KDa) ni ninguna otra forma. El procesamiento de los extractos celulares había sido correcto, ya que la presencia de la β -actina en los mismos extractos así lo demostraba (Figura IV.66).

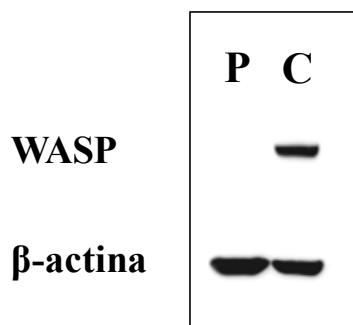


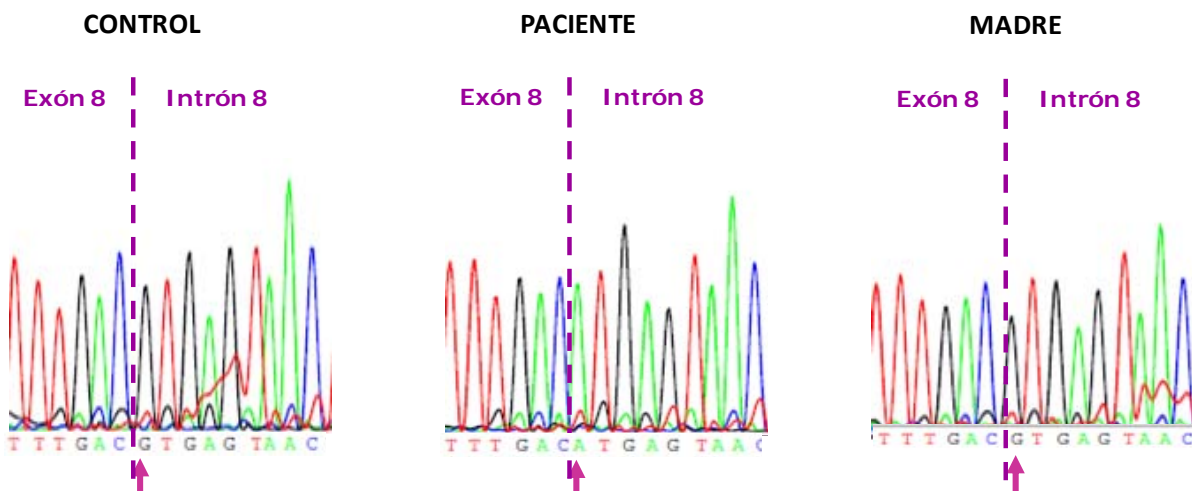
Figura IV.66. Expresión de WASP y β -actina mediante *western blot* en linfocitos T activados. En los extractos celulares del paciente no había proteína WASP.

A continuación, pasamos a analizar el gen *WAS* para determinar cuál era la causa genética responsable de esta alteración.

4.4.5.- Análisis del gen WAS

En este caso, el análisis del gen *WAS* también se llevó a cabo con los *primers* para la PCR multiplex. El estudio del exón 8 y de sus regiones intrónicas adyacentes mostró en el paciente un cambio de la Guanina situada en la primera base del intrón 8 por una Adenina (IVS8+1G>A) (Figura IV.67). Esta sustitución altera un sitio muy importante para el *splicing* y ya había sido descrita como responsable de WAS (MacCarthy-Morrogh, 1998). La madre no era portadora de la alteración, por lo que se trataba de una mutación *de novo* en el paciente (Figura IV.67). Al tratarse de una mutación *de novo* no estudiamos al resto de la familia.

a)



b)

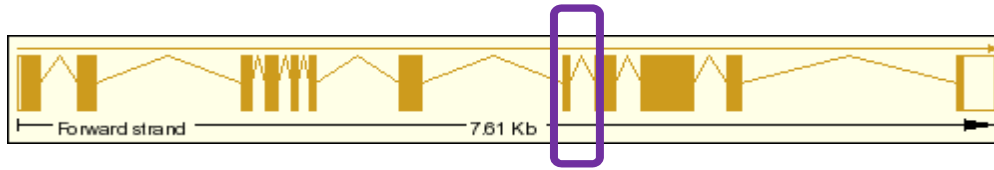


Figura IV.67. Secuencia del exón8-intrón 8 de WAS. En el paciente la primera base del intrón (G) estaba sustituida por una A (IVS8+1G>A) en hemicigosis. La madre presentaba la secuencia nativa (a). Esquema del gen WAS (b).

4.4.6.- Análisis del cDNA de WASP

Puesto que se trataba de una mutación que afectaba al *splicing*, analizamos el mRNA para ver la implicación de dicha alteración en este proceso. Amplificamos con *primers* situados en el exón 6 y el 10. El producto de amplificación en el paciente tenía un tamaño inferior al obtenido en los individuos control, lo que indicaba la falta de algún exón (Figura IV.68).

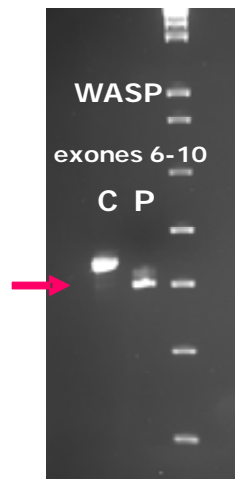


Figura IV.68. Expresión del cDNA de WASP. El paciente sólo presentaba un producto de amplificación entre 30-80 bp menor al esperado.

A continuación secuenciamos este producto y vimos que faltaba el exón 8, ya que en el paciente pasábamos del exón 7 al 9 directamente (Figura IV.69).

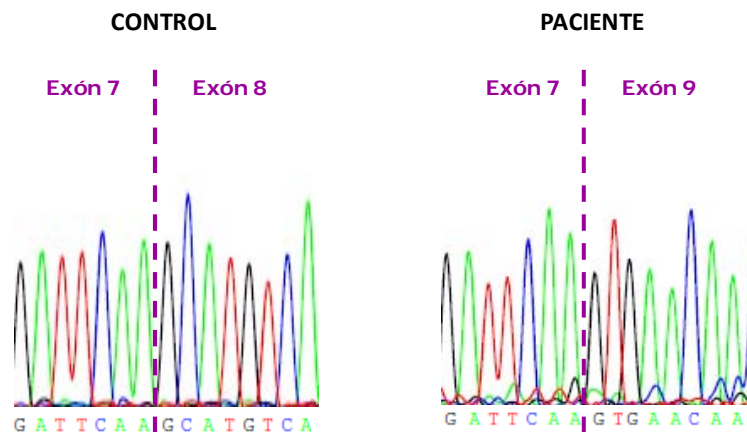


Figura IV.69. Análisis del cDNA de WASP. El paciente mostraba una ausencia del exón 8 en la secuencia.

4.4.7.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos y evolución

El rápido diagnóstico del paciente permitió realizar un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) precoz, a pesar de no haber ningún donante compatible en la familia. El TPH tuvo lugar a los 11 meses de edad y en este caso se trataba de un donante no relacionado con una identidad HLA 10 sobre 10.

Es muy pronto para determinar si la evolución es correcta, pero hasta la fecha todo indica que así es. Estamos a la espera de poder realizar los estudios de detección de la proteína WASP que nos permitan corroborar la correcta implantación de los linfocitos.

4.5.- XLN: Caso clínico 15

4.5.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso clínico de un varón caucásico nacido en el año 2000, que a los 6 meses de vida sufrió una reacción urticariforme que se diagnosticó como dermatitis atópica. Ya en ese momento se le detectó una profunda neutropenia que se mantuvo a lo largo de toda su vida. Nunca ha presentado ni infecciones severas ni anticuerpos anti-neutrófilos. Sin embargo, presenta una disminución de la mielopoyesis sin rasgos displásicos. Debido a esta neutropenia crónica severa, a los 10 años de edad, fue remitido a nuestro servicio para el estudio de Síndrome de Schwamann-Diamond. Después de analizar toda la secuencia del gen responsable, denominado *SBDS*, y concluir que era correcta, nos replanteamos el diagnóstico y sospechamos de una Neutropenia ligada al X (XLN).

Se trata del primer y único hijo de una pareja de padres no consanguíneos. No existen antecedentes familiares destacables.

4.5.2.- Datos inmunológicos

El análisis de los niveles de inmunoglobulinas realizado en nuestro servicio a los 10 años de edad indicaba que todas ellas estaban dentro de los rangos de normalidad (Tabla IV.13).

	P15	Valores de referencia (6-10 años)
IgG	862	630-1570 mg/dL
IgA	42	33-236 mg/dL
IgM	61	48-242 mg/dL
IgE	9	3-160 UI/mL

Tabla IV.13. Los niveles de inmunoglobulinas estaban en rangos de normalidad.

El estudio de las subpoblaciones linfocitarias mostraba un 86% de linfocitos T (48% CD4+, 27% CD8+ y 5% linfocitos T $\gamma\delta$), 9% de linfocitos B y 3% de células NK, estando todos ellos dentro de los límites de normalidad.

4.5.3.- Análisis del gen WAS

Tras descartar la presencia de mutaciones en el gen responsable del Síndrome de Schwamann-Diamond, denominado *SBDS*, decidimos estudiar el exón 9 de *WAS*, ya que es donde se han

descrito las mutaciones responsables de XLN. El análisis de este exón mostró una mutación en hemicigosis en el paciente: la Timina 881 estaba sustituida por una Citosina, lo que origina un cambio en la secuencia de la proteína (p.Ile294Thr) (Figura IV.70). La sustitución de la Isoleucina 294 por una Treonina ya ha sido asociada previamente a XLN (Ancliff, 2006).

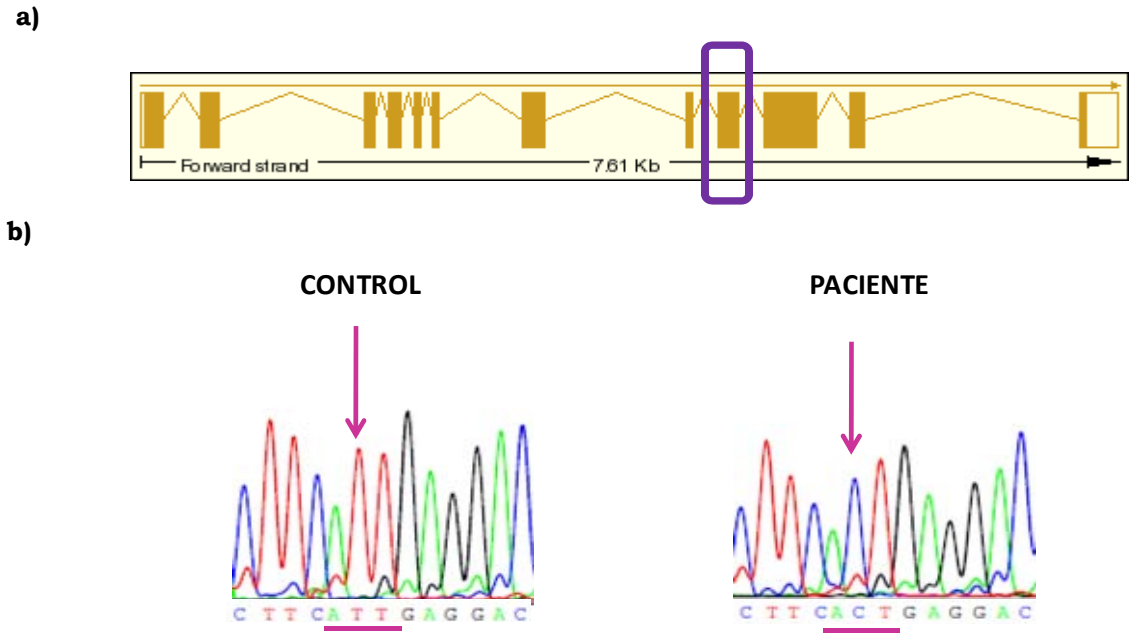


Figura IV.70. Esquema del gen WAS (a). Secuencia del exón 9 de WAS. En el paciente había una sustitución de una T por una C (c.T881C) en hemicigosis (b).

4.5.4.- Estudio de individuos portadores

Posteriormente se analizó la presencia de la mutación tanto en la madre como en la abuela materna del paciente. Ambas son portadoras de la alteración p.Ile294Thr (Figura IV.71), por lo que estamos pendientes de recibir muestras de toda la familia materna para completar el estudio de portadoras y posibles enfermos no diagnosticados.



Figura IV.71. Secuencia del exón 9 de WAS. Tanto en la madre como en la abuela materna se observaba la sustitución de la T881 por una C en heterocigosis (p.I294T).

5.- Síndrome linfoproliferativo ligado al X

El Síndrome Linfoproliferativo ligado al X (XLP) es una inmunodeficiencia de disregulación del sistema inmune en la que hay una respuesta inadecuada al virus de Epstein Barr (EBV), que provoca mononucleosis infecciosa fulminante, disgamaglobulinemia y linfomas malignos. También se conoce como Enfermedad de Duncan, y fue descrita por primera vez en 1975 (Purtilo, 1975). Posteriormente, se descubrió que algunos de estos pacientes tenían alteraciones en el gen *SH2D1A*, que codifica la proteína SAP (Coffey, 1998). En el año 2006 se identificó como responsable de esta patología mutaciones en otro gen diferente denominado *XIAP*, que codifica un inhibidor de la apoptosis (Rigaud, 2006). A partir de ese momento el XLP se subdividió en dos entidades, el XLP-1 (MIM: 308240) causado por alteraciones en SAP y el XLP-2 (MIM: 300635), debido a mutaciones en XIAP. Aún así, entre un 30-50% de los pacientes con manifestaciones clínicas de XLP no tiene mutaciones en ninguno de estos 2 genes. En el año 2009 se describieron 2 niñas con fenotipo XLP que tenían mutaciones en una kinasa relacionada con SAP, denominada ITK (Huck, 2009).

Antes de la infección por el EBV la mayoría de los individuos con XLP son clínicamente sanos. La infección primaria por este virus lleva a una proliferación incontrolada de linfocitos que puede provocar mononucleosis infecciosas severas y frecuentemente fatales, disgamaglobulinemia y/o trastornos linfoproliferativos (mayoritariamente de células B). No obstante, la disgamaglobulinemia y los linfomas malignos se pueden desarrollar en los individuos con XLP aunque nunca hayan estado expuestos al EBV. Hasta la fecha ninguno de los pacientes con XLP-2 ha desarrollado linfomas.

5.1.- XLP: Casos clínicos 16, 17 y 18

5.1.1.- Descripción de los casos clínicos

Presentamos los casos de tres hermanos varones, de origen caucásico, nacidos en los años 1994 (P16), 1997 (P17) y 2002 (P18), hijos de padres no consanguíneos. En el año 2000, el hermano mediano (P17) fue diagnosticado y tratado de un linfoma B no Hodgking de localización nodal-ileocecal del subtipo *Burkitt-like*. Posteriormente, en el año 2003, el hermano mayor (P16) fue diagnosticado y tratado de un linfoma de características anatomopatológicas similares. A diferencia del anterior, la serología para EBV era positiva. En el momento del diagnóstico los dos presentaban leucocitosis con neutropenia y anemia ferropénica. La evolución de ambos ha sido buena hasta la fecha. El hermano menor (P18) no ha desarrollado todavía ninguna patología. Como medida de precaución, está siendo sometido a revisiones periódicas (ecografías abdominales) cada 4 meses.

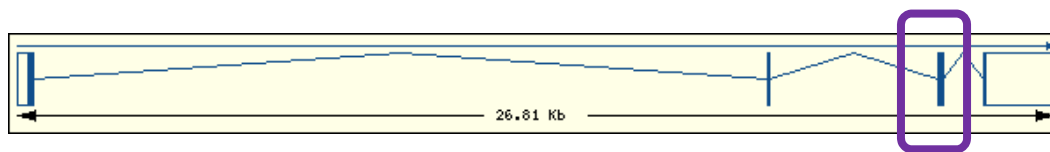
Como antecedentes familiares hay que destacar un caso de linfoma y otro de síndrome hematofagocítico en dos tíos maternos, que en ambos casos habían provocado la muerte (Figura IV.73).

La historia clínica de los dos hermanos mayores, junto con los antecedentes familiares de procesos linfoproliferativos desarrollados en varios varones de la familia materna, hizo sospechar que podían padecer un Síndrome linfoproliferativo ligado al X.

5.1.2.- Análisis del gen *SAP/SH2D1A*

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los genes responsables del XLP es el gen *SAP/SH2D1A*. Las muestras recibidas de los pacientes fueron de DNA por lo que sólo pudimos estudiarlos a nivel genómico. Puesto que se han descrito mutaciones en todos los exones del gen, amplificamos exón por exón, incluyendo las zonas dadoras y receptoras de *splicing*. Encontramos una mutación en el exón 3 en los tres hermanos. Se trataba de una sustitución de la Timina 305 por una Guanina (c.T305G), que daba lugar al cambio de la Valina 102 por una Glicina (p.Val102Gly). Esta mutación ya había sido previamente descrita (Sumegi, 2000). Estaba localizada en un sitio muy conservado y afectaba a la estructura de la proteína. La madre era portadora de la mutación (Figura IV.72).

a)



b)

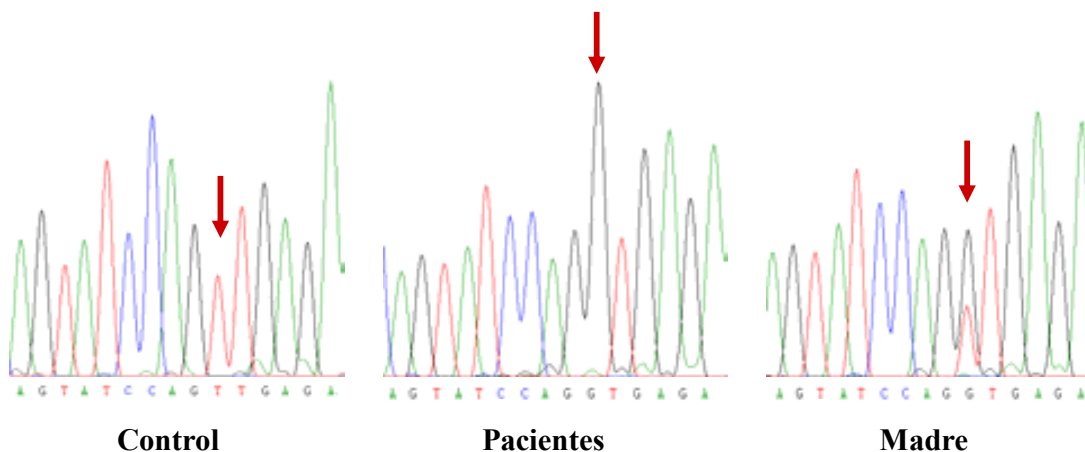


Figura IV.72. Esquema del gen *SAP/SH2D1A* (a). Secuencia del exón 3 de *SAP*. En los tres pacientes se observaba el cambio de una T por una G (c.T305G) en hemigosis y en la madre en heterogosis (b).

Aunque no pudimos analizar al resto de la familia, todo hace sospechar que la abuela materna también era portadora y que los tíos afectados debían tener la misma alteración (Figura IV.73). En la actualidad los 3 hermanos están pendientes de un trasplante de progenitores hematopoyéticos. Ante la infructuosa búsqueda de donantes HLA compatibles, la familia está intentando tener hijas a partir de embriones HLA idénticos a los pacientes.

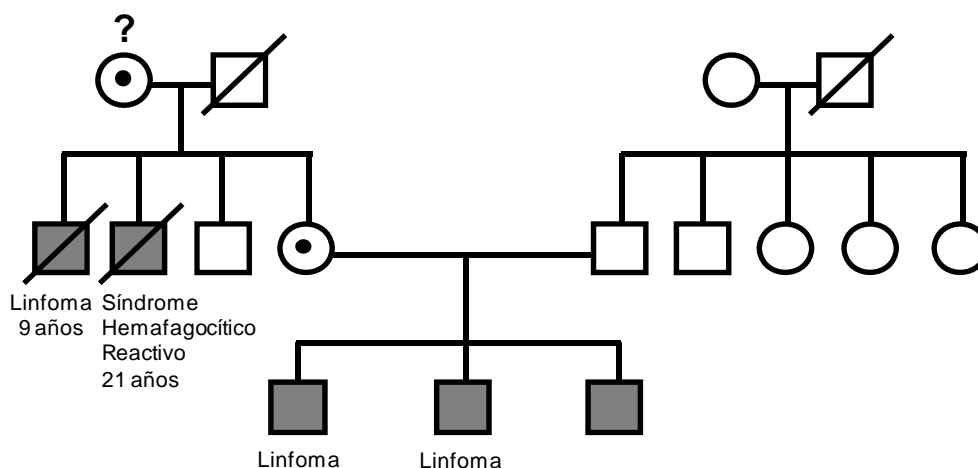


Figura IV.73. Árbol genealógico de los casos clínicos 16, 17 y 18. Los pacientes tenían antecedentes familiares de linfoma y síndrome hemafagocítico vía materna.

5.2.- XLP: Caso clínico 19

5.2.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de un varón de origen caucásico nacido en el año 2004 que a los 2 años de edad fue hospitalizado por una mononucleosis infecciosa de evolución clínica muy tórpida. La serología indicaba IgM positiva para el virus de Epstein Barr (EBV). Presentaba adenopatías múltiples y hepatomegalia. El aspirado de médula ósea mostró imágenes de hematofagocitosis y una linfocitosis muy importante. Ante la ineficacia de los tratamientos convencionales, se le administró *Rituximab*[®] obteniéndose así la depleción de los linfocitos B y con ella la negativización de la infección por el EBV, una disminución de la hematofagocitosis y la desaparición de la fiebre.

Durante el ingreso sufrió hemorragias digestivas debidas a ulceraciones en el yeyuno y dificultad respiratoria que fue empeorando progresivamente. Padebió infecciones respiratorias por *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens*, así como una bacteriemia por *Escherichia coli*. Se le detectaron infiltrados alveolares bilaterales. Cuatro meses después del ingreso murió a causa de una insuficiencia respiratoria grave. La necropsia mostró hematofagocitosis en bazo, médula ósea e hígado.

Se trata del primer hijo de padres no consanguíneos. Posteriormente, la pareja ha tenido otros dos hijos varones, uno en el año 2006 y otro en el 2008.

5.2.2.- Datos inmunológicos

Al analizar los niveles de inmunoglobulinas del paciente durante el ingreso a los 2 años de edad, se vio que los niveles de IgG estaban dentro de los rangos de normalidad mientras que los de IgA e IgM estaban algo incrementados (Tabla IV.14).

	P19	Valores de referencia (1-5 años)
IgG	551	420-1200 mg/dL
IgA	243	25-154 mg/dL
IgM	233	35-192 mg/dL

Tabla IV.14. La IgG presentaba niveles normales, mientras que la IgA y la IgM estaban ligeramente incrementadas.

El paciente presentaba linfocitosis ($8.300 \cdot 10^6/L$; v.n.: $2.000-8.000 \cdot 10^6/L$) acompañada de una leve neutropenia ($1.600 \cdot 10^6/L$; v.n.: $1.500-8.500 \cdot 10^6/L$). El análisis de las poblaciones linfocitarias no mostró ninguna alteración relevante. El paciente tenía un 80% de linfocitos T (44% CD4+ y 34% CD8+), un 8% de linfocitos B y un 11% de células NK. El estudio de la expresión de HLA-DR como marcador de activación mostró que casi la mitad de los linfocitos T CD8+ estaban activados, ya que expresaban dicha molécula.

5.2.3.- Análisis del mRNA de SAP

Como los datos clínicos establecían la sospecha diagnóstica de XLP, decidimos analizar la proteína SAP, proteína implicada en el XLP-1, y empezamos a nivel de mRNA. Se realizó la RT-PCR a partir de RNA total extraído de linfocitos T activados con PHA e IL-2 durante 3 días. Mientras que en los individuos control se amplificaba una banda de unas 600 bp, en el paciente esta banda era indetectable. Para verificar que tanto la extracción de RNA como la RT-PCR habían sido correctas, analizamos el cDNA de un gen control (*TNFRSF6*) y vimos que ésta era cualitativa y cuantitativamente equivalente a los individuos control (Figura IV.74).

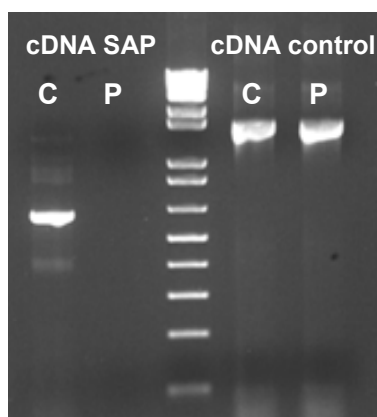


Figura IV.74. Expresión del cDNA de SAP y de un gen control (*TNFRSF6*). En el paciente no había amplificación del cDNA de SAP.

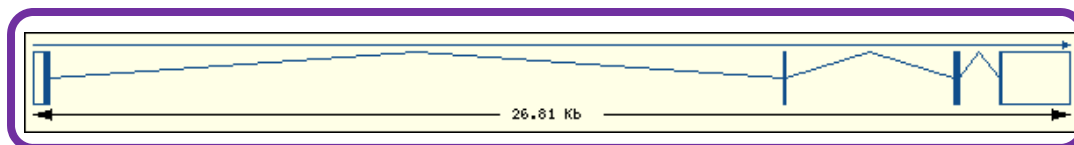
Puesto que parecía tratarse de una delección, pasamos a estudiar el gen *SAP/SH2D1A* a partir de DNA genómico.

5.2.4.- Análisis del gen *SAP/SH2D1A*

Amplificamos los 4 exones del gen *SAP/SH2D1A* por separado. En el paciente no se detectó producto de PCR en ninguno de ellos. Para ver si la delección abarcaba a más genes cercanos del cromosoma X, amplificamos el exón 2 de *XIAP*, el otro gen descrito implicado en XLP. En

este caso sí que hubo amplificación, lo que sugería que el paciente sólo estaba afectado por una deleción del gen *SAP/SH2D1A* (Figura IV.75). Una deleción de todo el gen había sido ya descrita en un paciente de origen japonés (Honda, 2000).

a)



b)

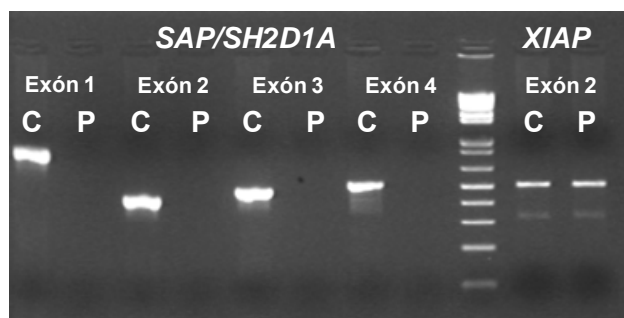


Figura IV.75. Esquema del gen *SAP/SH2D1A* (a). Amplificación de los exones de *SAP* y del exón 2 de *XIAP*. En el paciente no había amplificación de *SAP*, pero sí del gen control *XIAP* (b).

5.2.5.- Estudio de individuos portadores

Habiendo identificado la alteración responsable de la patología en el paciente, decidimos estudiar la familia materna ya que se trataba de una enfermedad ligada al sexo (Figura IV.77).

Ninguno de los tíos maternos había referido sintomatología alguna, a pesar de lo cual decidimos estudiarlos. La amplificación correcta de los exones del gen *SAP/SH2D1A* demostró que no estaban afectados por esta enfermedad.

Para saber si la madre del paciente era portadora de la deleción tuvimos que realizar una PCR semicuantitativa en tiempo real (qPCR). Esta técnica nos permitió establecer el número de copias del gen *SAP/SH2D1A* presentes en la madre (representada en color azul), en comparación con las de dos individuos control: un varón (en rojo), que sólo tiene una copia del cromosoma X, y una mujer (en verde), con dos copias. Como control de la técnica amplificamos otro gen no situado en el cromosoma X, *JAK3*. No pudimos estudiar a la abuela materna al no disponer de muestra.

Los resultados indicaban que la madre de los pacientes era portadora de la deleción, ya que el número de copias del gen *SAP/SH2D1A* era equivalente a las del individuo varón: las curvas de amplificación azul y roja eran equivalentes entre ellas y diferentes a la verde. La amplificación del gen control *JAK3* mostraba que la madre tenía el mismo número de copias que ambos controles, lo que indicaba que el proceso era correcto y que el bajo número de copias del gen *SAP/SH2D1A* en la madre no era debido a una menor cantidad de DNA en la reacción de qPCR sino a que era portadora de la deleción (Figura IV.76).

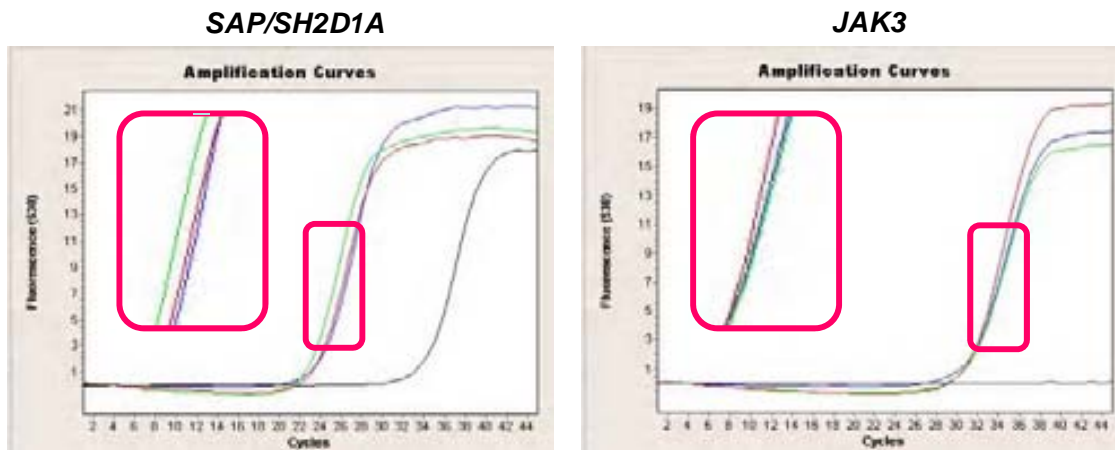


Figura IV.76. Análisis de las curvas de amplificación de la qPCR dónde se observaba que el número de copias del gen *SAP/SH2D1A* en la madre de los pacientes (azul) era equivalente al control XY (rojo) y no al control XX (verde), indicando que era portadora de la deleción. La amplificación del gen *JAK3* era equivalente en los 3, mostrando que la cantidad de DNA inicial era la misma para todas las muestras.

En el año 2006, el matrimonio tuvo otro hijo varón. Poco después del nacimiento analizamos el gen *SAP/SH2D1A* y vimos que no estaba afectado por la deleción descrita en su hermano. Lo mismo sucedió en el año 2008 tras el alumbramiento del tercer hijo varón de la pareja.

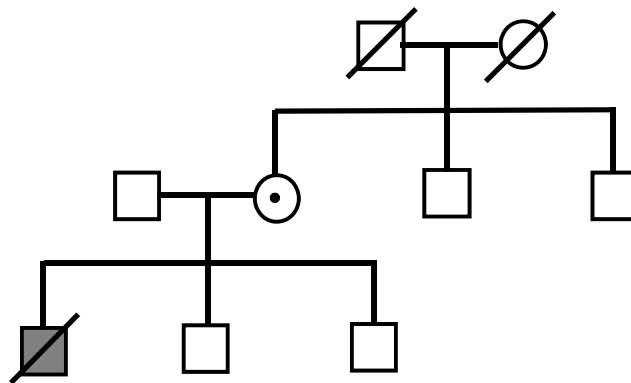


Figura IV.77. Árbol genealógico del caso clínico 19. El paciente presentaba la deleción en hemicigosis y la madre en heterocigosis.

6.- Enfermedad Granulomatosa Crónica

La Enfermedad Granulomatosa Crónica (CGD) es una inmunodeficiencia primaria que afecta a 1 de cada 250.000 individuos. Está causada por un defecto en la cadena respiratoria implicada en la destrucción de bacterias y hongos fagocitados por las células mieloides (Holmes, 1967). Como resultado del fallo en esta respiración oxidativa, los pacientes con CGD sufren infecciones bacterianas y fúngicas severas y recurrentes, con aparición de grandes granulomas. La respiración oxidativa está catalizada por el complejo enzimático denominado NADPH oxidasa que consta de 5 subunidades: gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox}. Las mutaciones en el gen *CYBB* que codifica la proteína gp91^{phox} son responsables de la forma ligada al sexo (X-CGD; MIM: 306400) que afecta a un 70% del total de pacientes con CGD. El 30% restante tienen una herencia autosómica recesiva y afecta por igual a varones y mujeres. Son causadas por mutaciones en los genes *CYBA*, que codifica p22^{phox} (MIM: 233690), *NCF1*, que lo hace para p47^{phox} y constituye un 25% del total (MIM: 23370), y *NCF2*, para p67^{phox} (MIM: 233710). Recientemente se ha descrito un paciente con mutaciones en p40^{phox} responsables de CGD (Matute, 2009).

6.1.- X-CGD: Caso clínico 20

6.1.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de un varón de origen caucásico nacido en el año 2005 que en el primer mes de vida desarrolló una enfermedad inflamatoria intestinal crónica. Al principio se sospechó de una alergia alimentaria, pero no se encontró el alérgeno responsable, y después una Enfermedad Celíaca, descartándose ambas. Empezó a desarrollar anemia (82 g/L; v.n.: 105-125 g/L), por lo que se pensó primero en una anemia ferropénica y luego en una anemia hemolítica autoinmune, no confirmándose ninguna de ellas. El retraso en la caída del cordón umbilical sugirió un Síndrome de Adhesión Leucocitaria (LAD). La correcta expresión de CD11a y CD18 descartó el LAD-1 y la de CD15 el LAD-2.

A los 10 meses de edad sufrió una osteomielitis causada por *Serratia sp* y al año una endocarditis bacteriana de etiología desconocida. Se sospechó de Enfermedad Granulomatosa Crónica y es entonces cuando fue derivado a nuestra sección para la determinación de la capacidad oxidativa de los granulocitos. La ausencia de las típicas infecciones (neumonías, linfadenitis e infecciones cutáneas) y de granulomas, dificultó un diagnóstico más precoz.

Se trata del tercer hijo de padres no consanguíneos. El segundo hijo de la pareja murió en el año 2002 a los 15 meses de edad como consecuencia de una colitis ulcerosa que se complicó en una sepsis por *Pseudomonas* y que finalmente originó un síndrome hematofagocítico que resultó letal. La madre fue diagnosticada y tratada de un cáncer de colon a los 30 años.

En la actualidad está en busca de un donante de progenitores hematopoyéticos por carecer de familiar HLA compatible.

6.1.2.- Datos inmunológicos

El primer análisis de los niveles de inmunoglobulinas que se realizó a los 4 meses de edad se mantuvo dentro de los rangos de normalidad (Tabla IV.15). Los niveles de IgE eran un poco

elevados, pero no se detectó IgE específica para ninguno de los alérgenos estudiados (leche de vaca, caseína, lactoalbúmina, lactoglobulina y soja).

	P20	Valores de referencia (0-1 año)
IgG	793	200-1000 mg/dL
IgA	20	16-85 mg/dL
IgM	74	25-149 mg/dL
IgE	19	0,1-15 UI/mL

Tabla IV.15. Los niveles de inmunoglobulinas estaban en rangos de normalidad.

Ante la sospecha de anemia hemolítica autoinmune se realizaron pruebas para detectar posibles autoanticuerpos (anti-nucleares, anti-músculo liso, anti-mucosa gástrica, anti-mitocondriales, anti-neutrófilos, anti-tiroideos...) siendo el resultado negativo para todos. La determinación de anticuerpos anti-transglutaminasa descartó la Enfermedad Celíaca.

Los valores absolutos de linfocitos ($6.760 \cdot 10^6/L$; v.n.: $4.000-13.500 \cdot 10^6/L$), así como las poblaciones linfocitarias tenían valores normales, ya que presentaba un 65% de linfocitos T (59% de CD4+ y 5% de CD8+), un 26% de linfocitos B y un 1% de linfocitos NK. Además, expresaba correctamente los marcadores de adhesión leucocitaria CD11a, CD15 y CD18, así como moléculas HLA de clase I y clase II.

6.1.3.- Determinación de la capacidad oxidativa de los granulocitos

6.1.3.1.- BURSTTEST®

El diagnóstico de CGD se realizó analizando la capacidad oxidativa de las células mieloides del paciente. Utilizamos el kit comercial *BURSTTEST*® para determinar cuantitativamente la actividad respiratoria de los granulocitos del paciente y de su familia. Tras la estimulación con *E. coli* opsonizadas o PMA y la incubación con el sustrato reducido, se analizaron las muestras en el citómetro de flujo. Allí se seleccionaron los neutrófilos y se cuantificó la producción de especies reactivas del O_2 mediante la cantidad de fluorescencia emitida por el sustrato oxidado. La capacidad oxidativa de los granulocitos estimulados del paciente fue nula. En la madre parecía que un 80% respondía a los estímulos, mientras que un 20% no lo hacía (Figura IV.78).

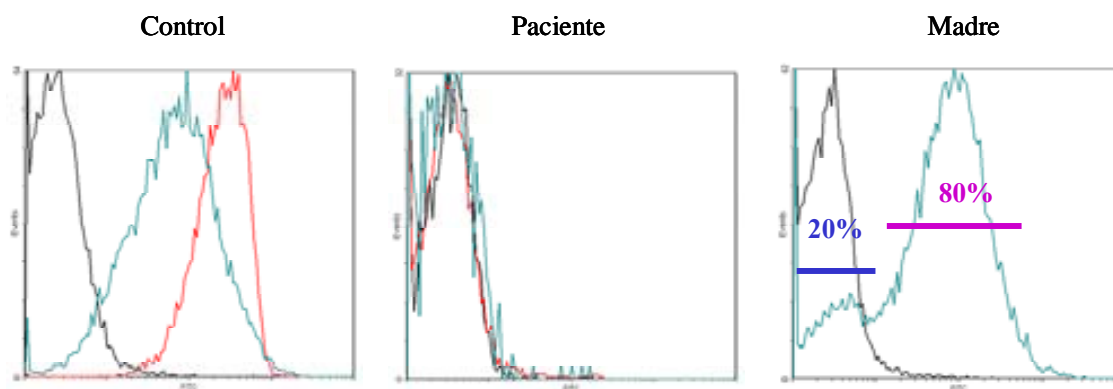


Figura IV.78. Cuantificación de la actividad oxidativa de los granulocitos mediante el *BURSTTEST*® (en negro se expresaba el control negativo, en verde la estimulación con *E.coli* y en rojo con PMA). En el paciente no había respuesta con ninguno de los estímulos, mientras que en la madre era parcial.

El resultado de la prueba fue equivalente a los individuos control tanto en el padre como en el hermano sano. A partir de estos datos se estableció el diagnóstico de CGD en el paciente, y se sospechó de una herencia ligada al sexo.

6.1.3.2.- Oxidación de la Dihidrorodamina (DHR)

Esta prueba era muy similar a la anterior pero con algunas diferencias técnicas. Sirvió para confirmar el resultado del *BUSRTTEST*[®] en el paciente y para determinar con mayor exactitud el porcentaje de granulocitos que conservaba la función oxidativa en su madre, ya que esta técnica permitía separar mejor las poblaciones celulares según su activación.

Realizamos la prueba en el paciente, su madre y un control. Tal y como habíamos observado previamente, la capacidad oxidativa de los granulocitos del paciente era nula. En la madre un 83% de los granulocitos se activaba normalmente y un 17% no lo hacía (Figura IV.79), lo que se correspondía con el resultado anterior (Figura IV.78).

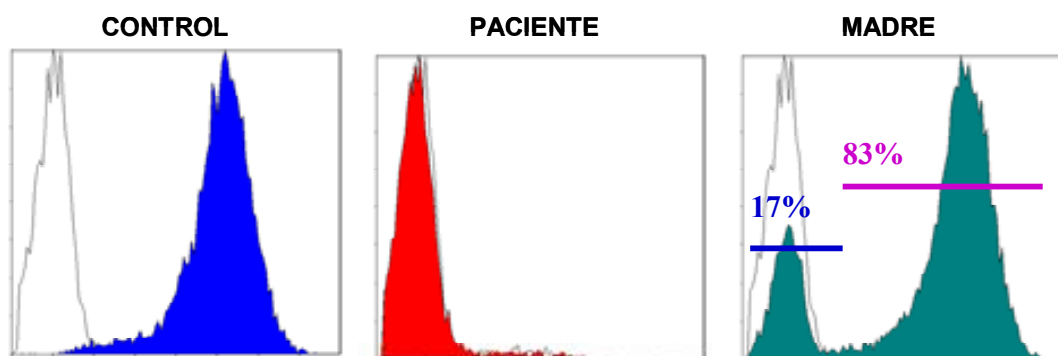


Figura IV.79. Cuantificación de la actividad oxidativa de los granulocitos por citometría de flujo mediante la oxidación de la DHR. En el paciente no había respuesta y en la madre sólo respondían un 83% de los granulocitos.

Esta bimodalidad observada en la madre del paciente debería responder a la inactivación aleatoria del cromosoma X que se da en la forma ligada al X de esta enfermedad. En este caso las células mieloides no ven afectado su paso a periferia por tener sólo alterada la capacidad oxidativa y por ello las detectamos en sangre. Sin embargo, la inactivación no era totalmente al azar (al 50%), ya que la distribución en la madre era 17% *versus* 83%.

6.1.4.- Tinción intracelular indirecta de gp91^{phox}

Dado que el paciente es un varón, que la forma más frecuente de CGD es la ligada al X y que la madre tenía una expresión cuasi bimodal de la alteración, sospechamos de X-CGD. Por eso, iniciamos el estudio de la proteína gp91^{phox}, proteína afectada en esta variante de la enfermedad.

La proteína gp91^{phox} se encuentra en los fagosomas de las células mieloides, como neutrófilos y monocitos. Para detectarla mediante citometría de flujo permeabilizamos y fijamos estas células. Se estudió la expresión de gp91^{phox} en monocitos tanto del paciente como de su madre. La expresión en el paciente era menor que en los controles sanos, pero superior al control negativo de la técnica, que fue realizado con un anticuerpo irrelevante para los monocitos (anti-CD7). En la madre se observaban dos poblaciones, una que expresaba gp91^{phox} de manera equivalente a los controles (82%) y otra que lo hacía igual que el paciente (18%) (Figura

IV.80). Esta prueba indicaba la ausencia de proteína gp91^{phox} nativa en el paciente y confirmaba que la madre era portadora de la alteración. Asimismo, se confirmaba que en la madre no existía una inactivación del cromosoma X al azar (no es al 50%, sino del 20%/80%) coincidiendo con lo que se había demostrado en los tests anteriores (Figura IV.78 y IV.79).

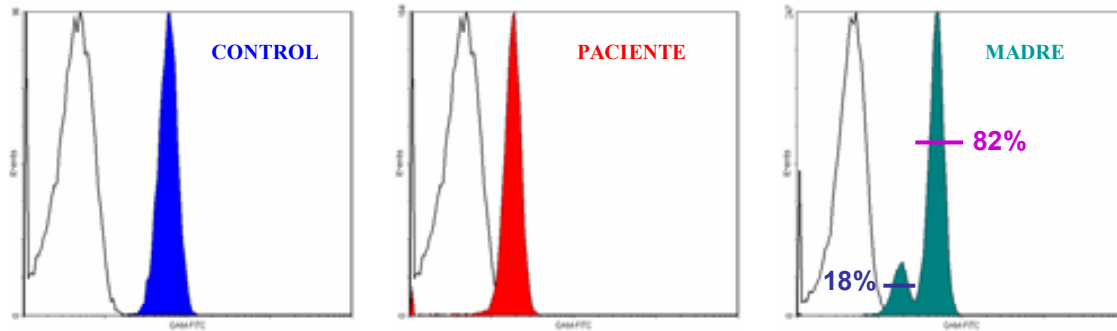


Figura IV.80. Expresión de gp91^{phox} mediante citometría de flujo en monocitos. La expresión de gp91^{phox} en el paciente estaba disminuida respecto a los controles, aunque era superior al control negativo de la técnica. En la madre había una bimodalidad.

6.1.5.- Western blot para gp91^{phox}

Para saber si existía alguna forma truncada de proteína gp91^{phox} en el paciente, realizamos un *western blot* de esta proteína sobre extractos procedentes de neutrófilos. Esta determinación mostró una ausencia de gp91^{phox} nativa (91 KDa) y de otras formas truncadas (Figura IV.81).

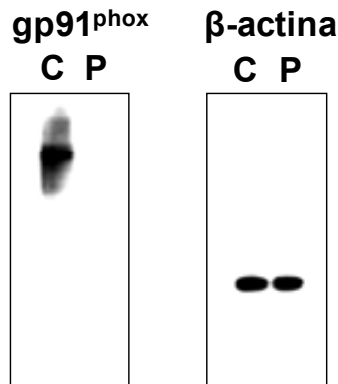


Figura IV.81. Expresión de gp91^{phox} y β -actina mediante *western blot* en neutrófilos. En el paciente no se detectaba gp91^{phox}.

Para comprobar que el extracto del paciente había sido procesado correctamente teñimos la β -actina (45 KDa) sobre la misma membrana de nitrocelulosa. El paciente expresaba β -actina de manera equivalente a los individuos control.

Supusimos entonces que la expresión disminuida de gp91^{phox} observada en la citometría podía ser debida a una inespecificidad del anticuerpo que no se reproduce en el *western blot*, o probablemente, a la diferente sensibilidad de ambas técnicas.

6.1.6.- Análisis del mRNA de gp91^{phox}

Para determinar que la ausencia de gp91^{phox} nativo se justificaba por alteraciones a nivel genético pasamos a estudiar el gen *CYBB* y comenzamos por su expresión a nivel de mRNA. Partimos de RNA extraído de leucocitos totales. Dado su enorme tamaño (4.324 bp) decidimos dividirlo en 3 partes para poder estudiarlo. No encontramos alteraciones de *splicing* en ninguno de los 3 fragmentos. Al secuenciarlos hallamos una sustitución en el exón 3: la Timina de la posición 175 estaba sustituida por una Citosina (c.T175C). Esta alteración origina un cambio en la secuencia aminoacídica, ya que la Cisteína 59 se convierte en una Arginina (p.Cys59Arg) (Figura IV.82). Esta mutación, ya descrita en la literatura como T189C (Rae, 1998) da lugar a una ausencia completa de proteína nativa, tal y como reflejan nuestros estudios anteriores de *western blot*.

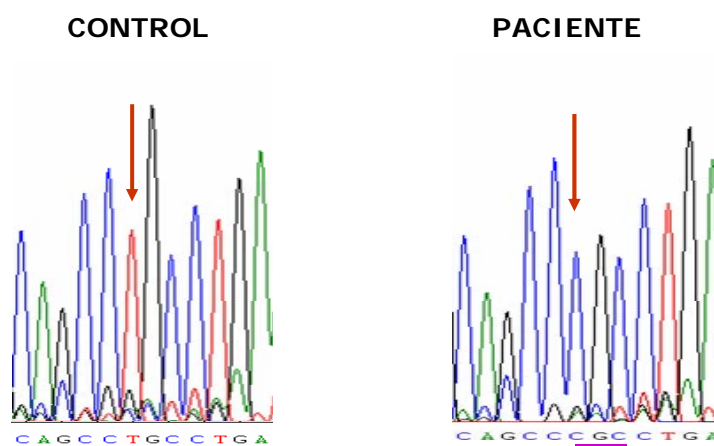
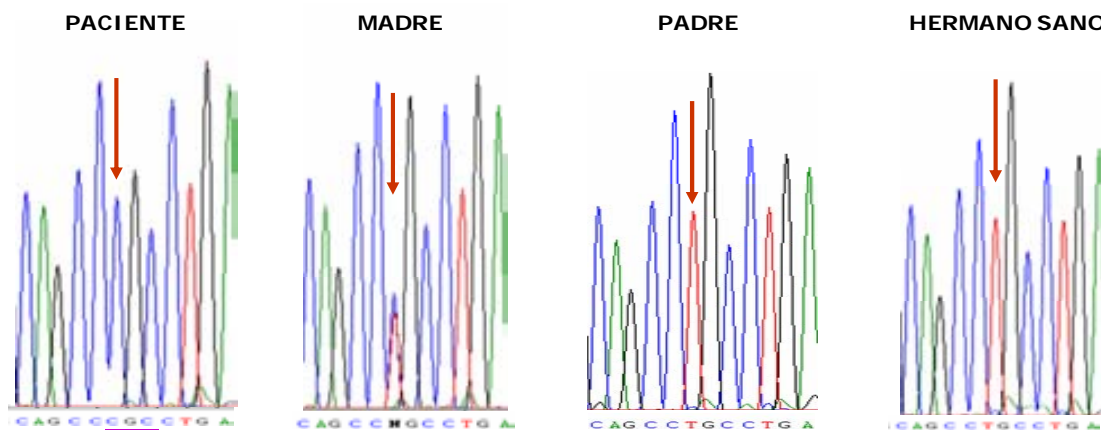


Figura IV.82. Secuencia del cDNA de gp91^{phox}. En el paciente se observaba una sustitución de una T por una C en hemicigosis (c.T175C).

6.1.7.- Análisis del gen *CYBB*

Para corroborar la existencia de la mutación en el paciente y ampliar el estudio a toda su familia, analizamos el exón 3 de *CYBB* a nivel genómico. El paciente tenía la mutación c.T175C en hemicigosis. Además, vimos que la madre era portadora de la alteración, mientras que el padre y el hermano sano tenían la secuencia nativa (Figura IV.83).

a)



b)

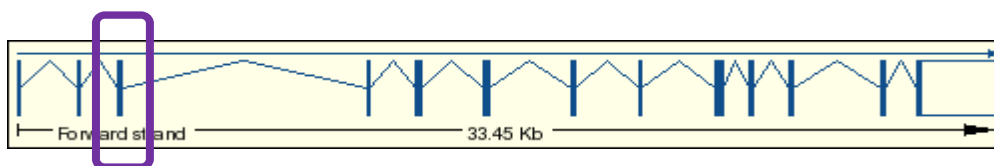


Figura IV.83. Secuencia del exón 3 de *CYBB*. El paciente mostraba una sustitución de una T por una C (c.T175C) en hemicigosis y la madre en heterocigosis (a). Esquema del gen *CYBB* (b).

6.1.8.- Estudio de individuos portadores

Los datos anteriores establecían que la madre del paciente era portadora de la enfermedad. Puesto que se trataba de una alteración ligada al cromosoma X, decidimos analizar la familia materna. Ambos abuelos habían fallecido, por lo que sólo pudimos estudiar a la tía materna, que resultó no ser portadora de la alteración (Figura IV.84). Al no poder estudiar a la abuela materna, no pudimos saber si se trataba de una mutación *de novo* en la madre o por el contrario procedía de la generación anterior.

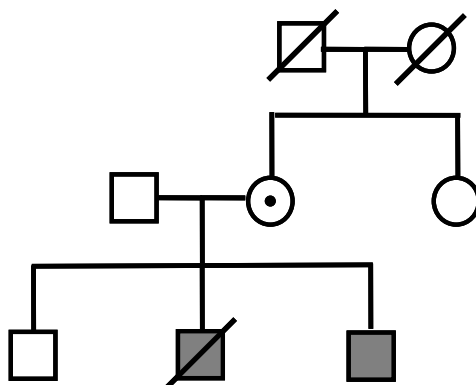


Figura IV.84. Árbol genealógico del caso clínico 20. La madre era portadora de la mutación.

Ante la sospecha de que el hermano del paciente fallecido en el año 2002 a los 15 meses de vida podría haber tenido la misma alteración genética, decidimos estudiarlo. En el laboratorio no disponíamos de muestra biológica, sin embargo, se le había realizado una biopsia intestinal poco antes de su fallecimiento. Se extrajo DNA a partir de esta biopsia y se procedió a la amplificación del exón 3 del gen *CYBB*. No pudimos amplificarlo con los *primers* que previamente habíamos utilizado (gp91ex3F y gp91ex3R) porque el DNA estaba muy degradado y el fragmento a amplificar era demasiado grande (unas 300 bp). Por ello, diseñamos unos nuevos *primers* (gp91mutF y gp91mutR) que incluyeran la mutación en un amplicón lo más pequeño posible (80 bp). De esta forma sí logramos amplificarlo pero, debido a su pequeño tamaño, resultó muy difícil secuenciarlo. Para resolver este último impedimento, subclonamos el producto de amplificación en el vector pCR2.1 (*Invitrogen*) y lo secuenciamos con *primers* situados en el vector.

El hermano fallecido tenía la mutación c.T175C (Figura IV.85), lo que permitió establecer que había fallecido por complicaciones de la X-CGD.

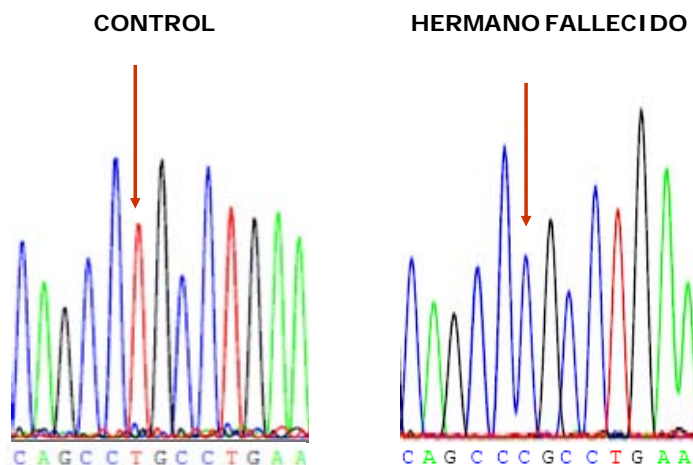


Figura IV.85. Secuencia del exón 3 de *CYBB* del hermano fallecido del caso clínico 20. Se identificó la misma mutación que en su hermano (c.C175C).

6.2.- X-CGD: Caso clínico 21

6.2.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de un varón de origen marroquí nacido en el año 2008, que al mes de vida fue ingresado debido a una aspergilosis invasiva pulmonar con urocultivo positivo para *Klebsiella pneumoniae*. En el periodo neonatal había presentado un sangrado intestinal autolimitado orientado como colitis alérgica leve. En el hospital de procedencia se le realizó la prueba de la capacidad oxidativa de los granulocitos, siendo negativa y con ello estableciéndose el diagnóstico de Enfermedad Granulomatosa Crónica.

Es hijo de padres consanguíneos (primos hermanos). Tiene una hermanastra por parte de padre que fue ingresada en el mismo hospital por una neumonía por *Staphylococcus aureus* con test de oxidación normal. Existen antecedentes familiares por ambas vías de primos y primas muertos durante la infancia por causa desconocida. Por este motivo se sospechó de una forma autosómica recesiva de la enfermedad y fue remitido a nuestro hospital para determinar el defecto genético responsable cuando contaba con 6 meses de vida.

6.2.2.- Datos inmunológicos

Lo primero que hicimos fue una valoración global de su estado inmunológico. Los niveles de inmunoglobulinas estaban dentro de la normalidad (Tabla IV.16).

	P21	Valores de referencia (0-1 año)
IgG	975	200-1000 mg/dL
IgA	46	16-85 mg/dL
IgM	66	25-149 mg/dL
IgE	15	0,1-15 UI/mL

Tabla IV.16. Los niveles de inmunoglobulinas estaban en rangos de normalidad.

El número de linfocitos no estaba alterado ($4.460 \cdot 10^6/L$; v.n.: $4.000-13.500 \cdot 10^6/L$) y el análisis de las poblaciones linfocitarias tampoco mostró ninguna alteración: un 44% de linfocitos T (29% T CD4+ y 14% T CD8+), un 44% de linfocitos B y un 10% de células NK.

6.2.3.- Determinación de la capacidad oxidativa de los granulocitos

Aunque al paciente y su madre ya se les había evaluado la capacidad oxidativa de los granulocitos, quisimos repetir la prueba, ya que el resultado de ésta puede verse alterado en procesos de infección activa. Esta determinación fue realizada a través de la oxidación de la Dihidrorodamina 123 (DHR). En el paciente, a diferencia de lo que sucedía en los controles, no había oxidación de la DHR (Figura IV.86), con lo que quedaba confirmado el diagnóstico de CGD. Así mismo, el resultado obtenido en la madre parecía concordante con una forma autosómica recesiva de la enfermedad, ya que éste era totalmente equivalente al de los individuos control (Figura IV.86).

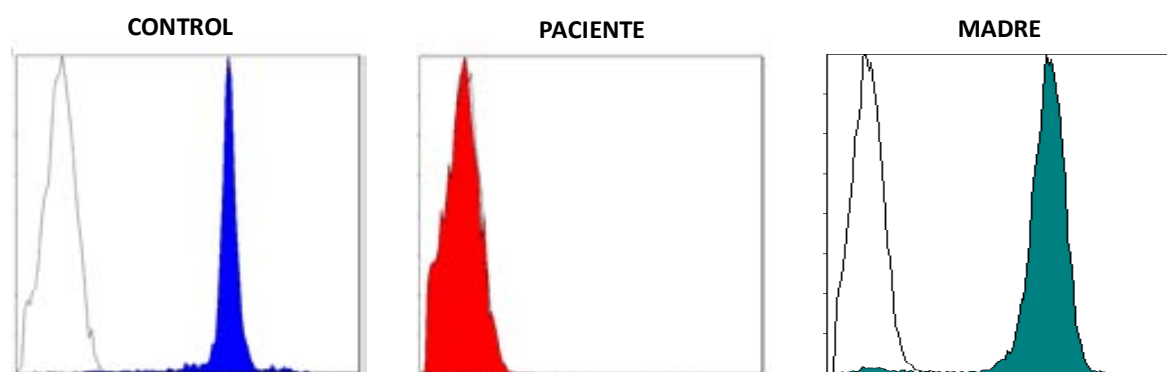


Figura IV.86. Cuantificación de la actividad oxidativa de los granulocitos por citometría de flujo mediante la oxidación de la DHR. La actividad oxidativa era nula en el paciente.

6.2.4.- Análisis del mRNA de p47^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox} y gp91^{phox}

El diagnóstico del hospital de procedencia era Enfermedad Granulomatosa Crónica Autosómica Recesiva (AR-CGD). Por ese motivo, y tras confirmar que se trataba de una CGD, empezamos el análisis de los genes implicados.

En primer lugar analizamos el gen *NCF1*, que codifica la proteína p47^{phox}, por tratarse de la deficiencia más frecuente de las AR (25%). La gran mayoría de los casos están causados por una recombinación entre el gen *NCF1* y su pseudogen (*ψNCF1*). Esta recombinación anómala causa la delección del dinucleótido GT del tandem GTGT de las 4 primeras bases del exón 2 del gen, comportando la pérdida de la pauta de lectura y la aparición de un codón STOP con la consecuente ausencia de proteína. Por lo tanto, lo primero que hicimos fue estudiar el exón 2 del gen *NCF1* del paciente. El paciente no presentaba la recombinación anómala en homocigosis. A continuación analizamos el mRNA completo de p47^{phox} sin hallar ninguna mutación. Entonces, pasamos a estudiar los otros genes responsables de AR-CGD.

Siguiendo el orden de prevalencia de las AR-CGD, analizamos el cDNA de p22^{phox}. En el paciente no existían ni alteraciones de *splicing* ni mutaciones en la secuencia codificante.

Por último, pasamos a estudiar el cDNA de p67^{phox}, que es la deficiencia menos descrita en la literatura (<3%). El gen *NCF2* que codifica p67^{phox} tampoco contenía ninguna alteración.

Es entonces cuando nos replanteamos el diagnóstico inicial, y puesto que se trataba de un varón, decidimos estudiar el mRNA que codifica la proteína gp91^{phox}. Al igual que en el caso anterior, partimos de RNA extraído de leucocitos totales y para facilitar su estudio, lo dividimos en 3 fragmentos. No encontramos alteraciones de *splicing*. Sin embargo, cuando secuenciamos el segundo fragmento vimos una alteración en el exón 7. Mientras en el individuo control había 6 Adeninas seguidas, en nuestro paciente sólo había 4. Además, había una Timina adicional después de las 4 Adeninas (c.741delA+A742T) (Figura IV.87). Esta mutación no ha sido descrita en la literatura hasta el momento.

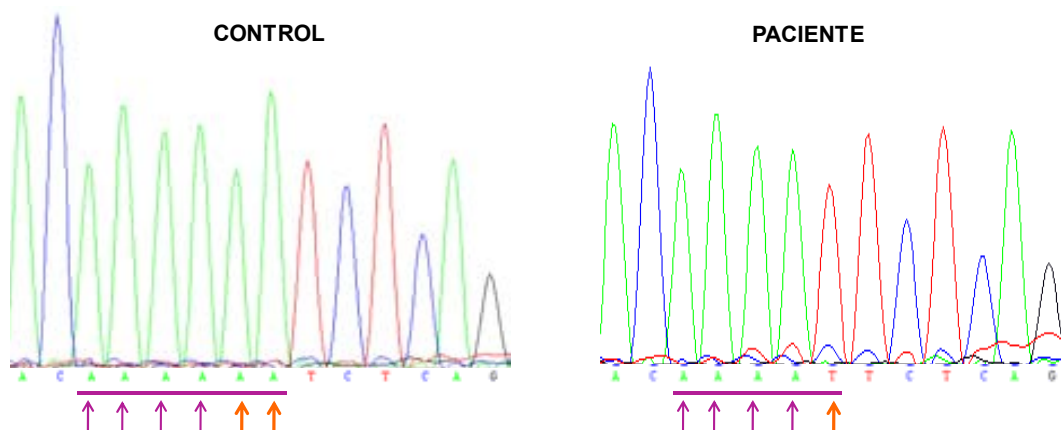


Figura IV.87. Secuencia del cDNA de *CYBB*. Las 6 Adeninas del individuo control estaban sustituidas por 4 Adeninas más una Timina en el paciente (c.741delA+A742T) en hemicigosis.

Si de 6 bases pasamos a 5, hay un desplazamiento en la pauta de lectura. Esta alteración provocaba la aparición de un codón STOP 7 aminoácidos después (p.Lys247fsX7)(Figura IV.88).

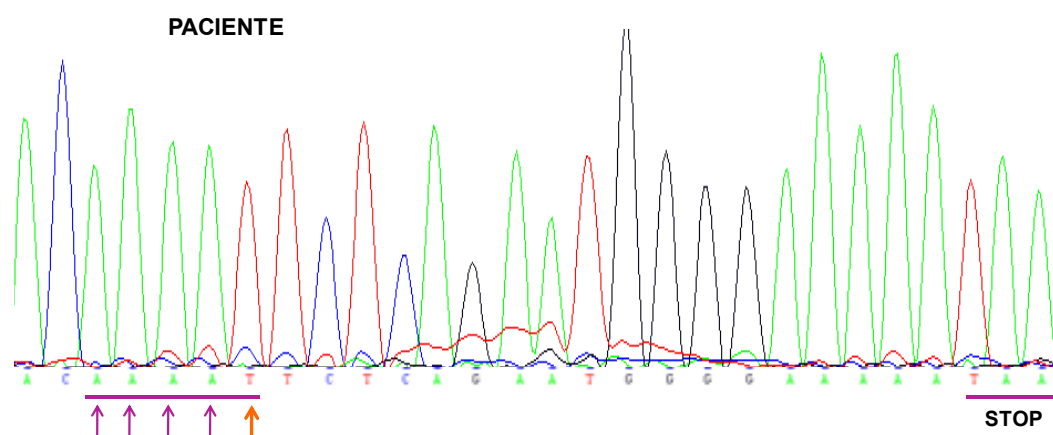


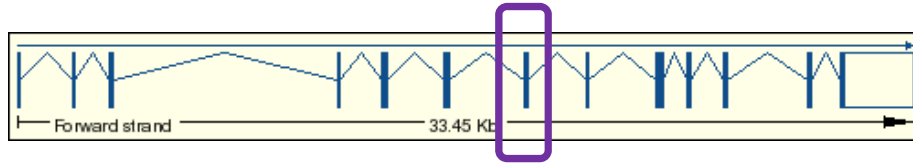
Figura IV.88. Secuencia del cDNA de *CYBB*. El cambio c.741delA+A742T llevaba a la aparición de un codón STOP prematuro en el paciente.

6.2.5.- Análisis del gen *CYBB*

A continuación, corroboramos la presencia de la mutación a nivel genómico. Para ello, amplificamos y secuenciamos el exón 7 de *CYBB*. Sólo el paciente era portador de la mutación p.Lys247Xfs7, ya que el análisis de la secuencia del gen *CYBB* en la madre no mostró ninguna

alteración (Figura IV.89). Es decir, que se trataba de una mutación *de novo* en el paciente, lo que se correlacionaba con los datos de actividad oxidativa mostrados anteriormente (Figura IV.86).

a)



b)

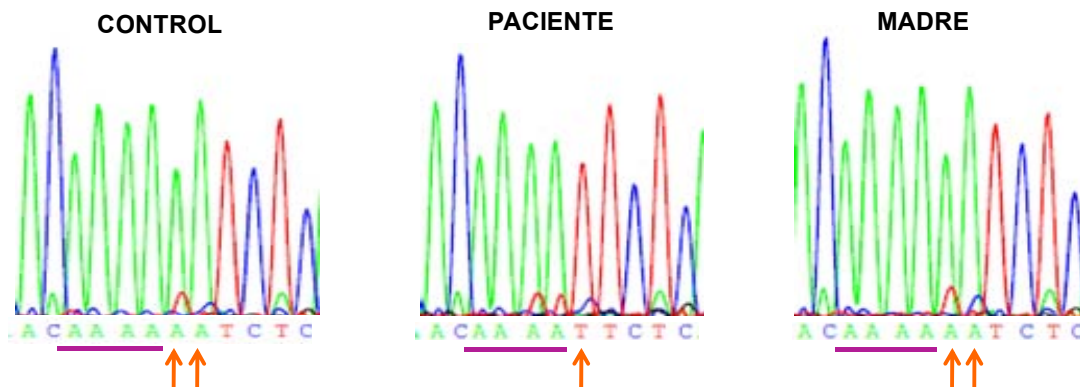


Figura IV.89. Esquema del gen *CYBB* (a). Secuencia del exón 7 de *CYBB*. El paciente era el único portador de la alteración, ya que la madre no contenía ninguna copia alterada (b).

6.2.6.- Estudio de individuos portadores

El paciente pertenecía a una extensa familia en la que se habían producido muertes en la infancia de causa desconocida. Sin embargo, la madre no era portadora de la mutación por lo que descartamos que esas muertes estuvieran relacionadas con la mutación en el gen *CYBB* hallada en el paciente.

6.3.- AR-CGD: Casos clínicos 22, 23 y 24

6.3.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de un varón de origen caucásico de origen palestino nacido en el año 1997 (P22) que a los 11 años de edad sufrió un absceso cerebeloso por el hongo *Aspergillus fumigatus*. Hasta ese momento no había referido sintomatología destacable. A pesar de que este tipo de infecciones no son subjetivas de Enfermedad Granulomatosa Crónica, se le realizó el test de oxidación de granulocitos. El resultado de esta prueba estableció el diagnóstico de CGD.

Se trata del primer hijo de padres consanguíneos (primos hermanos). La pareja tiene otros dos hijos varones nacidos en el año 2000 (P23) y 2004 (P24) que no han referido sintomatología hasta la fecha. Tras el debut de la enfermedad se planteó la posibilidad de realizar un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) al paciente de uno de sus hermanos. Con

este fin, fueron remitidos a nuestro hospital muestras de toda la familia para evaluar su idoneidad como donantes.

Recientemente, el paciente ha sufrido una neumonía fúngica de tórpida evolución por *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium sp* y complicaciones digestivas tipo colitis granulomatosa, por lo que se está acelerando la búsqueda de un donante para el TPH.

6.3.2.- Datos inmunológicos

El análisis de las poblaciones linfocitarias del caso índice (P22) no presentó ninguna alteración: 70% de linfocitos T (36% T CD4+ y 34% T CD8+), 9% de linfocitos B y un 17% de NK.

6.3.3.- Determinación de la capacidad oxidativa de los granulocitos

Lo primero que hicimos fue realizar el estudio de la capacidad oxidativa de los granulocitos, tanto en el paciente como en sus hermanos y padres. La función oxidativa de los neutrófilos de los 3 hermanos era nula, por lo que quedaba establecido el diagnóstico de CGD en todos ellos (Figura IV.90). Con estos datos, además de diagnosticar a los 3 hermanos con CGD, descartábamos a los hermanos del paciente como donantes para el trasplante, ya que fuera cual fuera la mutación responsable, todos ellos la compartían. El resultado de esta prueba en los padres era equivalente a los individuos control, sin mostrar ningún rasgo de bimodalidad.

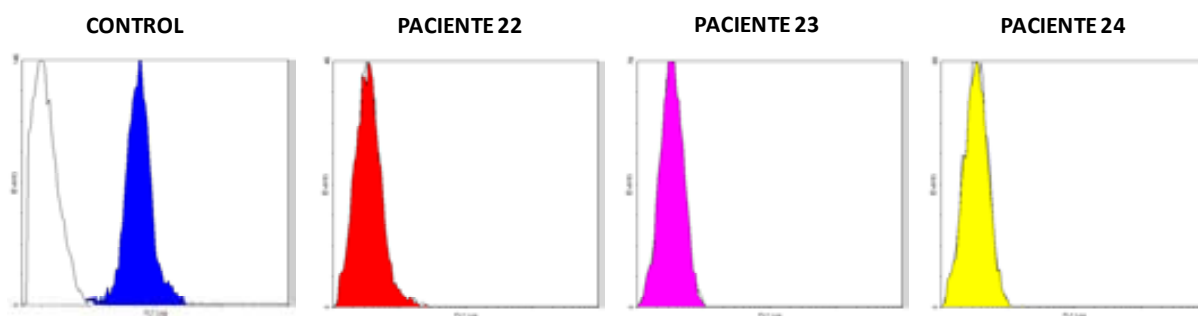


Figura IV.90. Cuantificación de la actividad oxidativa de los granulocitos por citometría de flujo mediante la oxidación de la DHR. Ni el paciente ni ninguno de sus dos hermanos presentaban actividad oxidativa en sus granulocitos.

6.3.4.- Análisis del gen *NCF1*

Una vez establecido el diagnóstico de CGD empezamos el análisis de los genes implicados. Al ser nula la capacidad oxidativa en los 3 hermanos, la madre se postulaba como portadora obligada de la alteración genética. Si se hubiese tratado de una forma ligada al X, la prueba funcional hubiese tenido un resultado bimodal en la madre de los pacientes. Sin embargo, la actividad era normal y por ello sospechamos de una forma autosómica recesiva. El análisis de la capacidad oxidativa realizado en un hospital cercano al de procedencia de los pacientes, indicaba además que ambos padres parecían tener una actividad ligeramente disminuida respecto a los controles, por lo que pensamos en que podía estar afectado el gen *NCF1*. Este gen tiene un pseudogen (*ψNCF1*) que no da lugar a proteína nativa y cuya homología es muy elevada. Por este motivo es frecuente la recombinación homóloga entre ellos. Este fenómeno causa la delección del dinucleótido GT del tándem GTGT de las 4 primeras bases del exón 2 comportando la anulación del alelo *NCF1*. La presencia de una copia de *NCF1* recombinada con

$\psi NCF1$ es relativamente frecuente en la población, por ello esta AR-CGD se da aún en ausencia de consanguinidad. Para el estudio de esta anomalía amplificamos la región dónde tiene lugar la recombinación anómala, que incluye tanto a *NCF1* como a $\psi NCF1$ (Figura IV.91).

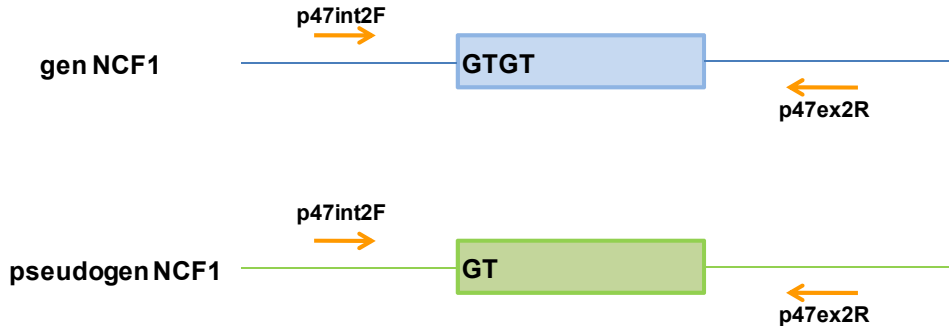


Figura IV.91. Esquema del gen *NCF1*, en azul, y su pseudogen $\psi NCF1$, en verde. Las flechas indicaban la posición y dirección de los *primers* de amplificación utilizados.

Esta recombinación anómala puede ser detectada mediante una digestión con la enzima de restricción *SspBI*. Esta enzima corta el gen pero no el pseudogen, ya que su diana es TGTACA y sólo está presente en el gen. De manera que en un individuo control, las dos copias del gen se digieren mientras que las dos del pseudogen no, teniendo así la mitad del producto de amplificación digerido (*NCF1*) y la otra mitad sin digerir ($\psi NCF1$). En los individuos homocigotos para la recombinación homóloga habrá 4 copias del pseudogen, que no se digieren ($\psi NCF1$). En los individuos portadores de la alteración en heterocigosis, una cuarta parte del producto se digiere (*NCF1*), mientras que las otras tres cuartas partes no ($\psi NCF1$). El producto de amplificación tenía un peso molecular de 218bp en el caso del gen (*NCF1*) y 216bp en el del pseudogen ($\psi NCF1$), que eran indistinguibles por electroforesis convencional. El gen al ser digerido por *SspBI* daba lugar a un producto de 138bp y otro de 80bp. De esta manera, en un individuo control hallabamos bandas de 216bp, 138bp y 80bp, mientras que en un paciente sólo estaba la de 216bp. En un portador, la suma de las intensidades de las bandas pequeñas era inferior a la de la banda superior, mientras que en el control era equivalente.

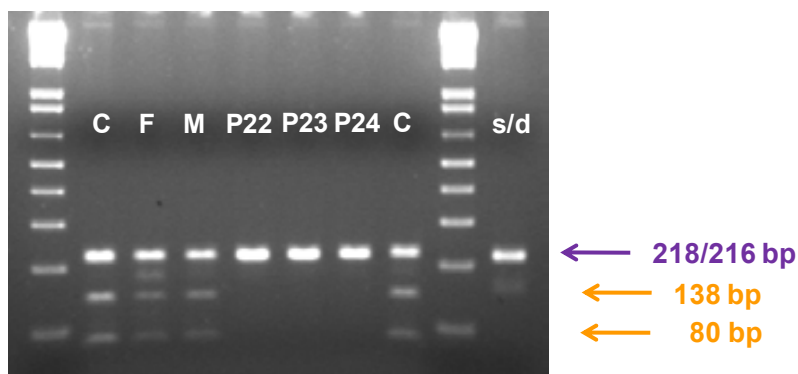


Figura IV.92. Análisis del patrón de restricción de la enzima *SspBI* en toda la familia. Tanto el caso índice (P22) como sus dos hermanos (P23 y P24) sólo poseían el pseudogen. El padre (F) y la madre (M) eran portadores de la alteración. El producto sin digerir (s/d) tenía 218bp en el caso del gen y 216bp en el pseudogen.

Los dos hermanos del paciente tenían una actividad oxidativa de los granulocitos nula a pesar de no haber presentado ninguna sintomatología clínica. Por ello decidimos analizar el gen *NCF1* de toda la familia. Tras la digestión de los productos de amplificación en el paciente y en su familia, observamos que los 3 niños tenían la recombinación anómala de *NCF1* en homocigosis y que los padres eran portadores de la misma (Figura IV.92). Esta alteración fue descrita por primera vez por Casimir en 1991 (Casimir, 1991).

A continuación comprobamos este hallazgo por secuenciación del producto amplificado. Puesto que se amplificaba tanto el gen (*NCF1*) como el pseudogen (ψ *NCF1*), en un individuo control observábamos una superposición de picos a partir de las 2 primeras bases del exón 2 correspondientes a ambos elementos génicos (Figura IV.93). Sin embargo, y tal como observábamos en nuestros pacientes, en aquellos individuos que tenían las dos copias del gen *NCF1* recombinadas anómalamente, sólo se observaba el dinucleótido GT, correspondiente al pseudogen (Figura IV.93). Los padres eran portadores obligados de la alteración y en la secuencia se podía ver que la intensidad relativa de los picos que representaban los nucleótidos era diferente a la de los individuos control, de manera que las bases del pseudogen tenían una intensidad superior a la establecida en los controles (Figura IV.93).

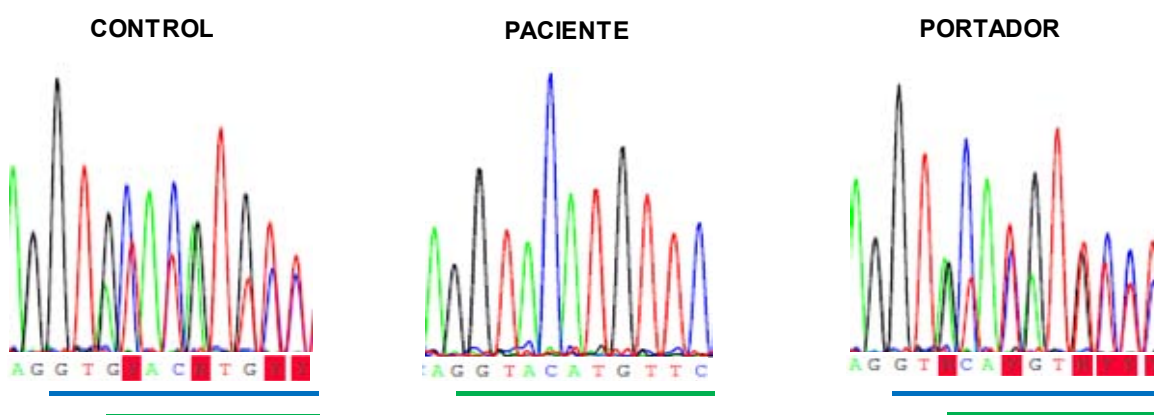


Figura IV.93. Secuencia del exón 2 de *NCF1* y ψ *NCF1*. En el paciente sólo se amplificaba el pseudogen (verde), mientras que en la madre había tres copias del pseudogen (verde) y una del gen (azul).

6.3.5.- Western blot para p47^{phox}

Esta recombinación provoca la pérdida de la pauta de lectura de la proteína y la aparición de un codón STOP. Por ese motivo quisimos corroborar la ausencia de la proteína en el paciente mediante un análisis de *western blot*. Los extractos celulares procedían de leucocitos totales. En el paciente no se observaba ni la forma nativa de la proteína p47^{phox} ni ninguna otra (Figura IV.94). La detección de la β -actina en la misma membrana, indicaba un procesamiento correcto del extracto celular (Figura IV.94).

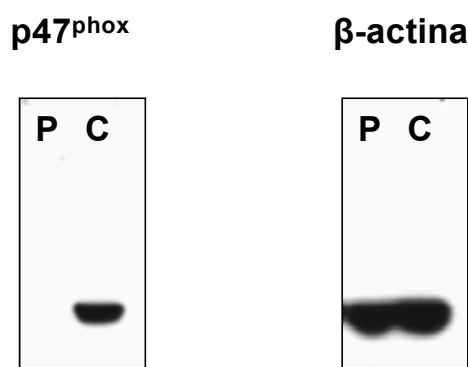


Figura IV.94. Expresión de p47^{phox} y β -actina mediante *western blot* en leucocitos. Los extractos celulares del paciente no contenían p47^{phox}.

6.4.- AR-CGD: Caso clínico 25

6.4.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de una mujer de origen caucásico nacida en el año 2006 que en el primer mes de vida sufrió una bronconeumonía bilateral causada por *Klebsiella*. Padecía anemia y no ganaba peso adecuadamente. A los 3 meses tuvo abscesos producidos por *Serratia*. Es entonces cuando se sospechó de Enfermedad Granulomatosa Crónica y se realizó la determinación de la capacidad oxidativa de sus granulocitos.

Se trata de la segunda hija de padres no consanguíneos. La hermana mayor no ha referido ninguna patología destacable.

En las AR-CGD no es tan evidente la necesidad de un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) ya que son menos agresivas que las X-CGD. Sin embargo, en este caso, la clínica de la paciente indicaba infecciones severas a edades muy tempranas por lo que se decidió someterla a un TPH ese mismo año. En estos momentos está a la espera de un donante no relacionado porque carece de familiares HLA compatibles.

6.4.2.- Datos inmunológicos

Cuando recibimos la primera muestra de la paciente ésta tenía 3 meses de edad. En primer lugar, analizamos los niveles de inmunoglobulinas, así como las poblaciones linfocitarias. Las inmunoglobulinas tenían niveles dentro de los rangos de normalidad, a excepción de la IgE que estaba un poco incrementada (Tabla IV.17).

	P25	Valores de referencia (0-1 año)
IgG	1060	200-1000 mg/dL
IgA	71	16-85 mg/dL
IgM	133	25-149 mg/dL
IgE	27	0,1-15 UI/mL

Tabla IV.17. Los niveles de inmunoglobulinas estaban en rangos de normalidad.

Las poblaciones linfocitarias tampoco mostraban ninguna alteración: 58% de linfocitos T con 43% de CD4+ y 14% de CD8+, 35% de linfocitos B y 4% células NK, con una cifra total de $7.300 \cdot 10^6$ linfocitos/L (v.n.: $4.000-13.500 \cdot 10^6/L$).

6.4.3.- Determinación de la capacidad oxidativa de los granulocitos

El diagnóstico de Enfermedad Granulomatosa Crónica se realizó analizando la función metabólica y la capacidad bactericida de las células mieloides de la paciente mediante el kit comercial *BURSTTEST*[®] descrito anteriormente. La capacidad oxidativa de los neutrófilos de la paciente fue nula en respuesta tanto a *Escherichia coli* opsonizadas como a PMA. Sin embargo, tanto los neutrófilos del padre como los de la madre se estimulaban correctamente y manera equivalente a la de los individuos control con ambos estímulos (Figura IV.95). A partir de este resultado se estableció el diagnóstico de CGD en la paciente.

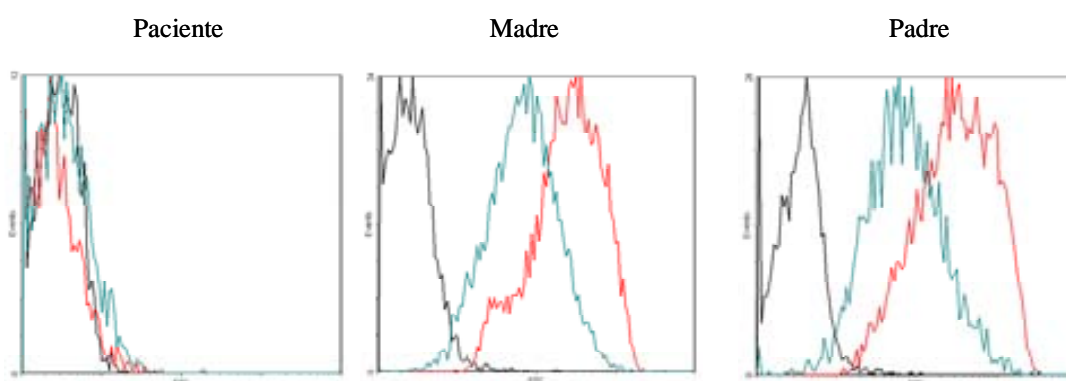


Figura IV.95. Cuantificación de la actividad oxidativa en los granulocitos mediante el *BURSTTEST*[®] (en negro se expresaba el control negativo, en verde la estimulación con *E.coli* y en rojo con PMA). La paciente no respondía a ninguno de los estímulos, mientras que ambos padres lo hacían normalmente.

6.4.4.- Análisis del mRNA de p67^{phox}

Puesto que la paciente era una niña, descartamos la forma ligada al X de esta enfermedad y empezamos a estudiar las formas autosómicas recesivas.

Como se ha dicho anteriormente, la AR-CGD más frecuente es la deficiencia en p47^{phox}. La gran mayoría de los casos están causados por una recombinación anómala entre el gen *NCF1* y su pseudogen (*ψNCF1*) a nivel del exón 2. Por lo tanto, lo primero que hicimos fue estudiar el exón 2 del gen *NCF1* de la paciente. No encontramos dicha alteración ni en homocigosis ni en heterocigosis. Puesto que casi todos los pacientes descritos con deficiencia en p47^{phox} son homocigotos o heterocigotos compuestos para esta alteración pasamos a estudiar los otros genes responsables de AR-CGD.

Siguiendo el orden de prevalencia de las AR-CGD, analizamos el cDNA de p22^{phox}. En la paciente no existían ni alteraciones de *splicing* ni mutaciones en la secuencia codificante.

Por último, pasamos a estudiar el cDNA de p67^{phox}. El gen *NCF2* que codifica p67^{phox} da lugar a un mRNA de 2.203 bp. Partimos de RNA extraído de leucocitos totales y para facilitar su estudio lo dividimos en tres fragmentos. La paciente presentaba alteraciones de *splicing* en el primero de ellos, que comprendía del exón 2 al 7, y también en el segundo, que iba del exón 6 al 13 (Figura IV.96). El tercer fragmento, del exón 13 al 16, tenía un peso molecular correcto. Al ampliar el estudio a sus progenitores, observamos que el padre contenía la alteración en el primer fragmento pero no el segundo, mientras que la madre presentaba la alteración del

segundo fragmento pero no la del primero (Figura IV.96). Las alteraciones en el primer y segundo fragmento del cDNA de p67^{phox} eran de diferente índole. Del exón 2 al 7 existía una banda del tamaño adecuado y otras dos de menor peso molecular. Sin embargo, del exón 6 al 12, acompañando a la banda de tamaño correcto había dos más pero de peso molecular superior. Todos estos datos indicaban que la paciente tenía 2 alteraciones independientes en los 2 alelos de *NCF2*.

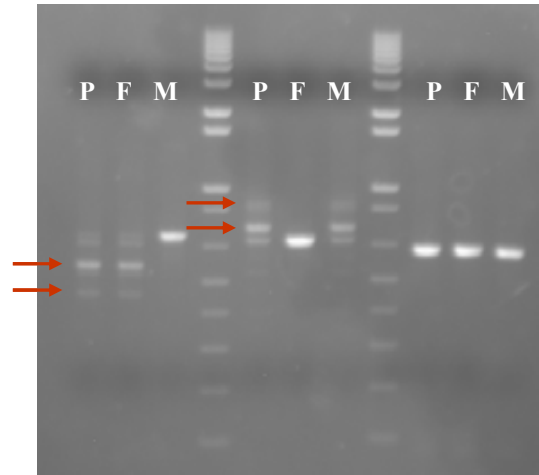


Figura IV.96. Expresión del cDNA de p67^{phox}. Se observaban alteraciones de *splicing* en la paciente (P), su padre (F) y su madre (M).

Como primera aproximación para intentar descifrar que estaba ocurriendo, secuenciamos directamente los productos obtenidos en la RT-PCR. Al analizar el primer fragmento de la paciente se podía ver que a partir del exón 4 había una múltiple superposición de picos que parecía incluir, como mínimo, los exones 5 y 6 (Figura IV.97).

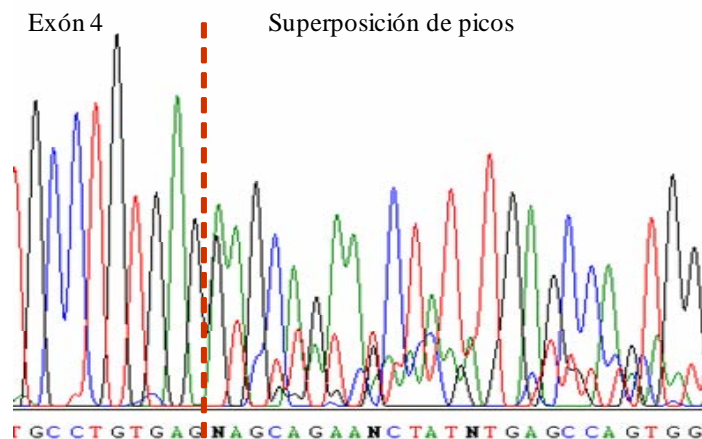


Figura IV.97. Secuenciación del producto de la RT-PCR del primer fragmento en la paciente. Se observaba una superposición de picos a partir del exón 4.

Para determinar cuál era la secuencia de cada uno de los productos amplificados, decidimos subclonarlos para poder secuenciarlos por separado. Para ello utilizamos el sistema de clonaje basado en el vector pCR2.1 (*Invitrogen*). El subclonaje del primer fragmento nos permitió analizar las 3 formas de *splicing* observadas previamente. La de mayor peso molecular

correspondía a la secuencia nativa, donde se observaba la transición entre los exones 4-5-6-7. La de peso intermedio carecía del exón 5 (transición exones 4-6) y la de menor peso molecular no tenía ni el exón 5 ni el 6 (transición exones 4-7) (Figura IV.98), lo que indicaba al menos 3 formas de *splicing*, dos de ellas anómalas.

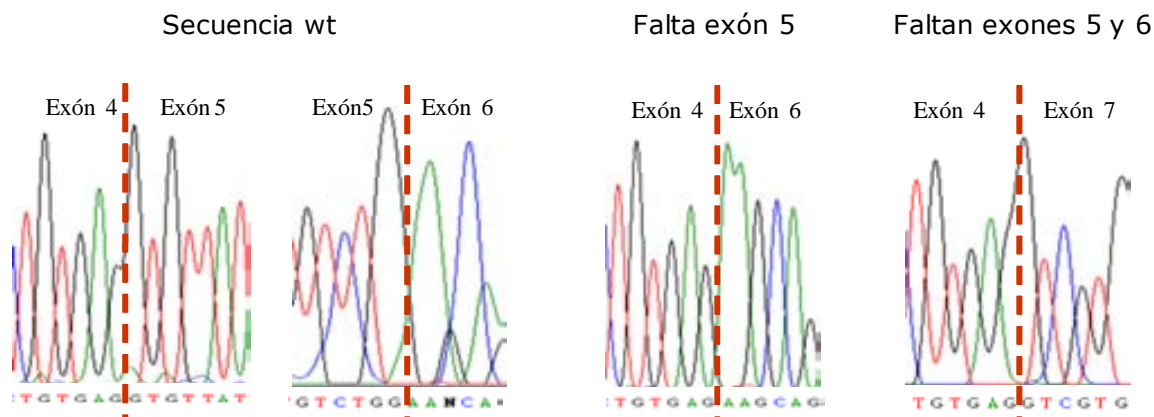


Figura IV.98. Análisis de los 3 tipos de producto obtenidos en el subclonaje del primer fragmento de la RT-PCR del cDNA de p67^{phox}. Uno de ellos era correcto mientras que a otro le faltaba el exón 5 y al tercero los exones 5 y 6.

El análisis de la secuencia del conjunto de todos los productos obtenidos en la amplificación del segundo fragmento no resultó aclaratorio, y por ello, también decidimos subclonarlos. En el subclonaje del segundo fragmento no pudimos analizar el producto de mayor peso molecular pues era muy minoritario y no conseguimos ninguna colonia que lo contuviera. Tal y como esperábamos, el producto de menor peso molecular, que es el que se correspondía con el de los controles (Figura IV.96), contenía la secuencia nativa. En el de peso intermedio se observaba una secuencia curiosa, ya que del exón 8 pasábamos al 10 pero de este al 9 para luego continuar con el 10 (exones 8-10-9-10) (Figura IV.99).

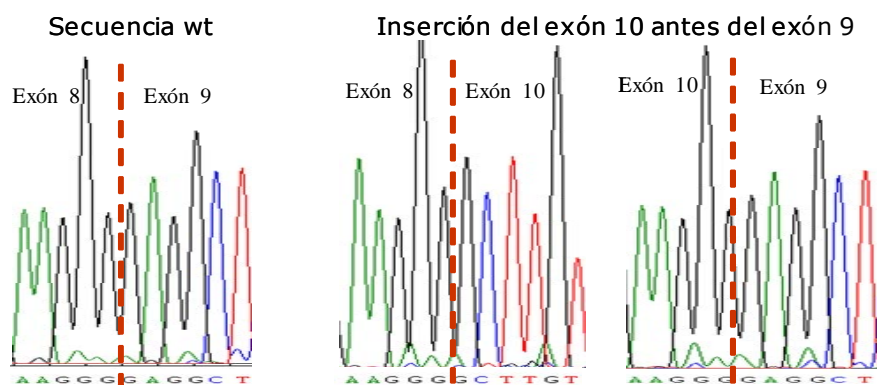


Figura IV.99. Análisis de los 2 tipos de producto obtenidos en el subclonaje del segundo fragmento de la RT-PCR del cDNA de p67^{phox}. Existía uno con la secuencia nativa y otro con la inserción del exón 10 duplicado delante del 9.

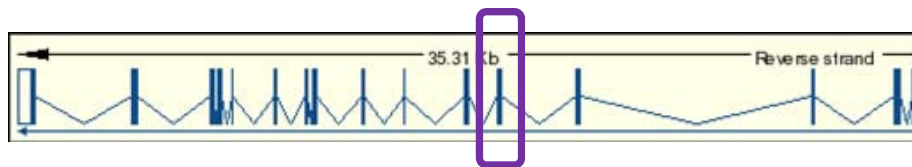
En ese momento pensamos que la banda de mayor peso molecular que no habíamos podido analizar podría corresponder a la secuencia de los exones 8-9-10-9-10, lo que se explicaría por una duplicación génica de *NCF2* que incluyera los exones 9 y 10.

6.4.5.- Análisis del gen *NCF2*

Ante las alteraciones observadas en el *splicing* del gen *NCF2* en la paciente, decidimos analizar la secuencia genómica de dicho gen para encontrar las mutaciones responsables.

En el primer fragmento, que incluía los exones 2 al 7, había *exon skipping* del 5 y 6. Por ello secuenciamos las regiones dadoras y aceptoras de *splicing* de estos exones, sin encontrar ninguna alteración. A continuación, analizamos las del exón 4 así como una región más amplia del intrón 4 que comprende nucleótidos que también están implicados en el proceso de *splicing*, y tampoco hallamos ninguna mutación. Sin embargo, en el exón 5 había una mutación *nonsense* en heterocigosis: la Adenina de la posición 481 estaba sustituida por una Timina (c.A481T) comportando el cambio de la Lisina 161 por un codón STOP (p.Lys161STOP) (Figura IV.100). Esta mutación no ha sido reportada previamente, sin embargo sí que está descrito que codones STOP prematuros (PTC) generan *splicing* alternativos que esquivan el exón con la alteración, lo que podría explicar el fenómeno observado en la paciente. El padre y la hermana también eran portadores de la mutación p.Lys161STOP, lo que se correlacionaba con lo observado en la RT-PCR (Figura IV.96).

a)



b)

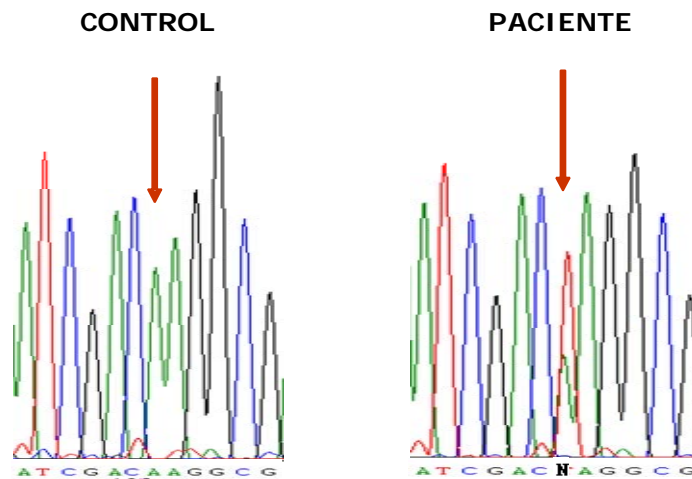
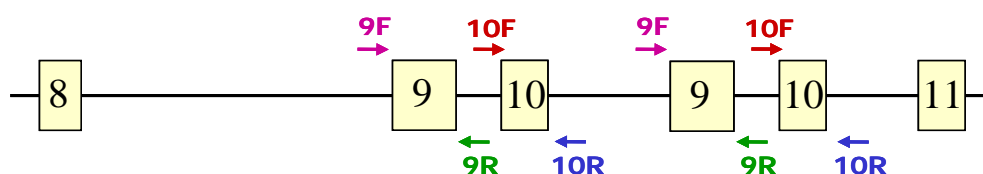


Figura IV.100. Esquema del gen *NCF2* (a). Secuencia del exón 5 de *NCF2*. En la paciente había una sustitución de una A por una T (c.A481T) en heterocigosis (b).

El análisis del fragmento entre los exones 6 y 13 resultó menos contradictorio. Al sospechar de una duplicación génica, buscamos en la bibliografía casos similares. Borgato y colaboradores describieron una paciente de origen italiano que tenía una duplicación en homocigosis de 1,1 Kb que incluía los exones 9 y 10 del gen *NCF2* y que era responsable de CGD ya que la paciente carecía de proteína p67^{phox} nativa (Borgato, 2001). Ante la posibilidad de que se tratara de la misma alteración, diseñamos *primers* flanqueantes a los exones 9 y 10 y realizamos amplificaciones con diferentes combinaciones de estos *primers*. Cuando

amplificábamos con los *primers* 9F y 10R en la paciente aparecían dos bandas. La de menor peso molecular, que también se hallaba en los individuos control, correspondía a la secuencia nativa. La banda de mayor peso contenía el fragmento duplicado. Es decir, que entre el *primer* 9F y 10R se amplificaba el exón 9 y el 10, pero también el 9 y el 10 duplicados, incluyendo parte de las regiones intrónicas. Lo mismo sucedía con la amplificación 10F-10R. Por último, realizamos una PCR que no puede dar lugar a ningún producto en los individuos control, pero que sí tenía que darlo en la paciente si realmente existía esta duplicación. Se trataba de amplificar con los *primers* 9R y 10F. Confirmando nuestras sospechas, veíamos un producto de amplificación sólo en la paciente que incluía el exón 10 y el 9 que estaba duplicado (Figura IV.101). Al secuenciar este producto de amplificación identificamos el punto donde empezaba la duplicación que coincidía con el descrito en la paciente italiana. Según estos autores, esta duplicación se encontraba entre 2 elementos parcialmente homólogos a secuencias Alu, uno delante del exón 9 y otro detrás del exón 10, lo que justificaría este fenómeno.

a)



b)

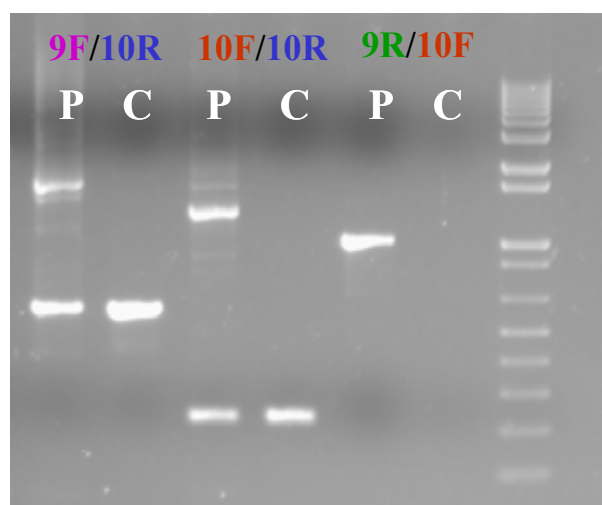


Figura IV.101. Esquema de la unión de los *primers* diseñados para *NCF2* con la duplicación (a). Amplificaciones entre los *primers* flanqueantes a los exones 9 y 10. En la paciente aparecían productos de mayor tamaño que se correspondían con el alelo que contenía la duplicación (b).

En la madre de la paciente se observaban los mismos productos de amplificación encontrados en su hija, lo que concordaba con el resultado de la RT-PCR. La hermana no era portadora de esta alteración.

6.4.6.- Western blot para p67^{phox}

A partir de los estudios genéticos sabíamos que la paciente tenía mutados los dos alelos del gen *NCF2*. Lo que no sabíamos es como afectaban estas alteraciones en la expresión de la proteína. Para ello, realizamos estudios de *western blot* a partir de extractos celulares de

neutrófilos con un anticuerpo policlonal de conejo contra p67^{phox}. En los individuos control este anticuerpo policlonal reconocía tanto p67^{phox} (67 KDa) como p40^{phox} (40 KDa) (Figura IV.102). En la paciente, sin embargo, sólo se observaba una banda de unos 60 KDa, que podría corresponder a una forma trucada de p67^{phox} carente de los aminoácidos correspondientes a algunos de sus exones (Figura IV.102).



Figura IV.102. Expresión de p67^{phox} y p40^{phox} mediante *western blot* en neutrófilos. En la paciente había una única banda de un tamaño inferior al esperado.

En el artículo en el que se describía la duplicación génica de los exones 9 y 10 en homocigosis, los autores afirmaban la ausencia total de p67^{phox}. Por este motivo, pensamos que la proteína de 60 KDa observada en la paciente debía corresponder a la expresión del alelo paterno. La forma mayoritaria de mRNA paterno era la carente del exón 5, cuya falta permite la conservación de la pauta de lectura. El cálculo aproximado del peso molecular de la proteína sin dicho exón era de unos 60 KDa. Todos estos datos hacían sospechar que la paciente expresaba una proteína p67^{phox} mutada carente de los residuos correspondientes al exón 5 y que no era capaz de unirse a p40^{phox}, ya que ésta no era detectada en el *western blot*, a diferencia de lo que sucedía en los controles.

Es decir, que la paciente era un heterocigoto compuesto para 2 mutaciones en el gen *NCF2* (p.Lys161STOP y la duplicación génica de los exones 9 y 10) ninguna de las cuales generaba proteína nativa.

6.4.7.- Estudio de individuos portadores

El análisis de individuos portadores en esta familia no era tan importante como en las descritas anteriormente, ya que al ser una enfermedad autosómica recesiva y no haber consanguinidad era bastante difícil que se volvieran a unir dos individuos heterocigotos para mutaciones en el gen *NCF2*. Lo que si nos pareció relevante era conocer la procedencia de cada una de las alteraciones y por ello decidimos estudiar a los abuelos. Los abuelos paternos habían fallecido, por lo que sólo pudimos estudiar los maternos (Figura IV.103).

El estudio de los abuelos maternos se realizó mediante las PCRs diseñadas entre los exones 9 y 10 y mostró que era la abuela la portadora de la duplicación génica.

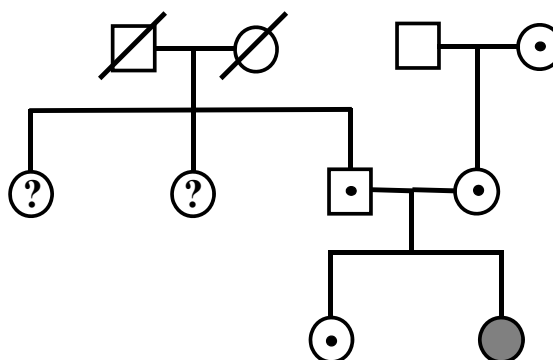


Figura IV.103. Árbol genealógico del caso clínico 25. La madre y la abuela materna eran portadoras de la duplicación génica, mientras que el padre y la hermana de la mutación p.Lys161STOP.

6.5.- AR-CGD: Casos clínicos 26 y 27

6.5.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de dos hermanos, un varón y una mujer, nacidos en el año 1990 (P26) y 1992 (P27), respectivamente. La mujer había sufrido neumonías recurrentes, la primera de ellas a los 20 días de edad. A los 4 años padeció una aspergilosis pulmonar y posteriormente una fibrosis pulmonar no filiada. También a los 4 años presentó una sepsis por *Salmonella sp*, que se repitió a los 8 y a los 11 años de edad. A raíz de esta segunda sepsis junto con la presencia de hepatitis granulomatosa, se decidió evaluar la capacidad oxidativa de sus granulocitos y fue diagnosticada de Enfermedad Granulomatosa Crónica. El varón debutó con una adenitis abcesificada a los 6 años edad que llevó a su diagnóstico de CGD. Se trata de los dos únicos hijos de una pareja de padres consanguíneos.

A pesar de que ambos pacientes fueron diagnosticados de CGD en el año 1998, no se decidió determinar la causa genética de la misma hasta el 2007, que fue cuando fueron derivados a nuestro hospital.

En la actualidad ambos presentan granulomas pulmonares y la mujer está pendiente de un trasplante pulmonar debido a una insuficiencia respiratoria que requiere administración de oxígeno. El varón presenta un acné muy marcado que requiere tratamiento agresivo.

6.5.2.- Determinación de la capacidad oxidativa de los granulocitos

A pesar de que ambos pacientes estaban ya diagnosticados de CGD, lo primero que hicimos fue repetir la prueba para determinar la capacidad oxidativa de los granulocitos en ambos pacientes pero también en sus progenitores.

Utilizamos la técnica de la oxidación de la Dihidrorodamina 123 (DHR) anteriormente descrita, en la que se realiza una estimulación con ésteres de forbol (PMA). La capacidad oxidativa de los neutrófilos de ambos pacientes fue nula. En la madre y en el padre la estimulación era correcta y totalmente equivalente a la de los individuos control (Figura IV.104).

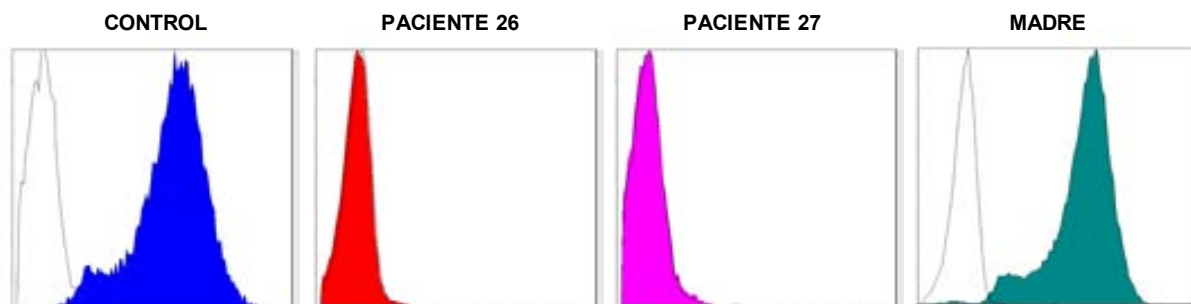


Figura IV.104. Cuantificación de la actividad oxidativa en los granulocitos por citometría de flujo tras la estimulación con PMA mediante la oxidación de la DHR. Ninguno de los dos pacientes respondía al estímulo.

6.5.3.- Análisis del mRNA de p67^{phox}

Al igual que en el caso anterior, descartamos la forma ligada al X de esta enfermedad, puesto que uno de los afectados era una mujer. Seguimos el mismo patrón de actuación y vimos que no tenían ninguna alteración ni en el gen *NCF1*, que codifica la proteína p47^{phox}, ni en el gen *CYBA*, que codifica la proteína p22^{phox}.

Así pues, el último paso fue analizar el gen *NCF2*, que codifica la proteína p67^{phox}, y empezamos por el estudio a nivel de cDNA, partiendo también de RNA extraído de leucocitos totales. No encontramos ninguna alteración de *splicing* en ninguno de los 3 fragmentos en los que dividimos el cDNA para su estudio. Sin embargo, al secuenciarlos vimos que ambos pacientes presentaban una sustitución en homocigosis en el exón 3: la Citosina de la posición 229 estaba sustituida por una Timina (c.C229T) (Figura IV.105). Este cambio transforma la Arginina 77 en un codón STOP (p.Arg77STOP). Esta mutación, no descrita en la literatura, da lugar a una proteína truncada incapaz de realizar sus funciones.

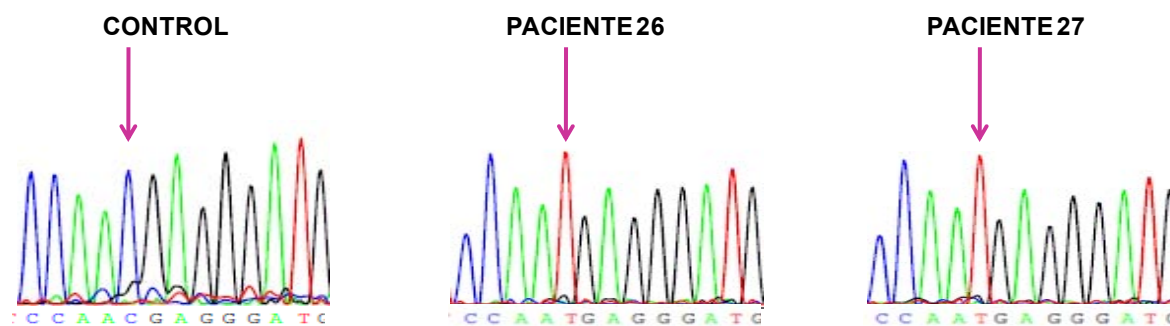


Figura IV.105. Secuencia del cDNA de *NCF2*. Los pacientes mostraban una sustitución de una C por una G (c.C229G) en homocigosis.

6.5.4.- Análisis del gen *NCF2*

Para confirmar la presencia de la mutación p.Arg77STOP en ambos pacientes, así como para determinar si los padres eran portadores de dicha alteración, analizamos el exón 3 de *NCF2* a nivel genómico. Los pacientes presentaban la mutación p.Arg77STOP en homocigosis y los padres en heterocigosis (Figura IV.106)

En la actualidad estamos a la espera de recibir muestras de toda la familia para completar el estudio de individuos portadores de la enfermedad.

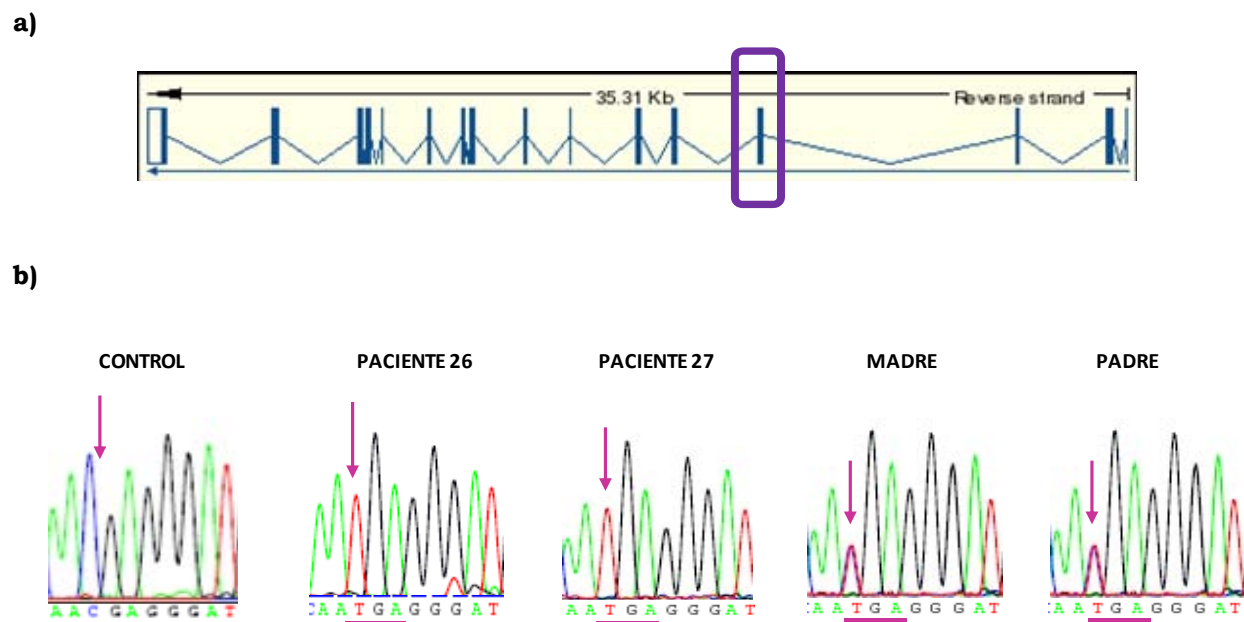


Figura IV.106. Esquema del gen *NCF2* (a) Secuencia del exón 3 de *NCF2*. Ambos pacientes tenían la mutación c.C229G en homocigosis, mientras que los padres en heterocigosis.

7.- Incontinencia Pigmenti

La Incontinencia Pigmenti (IP; MIM: 308300) es una genodermatosis que segrega con una herencia dominante ligada al X y que provoca mortalidad prenatal en los varones, por lo que sólo aparecen afectadas las mujeres. Está causada por mutaciones en el gen *IKK-gamma*, también denominado *NEMO* (modulador esencial de NF- κ B). En el año 2000 se describió un paciente con Displasia Ectodérmica Anhidrótica con Inmunodeficiencia (EDA-ID) procedente de una familia afectada por IP (Smahi, 2000). Este paciente con EDA-ID tenía mutaciones en NEMO que no suprimían totalmente su control sobre NF- κ B. Las mutaciones hipomórficas en NEMO dan lugar a dos síndromes diferentes: las mutaciones *missense*, con cambio de aminoácido, son responsables de EDA-ID (MIM: 300291) y las mutaciones *nonsense*, con aparición de un codón STOP, causan una clínica más severa con osteopetrosis y linfedema (EDA-ID-OL; MIM: 300301).

7.1.- IP: Caso clínico 28

7.1.1.- Descripción del caso clínico

Presentamos el caso de una niña de origen caucásico nacida en el año 2004 que pocos días después del nacimiento presentó vesículas inflamatorias a lo largo de piernas y caderas. Durante los primeros meses de vida la paciente desarrolló lesiones dérmicas de tipo vesicular y verrugas en otras zonas de la piel y cuero cabelludo. Estas lesiones junto con la dentición en forma cónica de la madre hicieron sospechar que ambas padecían Incontinencia Pigmenti (IP) (Figura IV.107).



Figura IV.107. Fotografías donde se observan las lesiones dérmicas de tipo vesicular de la paciente y la dentición en forma cónica de su madre.

Además, la paciente fue diagnosticada de una retinopatía de origen hemorrágico en el ojo derecho. Después del tratamiento el problema se resolvió sin mayores complicaciones. En las posteriores revisiones pediátricas sólo se destacaba el carácter ralo de su pelo.

Se trata de la tercera hija de padres no consanguíneos. Ni sus 2 hermanos ni ninguno de los 4 hermanos de su madre (tíos maternos) habían referido sintomatología alguna (Figura IV.108)

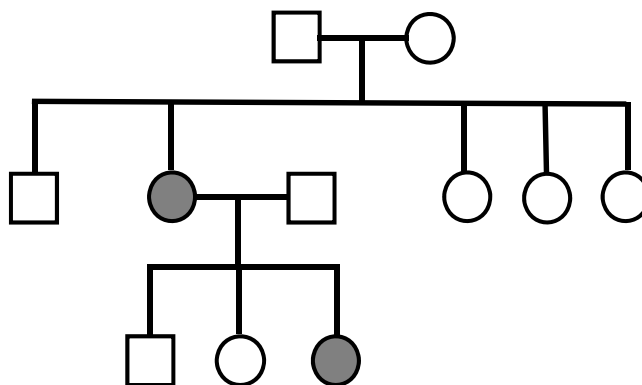


Figura IV.108. Árbol genealógico del caso clínico 28. Su madre también padecía la enfermedad.

7.1.2.- Análisis del gen *NEMO*

La IP está causada por alteraciones en el gen *NEMO*. En un 85% de los casos se trata de un reordenamiento intragénico entre el intrón 3 y el extremo 3'UTR que provoca la delección de los exones 4 al 10 y que se genera por un mal alineamiento intracromosómico durante la meiosis paterna (Figura IV.109)

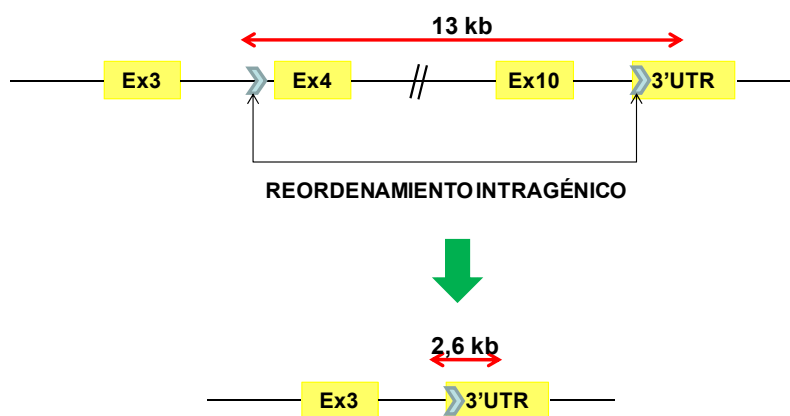


Figura IV.109. Esquema del reordenamiento intragénico del gen *NEMO*.

El estudio mediante RT-PCR era muy complicado ya que la delección afecta al extremo 3'UTR del transcrito. La amplificación exón por exón tampoco era resolutoria porque las mujeres tienen 2 copias del gen, una de las cuales es correcta, con lo que el alelo delecionado pasa desapercibido. Por ello, Smahi diseñó una PCR específica entre el exón 3 y el extremo 3'UTR que permitiera identificar la delección mediante la detección de una banda de unas 2 Kb (Smahi, 2000). Dos años después, Bardaro describió 2 casos en los que esta PCR había fallado en el diagnóstico y propone cambiar el *primer forward*, de manera que se una al intrón 2 en vez de al exón 3, generando una banda de mayor tamaño (2,6 Kb). Lo que sucedía era que si el pseudogen de *NEMO* sufría la misma recombinación intragénica podía ser detectado por la PCR de Smahi y ser confundido con el gen *NEMO* que no estaría delecionado (Bardaro, 2003).

Puesto que la delección que afecta a los exones 4 al 10 es la alteración más frecuente en IP, realizamos la PCR con los *primers* descritos por Bardaro. Tanto la paciente como la madre presentaban la banda de 2,6 Kb que indica la presencia de dicha delección (Figura IV.110). Mediante esta técnica quedaba confirmado el diagnóstico de IP en ambas pacientes y la causa

Resultados

genética del mismo. No hemos podido analizar la presencia de la alteración en la abuela materna por carecer de muestra, aunque consideramos que sería muy interesante.

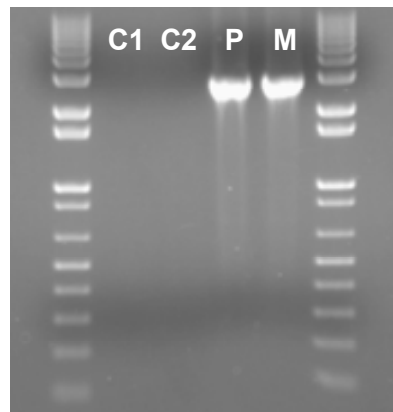


Figura IV.110. PCR descrita por Bardaro que permite identificar la delección del exón 4 al 10. Tanto en la paciente (P) como en su madre (M) hay amplificación, lo que demuestra la presencia del reordenamiento intragénico.

V. Discusión

1.- Inmunodeficiencias Primarias

Las Inmunodeficiencias Primarias (IDPs) son un grupo de enfermedades causadas por defectos congénitos del sistema inmune. Están descritas más de 200 entidades diferentes cuya característica común es la susceptibilidad incrementada a uno o varios tipos de infecciones. Todas ellas se encuadran entre las Enfermedades Raras dada su baja frecuencia. Su prevalencia conjunta (de todas las Inmunodeficiencias Primarias, con la salvedad del Déficit de IgA) estaría alrededor de 1 entre 10.000 nacimientos.

Desde que en los años 50 se describiera la primera IDP, la conocida como Enfermedad de Bruton o Agammaglobulinemia ligada al X (XLA), se han realizado muchos avances tanto científicos como tecnológicos que han permitido el estudio y caracterización de este amplísimo grupo de patologías. De hecho, actualmente nos encontramos en una era de crecimiento exponencial de nuestro conocimiento sobre las bases moleculares y genéticas de los defectos del sistema inmune. La capacidad para redefinir las enfermedades genéticas en términos moleculares ha hecho posible mejoras en el diagnóstico, en el reconocimiento del espectro de manifestaciones clínicas que pueden darse en un determinado gen afectado, en el consejo genético y en las nuevas estrategias terapéuticas, incluida la terapia génica y la selección de embriones sanos, que en algunos casos se pueden utilizar con fines terapéuticos (niños medicamento). Es previsible pensar que a medida que se vayan sofisticando las herramientas diagnósticas encontraremos Inmunodeficiencias Primarias vinculadas a la mayoría de los genes implicados de manera relevante y no redundante en las respuestas inmunológicas.

Históricamente, las IDPs se han definido y clasificado según la alteración inmunológica responsable. En la última clasificación, del año 2009 (Notarangelo, 2009), las IDPs se agrupan en 8 grandes tipos de patologías, y dentro de cada uno de estos grupos podemos encontrar diferentes tipos de herencia genética. Aunque la mayoría de Inmunodeficiencias Primarias presenta una herencia mendeliana clásica, hay varias IDPs, entre ellas algunas de las más frecuentes, como la Inmunodeficiencia Común Variable (CVID), que obedecen a una herencia poligénica. Entre las que presentan una herencia mendeliana tenemos tanto enfermedades ligadas al X (como las que se analizaron preferentemente en la presente Tesis) como autosómicas, y aunque dentro de éstas predominan las que tienen una herencia recesiva, también hay numerosas IDPs que presentan una herencia de tipo dominante. Incluso aparece una patología, el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (ALPS), en la que se encuentran mutaciones somáticas. De hecho, es la primera enfermedad no neoplásica en la que aparecen este tipo de mutaciones.

En la presente Tesis se estudiaron pacientes con sospecha diagnóstica de IDP, pertenecientes a los diversos grupos de la clasificación actual, mayoritariamente varones, y por tanto, de probable herencia ligada al sexo. En estos casos, al tratarse, en general, de las patologías más frecuentes en cada uno de los grupos de la clasificación, el primer diagnóstico diferencial se establece con las enfermedades ligadas al X. En base a la historia clínica reportada y a un estudio inmunológico básico (fundamentalmente análisis de poblaciones linfocitarias y niveles de inmunoglobulinas en suero), establecimos una sospecha diagnóstica más orientada y realizamos pruebas inmunológicas complementarias, así como determinaciones moleculares y genéticas que permitieron el diagnóstico definitivo. Además, en todos aquellos casos en los que

fue posible, se estudió a los familiares con el objetivo de identificar portadores (en la mayoría de los casos portadoras, ya que se trata de enfermedades ligadas al sexo) de las diferentes patologías. Finalmente, en aquellos pacientes en los que estaba indicado y a los que se les realizó un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) se ha seguido su evolución y el estado de recuperación de su sistema inmune hasta el momento de la redacción de la presente Tesis.

2.- Inmunodeficiencias Severas Combinadas

Las Inmunodeficiencias Severas Combinadas (SCID) son un grupo de enfermedades caracterizadas fundamentalmente por una severa depleción los linfocitos T, que puede ir acompañada o no de otras alteraciones leucocitarias. En este grupo de enfermedades son casi patognomónicas las infecciones por patógenos oportunistas, producidas tanto por virus como por bacterias u hongos, y que aparecen desde los primeros meses de vida. La forma más frecuente (la mitad de los casos de SCID) es la ligada al X (X-SCID), pero existen muchas otras como la deficiencia en JAK3, la Disgenesia Reticular o el Síndrome de Omenn, cada una de ellas con características propias que permiten diferenciarlas del resto, y que en algunos casos se acompañan de manifestaciones muy específicas que facilitan el diagnóstico (microcefalia, facies típica, alteraciones cutáneas, etcétera). En el presente apartado se discuten los casos clínicos del 1 al 6.

El **caso clínico 1** es un paciente que debutó a los 7 meses de edad con una meningitis por *Listeria monocytogenes*. En el hospital de origen se estableció una sospecha diagnóstica de SCID, que fue confirmada en nuestro centro, en base a los bajos niveles de linfocitos T, células NK y de inmunoglobulinas séricas, a pesar de un número normal de linfocitos B (SCID T-B+NK-). El análisis del gen que codifica la cadena gamma común del receptor de la IL-2, *IL-2GR*, responsable de X-SCID, mostró una alteración en el exón 3 (c.373insA), lo que provocaba la aparición de un codón STOP prematuro (p.Lys120fsX46), incompatible con una proteína funcional. Esta mutación ya había sido descrita en la literatura en pacientes con X-SCID (Puck, 1997). El estudio de los familiares reveló que tanto la madre como la abuela y la bisabuela del paciente eran portadoras de la mutación, y que por tanto habían transmitido la enfermedad. El paciente fue sometido a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) a los 10 meses de edad y su evolución hasta la fecha está siendo muy favorable.

El **caso clínico 2** sufrió a los 6 meses de edad una neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, un patógeno muy característico en las SCIDs. El análisis inmunológico no era tan evidente como en el caso anterior, puesto que existía un número más elevado de linfocitos T de lo esperable en un SCID convencional. El estudio más detallado de las poblaciones linfocitarias sugería que podrían tratarse de linfocitos T procedentes de un implante materno, ya que expresaban el marcador de células T memoria CD45R0. Además, el niño presentaba un número prácticamente normal de células NK (SCID T-B+NK+). A pesar de ello y puesto que el paciente era un varón y, como ya hemos comentado, la forma más frecuente de SCID es la ligada al cromosoma X, decidimos estudiar el gen *IL-2GR*. El análisis genético mostró que el paciente presentaba la mutación c.C664T, que comportaba el cambio p.Arg222Cys. Dicha alteración ya había sido descrita como responsable de X-SCID, y más específicamente asociada a formas de presentación no convencional de la enfermedad (Clark, 1995). En este caso únicamente la

madre era portadora de la alteración genética (mutación *de novo* en la madre). Al igual que el caso anterior, el paciente fue sometido a un TPH a los 11 meses de edad y la evolución también está siendo muy buena a pesar de haber presentado una reacción cutánea secundaria a una enfermedad de injerto contra huésped de grado I-II, que respondió bien al tratamiento inmunosupresor.

El **caso clínico 3** es, a diferencia de los 2 anteriores, una mujer, por lo que a pesar del diagnóstico de SCID T-B+NK-, establecido en el hospital de origen, quedaba descartado, en principio, el análisis del gen *IL-2GR*. La similitud clínica e inmunológica con la X-SCID (tipo de infecciones, linfopenia que afecta a células T y NKs más agammaglobulinemia a pesar de la conservación de los linfocitos B) llevó a estudiar la cascada de señalización a través del receptor de IL-2, que resultó ser defectuosa en la paciente. Más concretamente el estudio se llevó a cabo en células B inmortalizadas mediante el virus de Epstein-Barr (EBV). Este dato nos condujo a estudiar el gen *JAK3*, ya que codifica para la única molécula por la que señala la cadena γ y del receptor de la IL-2 (IL-2R γ). La paciente presentaba una inserción de 4 bases en el exón 10 de dicho gen (c.1367insGGCA), lo que provocaba la generación de una proteína truncada incapaz de realizar sus funciones (p.Thr456fsX520). Ambos padres son portadores de dicha alteración genética. Desafortunadamente, y a pesar de haberse realizado un TPH, la paciente no consiguió superar una infección por CMV post-TPH y murió como consecuencia de las complicaciones neurológicas secundarias.

Tal y como hemos visto, los pacientes con SCID T-B+NK- presentan una susceptibilidad incrementada a patógenos oportunistas desde edades muy tempranas. Cuando se sospecha de esta patología, y especialmente cuando se trata de varones, se debe priorizar el estudio de X-SCID, aunque exista un número normal o no demasiado disminuido de linfocitos T, ya que éstos pueden ser de origen materno (implante materno secundario a la Inmunodeficiencia Celular) y confundir el diagnóstico. Si se trata de mujeres, se debe analizar la cascada de señalización del receptor IL-2R γ para saber si esta se encuentra alterada y si es preciso continuar con el estudio genético de *JAK3*. En el caso de que dicha cascada sea normal, se pasaría a analizar los genes implicados en otras formas de SCID con herencia autosómica recesiva, como *IL-7RA*.

El **caso clínico 4** también es una niña y al igual que en el caso anterior, fue diagnosticada de SCID en el hospital de procedencia. A pesar de no haber podido identificar el defecto genético responsable de la enfermedad, la paciente fue trasplantada, lo que es imperativo aunque se desconozca el diagnóstico exacto del subtipo de SCID. La revisión de la historia clínica por parte de nuestro equipo, hizo replantearnos el diagnóstico previo y en base a la intensa linfopenia de células T, pero sobretodo teniendo en cuenta la severa neutropenia que presentaba, pensamos que podía tratarse de un caso de Disgenesia Reticular. Al estar la paciente ya trasplantada y haberse establecido en sangre periférica una situación de quimerismo entre sus leucocitos y los leucocitos del donante, decidimos estudiar primero a los padres, que además por el hecho de ser consanguíneos (primos hermanos), se postulaban como portadores obligados de la posible mutación. El análisis del gen *AK2* en los padres mostró una alteración en heterocigosis en la primera base del exón 1 (c.A1T) en ambos progenitores y pudimos demostrar que esta mutación aparecía en homocigosis en una muestra pre-TPH de la paciente. Esta sustitución que invalida el codón de inicio de la traducción de la proteína ya había sido reportada en uno de los dos artículos originales en los que se describía a *AK2* como responsable de Disgenesia Reticular, aunque en su caso en heterocigosis

(Pannicke, 2009). En la Disgenesia Reticular está afectado severamente el desarrollo de los linfocitos T y los neutrófilos, pero de manera mucho menos importante el de los linfocitos B y los monocitos. En concordancia con estos datos, y después del TPH, el quimerismo que encontrábamos en la sangre periférica de la paciente era porcentualmente distinto en función de la población celular estudiada y por ello nos planteamos analizar la secuencia del gen *AK2* en cada una de estas poblaciones leucocitarias. Este estudio demostró que sólo aquellas poblaciones celulares que se habían visto gravemente afectadas por el defecto genético (linfocitos T y neutrófilos) eran sustituidas casi completamente por las del donante, mientras que aquellas que no lo estaban permanecían siendo mayoritariamente del receptor (linfocitos B y monocitos). Esta observación ya había sido descrita por nuestro grupo a través del análisis de microsatélites en poblaciones leucocitarias aisladas varios años antes de que se descubriera que el gen responsable de la Disgenesia Reticular era *AK2* (De La Calle-Martin, 1997) y fue posteriormente ampliada a otras poblaciones leucocitarias como las células dendríticas y las células de Langerhans (Emile, 2000).

El **caso clínico 5** fue derivado a nuestro hospital debido a las múltiples infecciones que había sufrido en los primeros meses de vida. El análisis inmunológico básico mostró un bajo número de linfocitos T y una completa ausencia de linfocitos B junto con agammaglobulinemia, lo que indicaba que se trataba de una SCID T-B-NK+, y nos hacía sospechar de un defecto en los mecanismos de reordenamiento de los receptores antígeno-específicos (Igs y TCRs). Los linfocitos T presentes en la sangre periférica del paciente eran propios (se excluyó mediante el estudio del quimerismo la posibilidad de un implante materno), tenían marcadores de madurez (CD45R0) y eran claramente anérgicos (al carecer completamente de respuesta ante diversos estímulos mitogénicos), por lo que supusimos que habrían sufrido una expansión en periferia. Los antecedentes de consanguinidad y de muertes perinatales en la familia, que afectaban tanto a varones como a mujeres, también apoyaban la sospecha de una forma autosómica recesiva de la enfermedad (SCID-AR). Por todos estos motivos pasamos a estudiar los genes *RAG*. El análisis del gen *RAG-1* mostró una delección en homocigosis de la Timina 631 (c.631delT) que comporta un codón STOP prematuro (p.Glu174fsX27). Las mutaciones en los genes *RAG* son responsables tanto de SCID T-B-NK+ como del Síndrome de Omenn, en función de cómo se ve afectada la expresión y/o funcionalidad de dichas proteínas. Así, las mutaciones que impiden la expresión de las proteínas *RAG-1* o *RAG-2* son responsables de SCID, mientras que aquellas que permiten una actividad residual de su actividad enzimática o tal vez conservar parte de sus funciones, lo son de Síndrome de Omenn. La mutación c.631delT ya había sido publicada y ampliamente estudiada en un paciente procedente de la misma región geográfica que los progenitores de los hermanos 5 y 6 (Noordzij, 2000), por lo que suponemos que se trata de una mutación con efecto fundador presente en el norte de África y que afecta a la población bereber. Según estos autores, esta mutación origina la síntesis de una proteína más pequeña, a partir de un codón de inicio secundario, que se encuentra situado más allá de la delección de la Timina (AUG¹⁸³). Es decir, que a la proteína *RAG-1* presente en estos pacientes le faltan algunos aminoácidos del extremo N-terminal, pero mantiene intacta la región Core. Esta proteína truncada conserva parte de sus funciones, de manera que probablemente es capaz de recombinar algunos TCRs. Estos linfocitos T generados en el timo son células T anérgicas y potencialmente autorreactivas. El caso clínico 5 fue trasplantado y se recuperó muy rápidamente, alcanzando niveles normales de linfocitos B antes de los 2 meses post-TPH. Además, estos linfocitos B eran plenamente funcionales como demostraba el hecho de que el

niño comenzó rápidamente a producir inmunoglobulinas, incluso IgA. A los 21 meses post-TPH el paciente volvió a ser ingresado por fiebre que no remitía, detectándosele una gran adenopatía laterocervical y una neumonía bilateral. El análisis inmunológico mostró una pérdida de los linfocitos B (que pertenecían al donante) y niveles elevados de IgE (364 UI/mL) que indicaban que la enfermedad había recidivado y además, en ese momento, bajo la forma de un Síndrome de Omenn, una presentación mucho más agresiva que la de su patología primaria. Falleció 2 meses después del ingreso por fallo multiorgánico provocado por un infiltrado linfocitario masivo.

El análisis de los familiares indicó que ambos padres eran portadores de la enfermedad, y que también lo eran 3 de sus 6 hermanos vivos. Posteriormente la pareja tuvo otro hijo, el **caso clínico 6**, que desde el momento de su nacimiento sufrió una eritrodermia exfoliativa generalizada acompañada de complicaciones sistémicas. En este caso, y de manera sorprendente, el paciente presentaba linfocitosis T, pero también mostraba una completa ausencia de linfocitos B, así como agammaglobulinemia. Al igual que ocurría en su hermano, los linfocitos T eran propios y de memoria y además estaban muy activados, lo que indicaba una expansión en periferia. El estudio del exón 2 de *RAG-1* confirmó que tenía la misma alteración en homocigosis que el caso 5 (c.631delT). Sin embargo, todos estos datos indicaban que, y a diferencia de su hermano mayor, se trataba de una forma intermedia entre SCID y Síndrome de Omenn, un *Omenn-like*, ya que presentaba características de Síndrome de Omenn (eritrodermia y fenotipo T+B-) pero faltaban la hepatoesplenomegalia, la hipereosinofilia y el aumento de IgE. El paciente falleció antes de poder iniciar el tratamiento acondicionador para el TPH. A principios del año 2010 nació una prima hermana de los casos clínico 5 y 6 que presentaba una grave y extensa eritrodermia exfoliativa, acompañada de linfopenia T, ausencia de linfocitos B, pero, y a diferencia de sus primos, niveles elevados de IgE (604 UI/mL). Es decir, que se trataba de un caso típico de Síndrome de Omenn neonatal. El análisis del gen *RAG-1* corroboró la presencia de la mutación c.631delT. Los padres eran también consanguíneos y presentaban la mutación en heterocigosis. Esta paciente falleció después de iniciarse el tratamiento acondicionador para el TPH, que no llegó a realizarse.

La variabilidad fenotípica que provoca esta mutación, y en general las mutaciones que pueden dar origen a un Síndrome de Omenn es debida, en parte, al carácter aleatorio de la generación del repertorio de TCRs y también al espectro de patógenos con los que se enfrenta el paciente. El reordenamiento del TCR determinará el reconocimiento del linfocito T y con él, su potencial autoreactividad. Es por ello que la misma alteración es capaz de dar lugar a diferentes presentaciones clínicas (SCID, Síndrome de Omenn o Síndromes mixtos SCID/Omenn), e incluso que diversas presentaciones puedan darse en el mismo individuo, como se ha descrito en el caso clínico 5 después del TPH.

3.- Síndromes de hiper-IgM

Los Síndromes de hiper-IgM se caracterizan por infecciones recurrentes y niveles séricos muy bajos de IgG, IgA e IgE y normales o elevados de IgM y, en general, están causados por defectos en las proteínas implicadas en la generación del repertorio de anticuerpos. La forma más frecuente es la ligada al X (XHIM) y está provocada por alteraciones en la molécula CD40 ligando (CD40L). El XHIM también está encuadrado dentro del grupo de las inmunodeficiencias combinadas de células T y B, ya que se trata de un defecto funcional de los linfocitos T, que

repercute en la funcionalidad de los linfocitos B. En este apartado se presentan los casos clínicos 7 y 8.

El **caso clínico 7** es un varón que había sufrido neumonías, bronquitis, otitis y diarreas recurrentes desde el primer año de vida. En el hospital de origen fue diagnosticado de Síndrome de hiper-IgM en base a la ausencia de IgG, IgA y los niveles elevados de IgM. En el mismo hospital se instauró tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas (IVIg) y con G-CSF para corregir la neutropenia que presentaba, y que suele ser típica en este tipo de pacientes. El **caso clínico 8**, hermano menor del anterior, debutó a los 6 meses con bronquitis. El análisis de las Igs mostró una ausencia de todos los isotipos, a excepción de la IgM que era normal. En base a estos datos y debido a la historia clínica de su hermano mayor, se estableció el diagnóstico de Síndrome de Hiper-IgM y se le aplicó el mismo tratamiento.

Posteriormente, fueron derivados a nuestro hospital donde llevamos a cabo la caracterización molecular y genética de la enfermedad. La expresión inducida de CD40L en linfocitos T CD4+ resultó ser nula en ambos pacientes, mientras que en la madre se vio una expresión bimodal, lo que sugería que era portadora de la alteración. Esta expresión bimodal suele ser debida a la inactivación aleatoria del cromosoma X en los linfocitos T CD4+, ya que la ausencia de esta proteína no impide su correcta maduración y permite el paso de estas células desde el timo a la periferia. Por el contrario, la expresión de CD40L en la abuela materna era totalmente normal y equivalente a la encontrada en los individuos control. El análisis del gen *TNFSF5*, que codifica para CD40L, mostró una gran deleción en los pacientes, la cual abarcaba desde poco antes de la zona aceptora de *splicing* del intrón 3 (justo antes el exón 4) hasta un punto no determinado, pero situado por delante del promotor génico. Aunque no pudimos determinar el extremo 5' de la deleción, sí que pudimos establecer que sólo implicaba a *TNFSF5*, y no a los genes situados *upstream*. En la literatura está descrita una deleción de unas 10Kb por delante del exón 4, muy similar a la de nuestros pacientes (Seyama, 1998), pero el origen étnico de los pacientes es completamente diferente por lo que debe tratarse de una casualidad o más probablemente de una recombinación entre secuencias Alu u otro tipo de secuencias homólogas.

Ante la imposibilidad técnica de diseñar una PCR que nos permitiera identificar la deleción en el resto de la familia, decidimos realizar el estudio de posibles portadoras de la enfermedad mediante el análisis de la expresión de CD40L, ya que esta aproximación nos había permitido identificar a la madre como portadora de la patología, así como descartar a la abuela materna. Los análisis parecían indicar que ningún otro familiar era portador de la enfermedad. La determinación del origen de la deleción acabó de corroborar estos datos, ya que la presencia de un polimorfismo poco frecuente (p.Gly219Arg) en la madre (para el cual era heterocigota) nos permitió seguir el origen de los dos diferentes alelos (el que tenía el polimorfismo y el que llevaba la deleción) y nos llevó a concluir que dicha deleción se produjo, probablemente, en el abuelo materno durante la espermatogénesis del gameto a partir del que se concibió la madre de los pacientes. Estudiamos dicho polimorfismo en un grupo de controles (varones y mujeres) y concluimos que el polimorfismo p.Gly219Arg tiene una frecuencia de 2 por cada 150 cromosomas en la población española y no parece alterar la funcionalidad de la proteína, aunque estamos pendientes de concluir dichos estudios.

Debido a la gravedad de la enfermedad, ya que se trata de una inmunodeficiencia combinada de células T y B, se decidió trasplantar a ambos pacientes. El caso clínico 7 fue sometido a un TPH de un donante no emparentado con una identidad HLA 9 de 10. La presencia de una

infección latente previa al TPH provocó su expansión durante este proceso que acabó provocándole la muerte. En la actualidad el caso clínico 8 está pendiente de recibir un TPH que, por voluntad expresa de la familia, será de un embrión sano seleccionado y HLA-compatible (selección dirigida de embriones para aplicación terapéutica).

4.- Agammaglobulinemia ligada al X

Las Agammaglobulinemias Congénitas se caracterizan por un déficit de todos los isotipos de inmunoglobulinas y una ausencia de linfocitos B y células plasmáticas. Estos pacientes sufren infecciones bacterianas graves que suelen comenzar a partir de la desaparición de la IgG de origen materno, lo que suele implicar una ausencia de infecciones en los primeros meses de vida. La Agammaglobulinemia ligada al X (XLA) o Enfermedad de Bruton fue la primera IDP descrita y también la primera en la que se identificó el defecto genético responsable. Está causada por alteraciones en la proteína quinasa Btk, proteína imprescindible para el desarrollo de la célula B, pero no para el desarrollo de otras células hematopoyéticas en las que también se expresa. Básicamente se trata de células de estirpe mieloide, como los monocitos y los granulocitos. En este apartado se presentan los casos clínicos 9 y 10.

El **caso clínico 9** es un varón que debutó a los 15 meses con un cuadro de diarrea crónica y fiebre. La ausencia de linfocitos B, así como los bajos niveles de Igs, sugirieron el diagnóstico de XLA en el hospital de origen, donde se instauró el tratamiento sustitutivo con IVIG. El estudio inmunológico que le realizamos en nuestro hospital sí mostró linfocitos B, alrededor de un 0,5%, igualmente compatible con el diagnóstico de XLA. Para confirmar dicho diagnóstico, analizamos la proteína Btk en leucocitos de sangre periférica, siendo el resultado completamente negativo en el paciente, mientras que en la madre aparecía una expresión bimodal. El análisis por citometría mostraba que sólo un 18% de los monocitos de la madre expresaban Btk, mientras que todos sus linfocitos B lo hacían. Esto es debido a que la inactivación del cromosoma X en los monocitos sí es aleatoria (al no ser la Btk necesaria para su desarrollo), pero no lo es en los linfocitos B, que necesitan expresar Btk nativa para desarrollarse, completar el reordenamiento de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas y poder así llegar a periferia. El *western blot* para Btk corroboró su completa ausencia en el paciente y la menor cantidad de proteína en las células mononucleares de la madre respecto a los controles. El análisis genético reveló la presencia de una duplicación de una Adenina en el exón 7 (c.557dupA) en hemicigosis en el paciente y en heterocigosis en su madre. Esta mutación, que comporta la aparición de un STOP prematuro, ya había sido asociada a XLA (Conley, 1994). No pudimos determinar si se trataba o no de una mutación *de novo* en la madre, puesto que aún no hemos podido analizar a la abuela materna.

El **caso clínico 10** es un varón adulto que había sufrido infecciones respiratorias de vías altas, diarreas y otras infecciones bacterianas graves desde su primer año de vida hasta que con 17 años se le comenzaron a administrar IVIG. Fue en ese momento cuando se le analizaron por primera vez los niveles de linfocitos B, que resultaron ser indetectables. El análisis de los niveles séricos de inmunoglobulinas realizados a los 15 años de edad sólo mostraba niveles bajos de IgG por lo que fue diagnosticado de Inmunodeficiencia Común Variable (CVID). Con casi 40 años de edad, el paciente trasladó su residencia a Barcelona y fue derivado a nuestro hospital para controlar su tratamiento con IVIG. El análisis inmunológico

básico que le hicimos mostró niveles indetectables de linfocitos B, pero también de IgA e IgE. Los de IgM eran bajos aunque constantes (18-20 mg/dL) y la IgG era aportada exógenamente. Por todo ello, nos replanteamos el diagnóstico establecido y pensamos que podía tratarse de una XLA en lugar de una CVID. A pesar de ello, el análisis de expresión de la proteína Btk en leucocitos de sangre periférica era equivalente a la encontrada en los controles. Aún así, realizamos el estudio genético, ya que una expresión correcta de la proteína no implica necesariamente que esta sea funcional. Este estudio mostró una mutación en hemicígosis (c.G863A) que comportaba una sustitución aminoacídica (p.Arg288Gln), que ya había sido previamente asociada a XLA (Conley, 1998b). Dicha mutación altera el dominio de interacción SH2, lo que la convierte en una proteína que se transcribe y se traduce correctamente, y que alcanza niveles normales, pero que es funcionalmente inactiva. El estudio del exón 10 de *BTK* en la madre indicó que era portadora de la enfermedad y en estos momentos estamos a la espera de estudiar a la familia materna para determinar la existencia de otras portadoras de la patología.

Los 2 casos aquí analizados de XLA debutaron de forma muy similar, pero se diagnosticaron de manera muy distinta. El primero fue rápidamente diagnosticado y tratado, lo que ha permitido un control exhaustivo y la ausencia de infecciones. El segundo caso fue mal diagnosticado y el tratamiento se inició muy tarde, por lo que padeció infecciones muy graves que requirieron medidas drásticas, como la lobectomía inferior izquierda.

5.- Síndrome de Wiskott-Aldrich

El Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) se caracteriza por una triada muy característica: trombocitopenia con plaquetas pequeñas, eczema e inmunodeficiencia. Está causado por mutaciones en el gen *WAS*, que codifica la proteína WASP, la cual está implicada en el reordenamiento del citoesqueleto de actina de las células hematopoyéticas, una vez que éstas se activan. Mutaciones en este gen también son responsables de Trombocitopenia ligada al X (XLT), enfermedad en la que existe trombocitopenia con plaquetas pequeñas, puede haber o no eczema y no hay inmunodeficiencia; y de Neutropenia ligada al X (XLN), en la que sólo se detecta neutropenia congénita. Es el tipo de mutaciones el que determina la presentación y la sintomatología clínica y, por tanto, la patología. Las mutaciones que impiden la síntesis de proteína son responsables de WAS, mientras que aquéllas que generan proteínas ligeramente alteradas o bajos niveles de proteína nativa (por ejemplo, en los casos en los que hay una alteración a nivel de *splicing*), lo son de XLT. La XLN está causada exclusivamente por mutaciones *missense* en el dominio de unión de GTPasa. En este apartado se presentan los casos clínicos 11 a 15.

El **caso clínico 11** presentaba trombocitopenia con plaquetas pequeñas, eczema y diarreas sanguinolentas de etiología desconocida. El análisis inmunológico era normal a excepción de los elevados niveles de IgE, típicos del WAS. Asimismo es de destacar un elevado porcentaje de células NK, muy superior al encontrado en controles sanos de su misma edad. El estudio de la capacidad proliferativa de los linfocitos T mostró que estos respondían correctamente frente a mitógenos, pero de una forma no adecuada a los aloantígenos, un rasgo también característico del WAS. El estudio de la proteína WASP mostró niveles indetectables en el paciente y equivalentes a los individuos control en la madre de éste. El estudio genético del mRNA de

WASP demostró una alteración de *splicing* que consistía en la incorporación de 38 bp del intrón 6, entre las que había un codón STOP en pauta. Esta alteración estaba causada por una mutación en el quinto nucleótido del intrón 6 (IVS6+5G>A). La madre era portadora de la enfermedad. Esta mutación ya había sido descrita en pacientes con XLT, pero no en pacientes con WAS (Imai, 2003a; Kwan, 1995). Nuestro paciente presentaba todas las características clínicas e inmunológicas del WAS y, además, en la madre había una inactivación sesgada del cromosoma X en los linfocitos T, dato diferencial con las portadoras de XLT, en las que es aleatoria. En los pacientes XLT descritos con esta mutación existe una síntesis mínima de mRNA que permite una traducción residual de proteína nativa que es capaz de realizar algunas funciones. En nuestro paciente no existían restos de proteína WASP tal y como se observa en el *western blot*, de ahí que se tratara de un WAS. Este caso demuestra claramente que en las Inmunodeficiencias Primarias el estudio genético elemental (el mero análisis de mutaciones a nivel de DNA genómico) a menudo ignora aspectos funcionales y/o moleculares relevantes para la patología, el pronóstico y la evolución de los pacientes. El estudio de familiares indicó que sólo la madre era portadora de la alteración (mutación *de novo* en la madre). El paciente fue sometido a un TPH con 10 meses de edad. La evolución post-TPH ha sido muy buena permitiendo una normalización completa tanto de la clínica como de la función del sistema inmune y de las plaquetas. El estudio de la proteína WASP post-TPH demostró la correcta implantación de los linfocitos T del donante.

El **caso clínico 12** es un varón que había sido diagnosticado de Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI) a los 10 meses de edad en su país de origen, pero que además presentaba eczema y múltiples cuadros de sobreinfecciones respiratorias y cutáneas. A los 11 años emigró a nuestro país, donde se replanteó el diagnóstico y fue derivado a nuestro hospital con sospecha de WAS. El análisis inmunológico mostró niveles muy elevados de IgA e IgE y, al igual que en el caso anterior, un porcentaje incrementado de células NK. El análisis molecular de WASP mostró una ausencia total en los leucocitos del paciente. En el estudio del mRNA de WASP vimos un *splicing* incorrecto debido a una falta del exón 3, lo que comportaba un desplazamiento en la pauta de lectura y un STOP prematuro. El análisis del gen WAS reveló una inserción de una Timina después de la segunda base del intrón 3 (IVS+2-3insT), en hemicigosis en el caso del paciente y en heterocigosis en su madre. Esta mutación ya había sido descrita en pacientes con WAS (Remold-O'Donnell, 1997). No dispusimos de muestra de la abuela materna para seguir el análisis de la mutación en esta familia. El paciente fue trasplantado de su hermana HLA idéntica, que además no era portadora de la alteración.

El **caso clínico 13** también fue diagnosticado de PTI porque, aunque padecía una trombocitopenia con plaquetas pequeñas, no presentaba eczemas. Al cursar con un síndrome febril fue remitido a nuestro hospital para ver si se trataba de un WAS. Al igual que en los dos casos anteriores, los niveles de IgE estaban elevados y también los niveles de las células NK, lo que no ha sido resaltado con anterioridad en la literatura. No detectamos proteína WASP ni por citometría ni por *western blot* en el paciente. El estudio genético mostró la mutación c.C100T en el exón 1 que comportaba la sustitución p.Arg34STOP. Esta alteración ya había sido publicada como responsable de WAS (Derry, 1995). La madre no era portadora de la alteración, por lo que se trataba de una mutación *de novo* en el paciente. El paciente ha sido recientemente trasplantado de una unidad de cordón umbilical y su evolución hasta la fecha es favorable.

Al **caso clínico 14** se le realizó la primera analítica a raíz de una taquicardia supraventricular mostrando trombocitopenia con plaquetas pequeñas. Este dato junto con la observación de la aparición de petequias derivó la consulta a nuestro hospital con sospecha diagnóstica de WAS *versus* XLT con tan sólo 4 meses de vida. A esa edad, los niveles de IgE eran normales y las células NK estaban menos elevadas que en los casos anteriores. Tampoco se detectó proteína WASP y el análisis mostró una alteración de *splicing* debido a una sustitución de la primera base del intrón 8 (IVS8+1G>A) que implicaba la falta del exón 8 en el transcrito de WASP. Esta mutación ya había sido descrita como responsable de WAS (MacCarthy-Morrogh, 1998). En este caso nuestro paciente fue controlado a una edad muy temprana y no llegó a sufrir infecciones destacables. La madre no era portadora de la enfermedad (mutación *de novo* en el paciente). El paciente ha sido recientemente sometido a un TPH con 11 meses de edad y la evolución está siendo buena aunque es demasiado pronto para confirmar una normalización total.

Un dato que nos llamó la atención y que queremos destacar fue el elevado número de células NK que presentaban los 4 pacientes con WAS aquí expuestos. En la literatura está descrito que las células NK están afectadas en este síndrome, ya que la falta de proteína WASP impide una formación correcta de la sinapsis inmunológica entre estas células y sus células diana. Sin embargo, y tal y cómo se demostró en el caso clínico 11, no existe un defecto en la movilización de sus gránulos citotóxicos. El elevado número de células NK podría ser debido a un intento de compensación de la baja eficiencia de estas células deficientes en proteína WASP nativa. De hecho, en el caso clínico 11, después del TPH la población de células NK se ha normalizado.

El **caso clínico 15** es un varón de 11 años que a los 6 meses de edad se le detectó una profunda neutropenia que se ha mantenido a lo largo del tiempo. A los 10 años fue remitido a nuestro hospital para el estudio de Síndrome de Schwamann-Diamond, una IDP asociada a neutropenia. Tras analizar el gen responsable y no hallar alteraciones, nos planteamos la posibilidad de que se tratara de una Neutropenia ligada al X (XLN). El estudio del exón 9 del gen WAS, que es donde se han descrito las mutaciones responsables de XLN, mostró la sustitución c.T881C que comportaba el cambio de la Isoleucina 294 por una Treonina (p.Ile294Thr) mutación ya asociada a XLN (Ancliff, 2006). Tanto la madre como la abuela eran portadoras de la alteración por lo que estamos a la espera de muestras de toda la familia materna para completar el estudio de portadoras y también de posibles enfermos mal diagnosticados e incluso no diagnosticados.

6.- Síndrome linfoproliferativo ligado al X

El Síndrome Linfoproliferativo ligado al X (XLP) es una inmunodeficiencia de disregulación del sistema inmune en la que hay una respuesta inadecuada al virus de Epstein-Barr (EBV) que provoca mononucleosis infecciosa fulminante, disgammaglobulinemia y/o linfomas. Los pacientes con manifestaciones clínicas de XLP pueden tener defectos en el gen *SAP/SH2D1A* (XLP-1), en el gen *XIAP* (XLP-2) o en otros genes todavía por identificar. Asimismo, se han descrito pacientes con un fenotipo similar al XLP con una herencia autosómica recesiva (AR) con mutaciones en el gen *ITK*. Aunque el fenotipo clínico es parecido en todos pacientes, sólo se han descrito linfomas en los pacientes con XLP-1. En este apartado se presentan los casos clínicos 16 al 19.

Los **casos clínicos 16 y 17** son 2 hermanos varones que habían sufrido un linfoma B no Hodgking de localización nodal-ileocecal del subtipo *Burkitt-like* característico de los pacientes con XLP-1. Sin embargo, en el primero, y a diferencia del segundo, la serología para EBV era negativa. Después del tratamiento han permanecido estables y sin complicaciones hasta la fecha. El **caso clínico 18** no ha reportado ningún episodio destacable aunque, y al igual que sus hermanos, es sometido a revisiones periódicas. El análisis del gen *SAP/SH2D1A* mostró la mutación c.T305G en hemicigosis en los 3 hermanos y en heterocigosis en la madre. Esta mutación que provocaba el cambio p.Val102Gly ya había sido publicado como responsable de XLP-1 (Sumegi, 2002). En esta familia existían numerosos antecedentes de procesos linfoproliferativos en varones vía materna, por lo que pensamos que no se trataba de una mutación *de novo* en la madre y que la abuela también sería portadora de la alteración, aunque no pudimos disponer de muestra para corroborarlo. Los 3 pacientes están a la espera de recibir un TPH, aunque la falta de donantes compatibles ha hecho que se haya decidido llevar a cabo una selección de embriones sanos y con HLA compatibles en los tres pacientes, de modo que se podrán trasplantar con menor riesgo de sus hermanos. En estos casos no pudimos analizar los niveles de Igs, puesto que sólo recibimos muestra de DNA y no nos han remitido datos al respecto para poder determinar posibles disgammaglobulinemias.

El **caso clínico 19** sufrió una mononucleosis fulminante, con serología positiva para EBV y falleció debido a una insuficiencia respiratoria grave complicada por múltiples infecciones. El análisis inmunológico mostró disgammaglobulinemia y linfocitosis T con expresión de marcadores de activación. En el estudio del gen *SAP/SH2D1A* detectamos una gran deleción que abarcaba todos los exones de dicho gen, pero no a otros genes próximos como *XIAP*. Una deleción de todo el gen ya fue publicada como responsable de XLP-1 (Honda, 2000). Para saber si la madre del paciente era portadora de la deleción realizamos una determinación semicuantitativa del número de copias del gen *SAP/SH2D1A* mediante PCR en tiempo real que indicó que era portadora de la alteración. El estudio de los hermanos de la madre los descartó como portadores de la enfermedad, lo que era de esperar puesto que nunca habían sufrido sintomatología de XLP. Posteriormente, la pareja tuvo otros 2 hijos varones, ninguno de los cuáles estaba afectado por el defecto genético.

7.- Enfermedad Granulomatosa Crónica

Los pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica (CGD) sufren infecciones bacterianas y fúngicas severas y recurrentes con aparición de granulomas como consecuencia de un defecto en la cadena respiratoria implicada en la destrucción de bacterias y hongos fagocitados por las células mieloides. La afectación de cualquiera de las subunidades que forman parte del complejo de la NADPH oxidasa da lugar a esta patología, aunque la severidad dependerá tanto del tipo de mutación como de la subunidad implicada. La forma más frecuente (70%) y también la más severa es la ligada al X (X-CGD), y dentro de las AR, la más frecuente (25%) pero también la menos grave es el defecto de p47^{phox}. En este apartado se presentan los casos clínicos 20 a 27.

El **caso clínico 20** es un varón que durante el primer mes de vida desarrolló una enfermedad inflamatoria intestinal crónica y posteriormente una osteomielitis y una endocarditis

bacteriana. Después de descartar otras patologías, analizamos la capacidad oxidativa de sus granulocitos que resultó ser nula. Con esta prueba quedó establecido el diagnóstico de CGD y, además, como el resultado de la prueba funcional en la madre era bimodal, nos estaba indicando que era una X-CGD en la que ella era portadora. El estudio molecular de gp91^{phox}, proteína alterada en la X-CGD, confirmó la ausencia total en el paciente, reproduciéndose la expresión bimodal en los neutrófilos de su madre. Esta doble expresión es debida a la inactivación aleatoria del cromosoma X que se da en los neutrófilos de las portadoras de X-CGD, ya que este defecto no afecta a su desarrollo, con lo que pueden pasar a periferia a pesar de no expresar la proteína gp91^{phox} nativa. El análisis genético de *CYBB*, que codifica gp91^{phox}, mostró una alteración en el exón 3 (c.T175C), mutación que implicaba el cambio p.Cys59Arg. Esta mutación ya había sido descrita, aunque con la anotación T189C (Rae, 1998). Tal y como era de esperar, la madre era portadora de la alteración, aunque no pudimos saber si era o no *de novo*, al no disponer de muestra de la abuela materna. La revisión de los antecedentes familiares permitió averiguar que el paciente había tenido un hermano mayor que había fallecido a los 15 meses de edad, como consecuencia de lo que se diagnosticó como una colitis ulcerosa, cuya evolución se complicó con una sepsis, que dio origen a un síndrome hematófagocítico que finalmente resultó letal. Como el caso índice había debutado con una complicación intestinal, analizamos la presencia de la mutación en una muestra del hermano que obtuvimos de una biopsia intestinal realizada previa a su fallecimiento. El hermano presentaba la misma mutación que el paciente, por lo que pudimos establecer que había fallecido por una complicación de una X-CGD mal diagnosticada y tratada. Ante la gravedad de la enfermedad, el caso índice está a la espera de recibir un TPH.

El **caso clínico 21** sufrió una aspergilosis invasiva pulmonar durante el primer mes de vida. En el hospital de origen se le realizó la determinación de la capacidad oxidativa de los granulocitos y se diagnosticó de CGD. Al pertenecer a una familia consanguínea fue orientado como una AR-CGD. Una vez recomprobada la deficiencia en la capacidad oxidativa y observada que dicha prueba era normal en su madre, empezamos el análisis de los genes implicados en AR-CGD, descartando mutaciones en *NCF1*, *CYBA* y *NCF2*. Finalmente, y puesto que se trataba de un varón, decidimos analizar el gen *CYBB* donde encontramos una alteración en el exón 7: una secuencia de 6 Adeninas estaba sustituida por 4 Adeninas y 1 Timina (c.741delA+A742T), lo que implicaba un cambio en la pauta de lectura y la generación de un codón STOP (p.Lys247fsX7). La madre no era portadora de la mutación por lo que se trataba de una mutación *de novo* en el paciente, que además no está descrita en la literatura. La no presencia de la alteración en la madre era concordante y explicaba el resultado totalmente normal de la capacidad oxidativa de sus granulocitos.

El **caso clínico 22** es un paciente que debutó a los 11 años con un absceso cerebeloso por *Aspergillus fumigatus*. A pesar de que este tipo de infecciones no es típico de CGD, se le realizó el test de oxidación de los granulocitos resultando negativo. Fue entonces remitido a nuestro hospital para establecer la causa genética de la CGD, así como para evaluar a los familiares como posibles donantes para un TPH. Lo primero que hicimos fue determinar la capacidad oxidativa de los granulocitos, no sólo en el paciente, si no también en sus dos hermanos varones y en ambos padres, que eran consanguíneos. La función oxidativa era indetectable en los tres hermanos, por lo que ampliamos el diagnóstico de CGD a los dos hermanos presuntamente sanos (**casos clínicos 23 y 24**). Estos resultados fueron confirmados en un hospital cercano al hospital de origen por lo que se los descartó como donantes. Los padres

parecían tener una actividad ligeramente inferior a los controles. Por otra parte y puesto que los 3 hermanos estaban enfermos, la madre era portadora obligada de la enfermedad, y si se hubiera tratado de una forma ligada al X, habría quedado reflejado en el test de oxidación en forma de bimodalidad, por lo que nos decantamos por una forma AR. Por ello, y en concordancia con todos los datos, primero estudiamos el gen *NCF1*. El análisis de la recombinación homóloga entre *NCF1* y su pseudogen (ϕ *NCF1*) indicó que los tres hermanos carecían de alelos nativos de *NCF1*, mientras que los padres sólo tenían uno, siendo ambos portadores de la enfermedad. Esta alteración, que impide la síntesis de proteína nativa, es la más frecuente en esta patología y fue descrita ya en el año 1991 (Casimir, 1991). El estudio de la proteína p47^{phox}, codificada por *NCF1*, corroboró la ausencia de la misma. Recientemente, el caso índice ha sufrido complicaciones severas (neumonía fúngica, colitis granulomatosa) por lo que se ha acelerado la búsqueda de donante no emparentado para el TPH. Ninguno de sus dos hermanos menores (casos clínicos 23 y 24) ha presentado aún sintomatología infecciosa.

El **caso clínico 25** es una niña que en el primer mes de vida sufrió una bronconeumonía por *Klebsiella sp* y en el tercero abscesos por *Serratia sp*. El estudio de la capacidad oxidativa de los granulocitos mostró una actividad nula en la paciente, pero totalmente equivalente a los controles en ambos progenitores. Primero descartamos mutaciones en *NCF1* y posteriormente en *CYBA* (p22^{phox}). Sin embargo, el estudio del mRNA de p67^{phox} mostró múltiples alteraciones en el *splicing*. Estas alteraciones afectaban tanto al alelo paterno como al materno. En el paterno había *exón skipping*, mientras que en el materno duplicación de exones. El estudio del gen *NCF2*, que codifica p67^{phox}, reveló una mutación en heterocigosis en el exón 5, la c.A481T, que originaba un codón STOP (p.Lys161STOP). Está descrito que la generación de estos codones STOP prematuros son detectados por la maquinaria de *splicing* que evita estos exones para intentar sintetizar proteínas alternativas que puedan realizar, al menos, parte de las funciones. Por ello, en la paciente se encontraban tanto formas de mRNA en las que faltaba el exón 5, como el 5 y el 6. Tanto el padre como la hermana de la paciente eran portadores de la alteración, pero al tener el otro alelo nativo no sufrían la enfermedad. Las formas de *splicing* generadas por el alelo materno parecían indicar la existencia de una duplicación génica. En la revisión bibliográfica hallamos una familia italiana portadora de una duplicación que parecía concordar con nuestro caso (Borgato, 2001). El análisis del alelo materno del gen *NCF2* confirmó la presencia de esta duplicación que implicaba a los exones 9 y 10. Tanto la madre como la abuela materna eran portadoras de la duplicación. El estudio molecular de p67^{phox} en la paciente mostró una proteína de menos peso molecular del esperado, unos 60 KDa, que no interaccionaba con p40^{phox} y que, por ello, no era funcionalmente activa. El peso de esta proteína parecía corresponder con la secuencia de mRNA carente del exón 5, que permite continuar con la pauta de lectura adecuada perdiendo los residuos correspondientes. No detectamos ninguna forma de proteína correspondiente a la duplicación génica, tal y cómo se había descrito anteriormente. La paciente era, por tanto, un heterocigoto compuesto para mutaciones en *NCF2*, lo que era de esperar en una forma AR en la que los padres no son consanguíneos, a pesar de que la frecuencia de las mutaciones es extremadamente baja.

El **caso clínico 26** es una mujer con una amplia historia de infecciones pulmonares (neumonías recurrentes, aspergilosis, fibrosis pulmonar) y sepsis desde el primer año de vida. A pesar de ello, no fue diagnosticada de CGD hasta los 8 años de edad. El **caso clínico 27** es su hermano que debutó a los 6 años de edad con una adenitis abscesificada y al que, a raíz del diagnóstico de su hermana, se le evaluó la capacidad oxidativa de los granulocitos siendo nula.

Casi 10 años después fueron derivados a nuestro hospital para determinar el defecto genético responsable de su enfermedad. El análisis de la capacidad oxidativa de los granulocitos de los miembros de la familia indicó que ambos pacientes carecían de actividad, pero que en los padres era equivalente a los controles. Al tratarse de una mujer, descartamos la forma ligada al X y analizamos primero *NCF1*, luego *CYBA* y finalmente *NCF2* donde encontramos una mutación en homocigosis en ambos pacientes en el exón 3: c.C229T. Este cambio transformaba la Arginina 77 en un STOP (p.Arg77STOP). Se trataba de una mutación no descrita en la literatura. Ambos padres tenían la mutación y estamos a la espera de realizar el estudio de portadores en toda la familia. La evolución del caso clínico 26 ha sido muy mala, tanto que requiere respiración artificial y está a la espera de recibir un trasplante de pulmón.

Está ampliamente reportado que la X-CGD es habitualmente una forma notablemente más severa que la AR-CGD. En base a nuestra limitada experiencia, podemos afirmar que si bien parece cierto que la forma AR-CGD causada por alteraciones en *NCF1* es algo menos severa que la X-CGD, no ocurre lo mismo con las otras formas de AR-CGD, o al menos aquéllas en las que está alterado *NCF2*. De hecho, de los pacientes aquí descritos, los que han tenido una peor evolución y por tanto han presentado un peor pronóstico son las pacientes con AR-CGD y que eran deficientes en p67^{phox}.

8.- Incontinencia Pigmenti

La Incontinencia Pigmenti (IP) es una genodermatosis con una herencia dominante ligada al X que provoca mortalidad neonatal en varones. Está causada por mutaciones en el gen *NEMO*, que también es responsable de la Displasia Ectodérmica Anhidrótica con Inmunodeficiencia (EDA-ID) y de la forma más severa con osteopetrosis y linfedema (EDA-ID-OL).

El **caso clínico 28** es una niña que desde el nacimiento presentaba todos los signos típicos de una genodermatosis: vesículas inflamatorias, lesiones dérmicas, verrugas, retinopatía. Todos estos datos, junto con la dentición cónica de la madre, establecieron la sospecha diagnóstica de IP. La causa genética más frecuente de IP, alrededor de un 80%, es un reordenamiento intragénico entre el intrón 3 y el extremo 3'UTR del gen *NEMO* que provoca la delección de los exones del 4 al 10. Tanto la paciente como la madre presentaban dicha alteración, con lo que quedaba establecido el diagnóstico de IP en ambas. Este estudio se realizó en base a los *primers* descritos como específicos para el gen y no el pseudogen que permiten un diagnóstico correcto (Bardaro, 2003).

En esta Tesis hemos demostrado que para un diagnóstico preciso de los pacientes inmunodeficientes es necesario un abordaje integral de los mismos. Es imprescindible una anamnesis completa, que incluya tanto los antecedentes personales como los familiares, así como un análisis inmunológico básico pero también estudios hematológicos y microbiológicos, que orienten hacia los estudios funcionales, moleculares y genéticos a realizar para una IDP concreta.

Aún así, existen casos en los que estos datos pueden confundir el diagnóstico, o al menos hacer dudar de él. Los antecedentes familiares son muy útiles para orientarnos, tal y como se demostró claramente en los casos clínicos 5-6 y en los 16-18, en los que la historia familiar nos

decantó hacia un SCID-AR y hacia un XLP, respectivamente. Sin embargo, en el caso clínico 21, la consanguineidad y las muertes perinatales en ambas ramas del árbol genealógico nos hicieron pensar en una AR-CGD, cuando en realidad se trataba de una X-CGD, que al ser debida a una mutación *de novo* en el paciente condicionó que la madre no fuera informativa, a diferencia de lo sucedido en el caso clínico 20. Del mismo modo, la identificación del patógeno responsable suele ser indicativa de una IDP concreta, como en el caso clínico 25 donde las infecciones por *Klebsiella sp* y *Serratia sp* nos orientaron hacia una CGD. No obstante, en el caso clínico 22 la infección por *Aspergillus fumigatus* y en una localización insólita, no era sugestiva de CGD, aunque el paciente resultó tener alterado el gen *NCF1*. Los análisis básicos también pueden confundir el diagnóstico, por ejemplo en el caso clínico 2 en el que el inmunofenotipo T-B+NK- descartaba, *a priori*, la forma X-SCID; sin embargo y debido a que se trataba de la forma más frecuente, decidimos estudiarla en primer lugar y encontramos una alteración en el gen *IL2GR* asociada a un fenotipo particular de esta enfermedad.

Otro dato que no debemos obviar es el análisis exhaustivo de los posibles donantes para el TPH, especialmente cuando se trata de hermanos. El caso clínico 22 es un claro ejemplo de esta situación, ya que aunque sus hermanos (casos clínicos 23 y 24) no habían presentado sintomatología de CGD tenían la misma alteración genética con lo que quedaban descartados como donantes.

Asimismo, también nos gustaría resaltar y defender nuestra forma de abordar estos estudios. Los análisis funcionales que realizamos en primer lugar nos permitieron una orientación más clara y aportaron muchos datos sobre el estado del sistema inmune del paciente. A continuación, y siempre que fue posible, identificamos las proteínas implicadas en cada uno de estos síndromes para, en último lugar, pasar al estudio genético. Aquí destacaríamos el análisis del mRNA como el más resolutivo, ya que las alteraciones detectadas a nivel de DNA tienen su efecto directo en la generación y procesamiento de esta molécula, que es la que se traducirá a proteína. De manera que posibles mutaciones *missense* o *nonsense*, que en principio no tendrían ningún efecto a nivel de mRNA, sí pueden estar modificando el proceso biológico del *splicing* y dar lugar a formas truncadas de la proteína que nunca hubiéramos identificando analizando únicamente el DNA. El caso clínico 25 es un ejemplo de esta situación, ya que la mutación p.Lys161STOP no es una simple mutación de generación de codón STOP, si no que provoca la formación de *splicings* alternativos que dan lugar a una proteína truncada. Nunca hubiéramos llegado a este resultado analizando exclusivamente la secuencia genética de DNA.

En síntesis, las Inmunodeficiencias Primarias son un subgrupo de enfermedades genéticas que presentan una serie de particularidades que hace razonable realizar un diagnóstico integral de las mismas. En este sentido, una buena anamnesis que incluya tanto datos personales como familiares debe ser la base del resto de estudios, entre los que se deben incluir análisis inmunológicos, funcionales, moleculares y genéticos. Sin olvidar que el objetivo final no es el diagnóstico, sino el tratamiento y seguimiento de estos pacientes.

VI. Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo son:

1. Se han evaluado 28 pacientes con una sospecha firme de Inmunodeficiencia Primaria (IDP), 22 de ellos con posible herencia ligada al X y el resto con síndromes cuyo diagnóstico diferencial se establece con una IDP ligada al sexo. En todos los casos se ha conseguido un diagnóstico definitivo.
2. Se han llevado a cabo diferentes tipos de estudios funcionales, moleculares y genéticos que nos han permitido diagnosticar 2 casos de Inmunodeficiencia Severa Combinada ligada al X (X-SCID), 1 de Inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID) por deficiencia en JAK3, 1 de Disgenesia Reticular, 2 de SCID-Síndrome de Omenn, 2 de Síndrome de hiper-IgM ligado al X (XHIM), 2 de Agammaglobulinemia ligada al X (XLA), 4 de Síndrome Linfoproliferativo ligado al X (XLP), 4 de Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), 1 de Neutropenia ligada al X (XLN), 2 de Enfermedad Granulomatosa Crónica ligada al X (X-CGD), 6 de Enfermedad Granulomatosa Crónica autosómica recesiva (AR-CGD) y 1 de Incontinencia Pigmenti (IP).
3. Se han identificado 5 nuevas mutaciones responsables de IDP. La mutación p.Thr456fsX520 en el gen *JAK3* responsable de SCID, la delección por encima del exón 4 del gen *TNFSF5* causante de XHIM, la alteración c.741delA+A472T en el gen *CYBB* responsable de X-CGD, y las mutaciones p.Lys161STOP y p.Arg77STOP en el gen *NCF2* causantes de AR-CGD.
4. El estudio genético de familiares ha permitido determinar que tres mutaciones son *de novo* en los pacientes (casos clínicos 13, 14 y 21), mientras que otras tres son *de novo* en la madre de los pacientes (casos clínicos 2, 7-8 y 11). Dos son heredadas de la abuela materna (casos clínicos 1 y 15) y siete están presentes en la madre pero desconocemos si son heredadas de la abuela materna (casos clínicos 9, 10, 12, 16-18, 19, 20 y 28). Asimismo, seis mutaciones se encuentran tanto en el padre como en la madre (casos clínicos 3, 4, 5-6, 22-24 y 26-27), mientras que las dos restantes se encuentran una en el padre y la otra en la madre del caso clínico 25 (heterocigoto compuesto). Además, se ha diagnosticado *post-mortem* un hermano del caso clínico 20 (X-CGD) a partir del análisis de DNA de una biopsia intestinal de archivo.
5. Se han establecido diversas relaciones fenotipo-genotipo en base a los pacientes aquí estudiados. Así, en los 2 X-SCID se ha visto que las 2 mutaciones encontradas dan lugar a un diferente inmunofenotipo a pesar de estar afectado el mismo gen. En los 2 hermanos con deficiencia en RAG-1, y en su prima, se ha determinado que la mutación c.631delT da lugar a 3 fenotipos distintos (SCID, Síndrome de Omenn, SCID-Omenn) pudiendo incluso darse en un mismo paciente después del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), como sucedió en el caso clínico 5. En los estudios de los pacientes con WAS se ha establecido que todas aquellas alteraciones que impiden la síntesis de proteína nativa WASP dan lugar a WAS y no a Trombocitopenia ligada al X (XLT) y que esto no sólo depende de la mutación en sí, si no de la presencia de proteína

nativa. Además, se ha determinado una observación no reportada anteriormente al relacionar claramente el porcentaje de células NK con la gravedad sintomatológica de la enfermedad. En los pacientes con CGD se ha establecido que tanto las X-CGD como las AR-CGD con deficiencia en p67^{phox} tienen una presentación clínica muy severa, mayor que en la forma AR-CGD debida a alteraciones en p47^{phox}.

6. En aquellos pacientes de los que se ha dispuesto de muestras post-TPH se han realizado estudios de quimerismo, poblaciones linfocitarias y cuantificación de inmunoglobulinas para seguir la implantación del injerto. Además, en el caso de Disgenesia Reticular se ha determinado la presencia de la mutación en las diferentes poblaciones leucocitarias para ver así que sólo eran del donante aquéllas que se veían gravemente afectadas por la mutación (linfocitos T y neutrófilos). En uno de los casos de WAS se ha determinado la presencia de proteína nativa en las células T después del TPH, demostrando así la correcta implantación de las células del donante. También se ha observado la normalización de las cifras de células NK en los pacientes WAS trasplantados.

VII. Abreviaturas

A

A	Adenina
AD	Autosómica dominante
ADA	Adenosín Deaminasa
AID	Citosín deaminasa inducida por activación
AK2	Adenilato kinasa 2
Ala	Alanina
ALPS	Síndrome linfoproliferativo autoinmune
APECED	Poliendocrinopatía Autoinmune con Candidiasis y Distrofia Ectodérmica
AR	Autosómica recesiva
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
AT	Ataxia Telangiectasia

B

BCR	Receptor del linfocito B
bp	Pares de bases
BTK	Tirosina kinasa de Bruton

C

C	Citosina
CD	Cluster de diferenciación
CD40L	CD40 ligando
cDNA	DNA copia
CGD	Enfermedad Granulomatosa Crónica
CHS	Síndrome de Chediak-Higashi
CMC	Candidiasis Mucocutánea
CMV	Citomegalovirus
cpm	cuentas por minuto
CVID	Inmunodeficiencia Común Variable
Cys	Cisteína

D

DGS	Síndrome de DiGeorge
DHR	Dihidrorhodamina 123
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (ADN)
dNTPs	2'Desoxirribonucleótidos-5'trifosfato
DTT	Ditiotreitol
DKC	Disqueratosis Congénita

E

EBV	Virus de Epstein-Barr
ECD	Tándem de fluorocromos Ficoeritrina-Texas red

Abreviaturas

EDA-ID	Displasia Ectodérmica Anhidrótica con Inmunodeficiencia
EDA-ID-OL	EDA-ID con osteopetrosis y linfedema
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético

F

FCS	Suero fetal bovino
FHL	Síndromes Hematofagocíticos Linfocíticos Familiares
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

G

G	Guanina
Glu	Ácido Glutámico
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
GS	Síndrome de Griscelli
GVHD	Grafo versus host disease (Enfermedad del injerto contra el huésped)

H

HLA	Antígeno leucocitario humano
HIES	Síndrome de hiper-IgE
HIGM	Síndromes de hiper-IgM
His	Histidina
HLH	Linfocitosis Hematofagocítica
HRP	Peroxidasa de rábano
HSE	Encefalitis del Herpes Simplex

I

IDP	Inmunodeficiencia primaria
Ig	Inmunoglobulina
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IL-2R γ	Cadena gamma común del receptor de la IL-2
Ile	Isoleucina
IP	Incontinencia Pigmenti
IPEX	Inmunedisregulación, Poliendocrinopatía y Enteropatía ligadas al X
ITP	Trombocitopenia Idiopática
IVIG	Inmunoglobulinas intravenosas

K

Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton

L

LAD	Déficits de Adhesión Leucocitaria
Leu	Leucina

LPS	Lipopolisacárido
Lys	Lisina
M	
MAC	Complejo de ataque a la membrana
Mb	Megabase
Met	Metionina
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MoAbs	Anticuerpos monoclonales
mRNA	RNA mensajero
N	
N	Adenina, Citosina, Guanina o Timina
NBT	Test del nitroazul de tetrazolium
NEMO	Modulador esencial de NF- κ B
NK	Células Natural Killer
O	
OKT3	Anti-CD3
OS	Síndrome de Omenn
P	
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato
PC5	Tándem de fluorocromos Ficoeritrina-Cianina 5
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PHA	Fitohemaglutinina
Phe	Fenilalanina
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PNP	Fosforilasa de nucleótidos purinas
Pro	Prolina
PTI	Púrpura Trombocitopénica Idiopática
PWM	Mitógeno Pokeweed
Q	
qPCR	PCR en tiempo real
R	
RAG	Activador de la recombinación
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Temperatura ambiente
RT-PCR	PCR con retrotranscripción

S

SBDS	Síndrome de Shwachman-Diamond
SCI	Suero de conejo inactivado
SCID	Inmunodeficiencia Severa Combinada
SDS	Dodecil-sulfato sódico
SEA	Superantígeno A de Staphylococcus aureus
SEB	Superantígeno B de Staphylococcus aureus
Ser	Serina

T

T	Timina
TBS	Solución de tampón Tris
TCR	Receptor del linfocito T
Thr	Treonina
TLR	Receptor Toll-like
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
TRECs	Círculos de escisión del TCR
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina

U

U	Uracilo
UFC	Unidad formadora de colonias
UNG	Uracil DNA glicosilasa

V

Val	Valina
-----	--------

W

WAS	Síndrome de Wiskott-Aldrich
WASP	Proteína del Síndrome de Wiskott-Aldrich
WB	Western blot

X

X	Codón STOP
X-CGD	Enfermedad Granulomatosa Crónica ligada al X
X-DKC	Disqueratosis Congénita ligada al X
X-SCID	Inmunodeficiencia Severa Combinada ligada al X
XHIM	Síndrome de hiper-IgM ligado al X
XLA	Agammaglobulinemia ligada al X
XLN	Neutropenia ligada al X
XLP	Síndromes linfoproliferativos ligados al X
XLT	Trombocitopenia ligada al X

VIII. Bibliografía

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S.** *Cellular and molecular immunology.* 2007; 6th. Saunders Elsevier.
- Abinun M, Spickett G, Appleton AL, Flood T, et al.** Anhidrotic ectodermal dysplasia associated with specific antibody deficiency. *Eur J Pediatr* 1996; 155:146-7.
- Agostoni A, Cicardi M, Cugno M, Storti E.** Clinical problems in the C1-inhibitor deficient patient. *Behring Inst Mitt* 1993; 306-12.
- Akahori Y, Kurosawa Y, Kamachi Y, Torii S, et al.** Presence of immunoglobulin (Ig) M and IgG double isotype-bearing cells and defect of switch recombination in hyper IgM immunodeficiency. *J Clin Invest* 1990; 85:1722-7.
- Aldrich RA, Steinberg AG, Campbell DC.** Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics* 1954; 13:133-9.
- Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, et al.** CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 1993; 259:990-3.
- Ambruso DR, Knall C, Abell AN, Panepinto J, et al.** Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:4654-9.
- Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO, Calle Y, et al.** Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood* 2006; 108:2182-9.
- Ariga T, Kondoh T, Yamaguchi K, Yamada M, et al.** Spontaneous in vivo reversion of an inherited mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Immunol* 2001; 166:5245-9.
- Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, et al.** Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2007; 356:1317-26.
- Armitage RJ, Tough TW, Macduff BM, Fanslow WC, et al.** CD40 ligand is a T cell growth factor. *Eur J Immunol* 1993; 23:2326-31.
- Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, et al.** The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 1993; 72:291-300.
- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT.** Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973; 52:741-4.
- Badolato R, Sozzani S, Malacarne F, Bresciani S, et al.** Monocytes from Wiskott-Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol* 1998; 161:1026-33.
- Barda-Saad M, Braiman A, Titerence R, Bunnell SC, et al.** Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat Immunol* 2005; 6:80-9.
- Bardaro T, Falco G, Sparago A, Mercadante V, et al.** Two cases of misinterpretation of molecular results in incontinentia pigmenti, and a PCR-based method to discriminate NEMO/IKKgamma gene deletion. *Hum Mutat* 2003; 21:8-11.
- Bennett CL, Yoshioka R, Kiyosawa H, Barker DF, et al.** X-Linked syndrome of polyendocrinopathy, immune dysfunction, and diarrhea maps to Xp11.23-Xq13.3. *Am J Hum Genet* 2000; 66:461-8.
- Bennett CL, Brunkow ME, Ramsdell F, O'Briant KC, et al.** A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA-->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome. *Immunogenetics* 2001a; 53:435-9.
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, et al.** The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001b; 27:20-1.
- Berglund G, Finnstrom O, Johansson SG, Moller KL.** Wiskott-Aldrich syndrome. A study of 6 cases with determination of the immunoglobulins A, D, G, M and ND. *Acta Paediatr Scand* 1968; 57:89-97.
- Blaese RM, Strober W, Brown RS, Waldmann TA.** The Wiskott-Aldrich syndrome. A disorder with a possible defect in antigen processing or recognition. *Lancet* 1968; 1:1056-61.
- Blasco MA.** Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol* 2007; 3:640-9.
- Borgato L, Bonizzato A, Lunardi C, Dusi S, et al.** A 1.1-kb duplication in the p67-phox gene causes chronic granulomatous disease. *Hum Genet* 2001; 108:504-10.
- Bruckner AL.** Incontinentia pigmenti: a window to the role of NF-kappaB function. *Semin Cutan Med Surg* 2004; 23:116-24.
- Brugnoni D, Airo P, Graf D, Marconi M, et al.** Ineffective expression of CD40 ligand on cord blood T cells may contribute to poor immunoglobulin production in the newborn. *Eur J Immunol* 1994; 24:1919-24.
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, et al.** Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001; 27:68-73.
- Bruton OC.** Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; 9:722-8.
- Buckley RH.** Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:625-55.
- Callard RE, Smith SH, Herbert J, Morgan G, et al.** CD40 ligand (CD40L) expression and B cell function in agammaglobulinemia with normal or elevated levels of IgM (HIM). Comparison of X-linked, autosomal recessive, and non-X-linked forms of the disease, and obligate carriers. *J Immunol* 1994; 153:3295-306.
- Campana D, Farrant J, Inamdar N, Webster AD, et al.** Phenotypic features and proliferative activity of B cell progenitors in X-linked agammaglobulinemia. *J Immunol* 1990; 145:1675-80.
- Carney RG.** Incontinentia pigmenti. A world statistical analysis. *Arch Dermatol* 1976; 112:535-42.

Casimir CM, Bu-Ghanim HN, Rodaway AR, Bentley DL, et al. Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by deletion at a dinucleotide repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:2753-7.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288:669-72.

Clark PA, Lester T, Genet S, Jones AM, et al. Screening for mutations causing X-linked severe combined immunodeficiency in the IL-2R gamma chain gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Hum Genet* 1995; 96:427-32.

Clark SR, Coffey MJ, Maclean RM, Collins PW, et al. Characterization of nitric oxide consumption pathways by normal, chronic granulomatous disease and myeloperoxidase-deficient human neutrophils. *J Immunol* 2002; 169:5889-96.

Clarke A. Hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Med Genet* 1987; 24:659-63.

Coffey AJ, Brooksbank RA, Brandau O, Oohashi T, et al. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* 1998; 20:129-35.

Conley ME, Brown P, Pickard AR, Buckley RH, et al. Expression of the gene defect in X-linked agammaglobulinemia. *N Engl J Med* 1986; 315:564-7.

Conley ME, Sweinberg SK. Females with a disorder phenotypically identical to X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Immunol* 1992; 12:139-43.

Conley ME, Fitch-Hilgenberg ME, Cleveland JL, Parolini O, et al. Screening of genomic DNA to identify mutations in the gene for Bruton's tyrosine kinase. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1751-6.

Conley ME, Cooper MD. Genetic basis of abnormal B cell development. *Curr Opin Immunol* 1998a; 10:399-406.

Conley ME, Mathias D, Treadaway J, Minegishi Y, et al. Mutations in *btk* in patients with presumed X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* 1998b; 62:1034-43.

Conley ME, Rohrer J, Rapalus L, Boylin EC, et al. Defects in early B-cell development: comparing the consequences of abnormalities in pre-BCR signaling in the human and the mouse. *Immunol Rev* 2000; 178:75-90.

Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM, Kilic S, et al. Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:199-227.

Connor JM, Gatherer D, Gray FC, Pirrit LA, et al. Assignment of the gene for dyskeratosis congenita to Xq28. *Hum Genet* 1986; 72:348-51.

Cooper MD, Chae HP, Lowman JT, Krivit W, et al. Wiskott-Aldrich syndrome. An immunologic deficiency disease involving the afferent limb of immunity. *Am J Med* 1968; 44:499-513.

Corneo B, Moshous D, Gungor T, Wulffraat N, et al. Identical mutations in RAG1 or RAG2 genes leading to defective V(D)J recombinase activity can cause either T-B-severe combined immune deficiency or Omenn syndrome. *Blood* 2001; 97:2772-6.

Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, Doffinger R, et al. A hypermorphic *I*kappaB α mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J Clin Invest* 2003; 112:1108-15.

Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 2006; 25:6831-43.

Cronkhite JT, Xing C, Raghu G, Chin KM, et al. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:729-37.

Cross AR, Yarchover JL, Curnutte JT. The superoxide-generating system of human neutrophils possesses a novel diaphorase activity. Evidence for distinct regulation of electron flow within NADPH oxidase by p67-phox and p47-phox. *J Biol Chem* 1994; 269:21448-54.

Chan K, Puck JM. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:391-8.

Chan SW, Blackburn EH. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 2002; 21:553-63.

Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 2000; 106:R75-81.

Chu YW, Marin E, Fuleihan R, Ramesh N, et al. Somatic mutation of human immunoglobulin V genes in the X-linked HyperIgM syndrome. *J Clin Invest* 1995; 95:1389-93.

De La Calle-Martin O, Badell I, Garcia A, Gelpi C, et al. B cells and monocytes are not developmentally affected in a case of reticular dysgenesis. *Clin Exp Immunol* 1997; 110:392-6.

de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005; 19:2100-10.

de Mendez I, Garrett MC, Adams AG, Leto TL. Role of p67-phox SH3 domains in assembly of the NADPH oxidase system. *J Biol Chem* 1994; 269:16326-32.

de Noronha S, Hardy S, Sinclair J, Blundell MP, et al. Impaired dendritic-cell homing in vivo in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Blood* 2005; 105:1590-7.

- de Saint Basile G, Arveiler B, Oberle I, Malcolm S, et al.** Close linkage of the locus for X chromosome-linked severe combined immunodeficiency to polymorphic DNA markers in Xq11-q13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:7576-9.
- de Saint Basile G, Fischer A.** X-linked immunodeficiencies: clues to genes involved in T- and B-cell differentiation. *Immunol Today* 1991; 12:456-61.
- de Villartay JP, Lim A, Al-Mousa H, Dupont S, et al.** A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *J Clin Invest* 2005; 115:3291-9.
- de VO, Seynhaeve V.** Reticular dysgenesis. *Lancet* 1959; 2:1123-5.
- Derry JM, Ochs HD, Francke U.** Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 1994; 79:following 922.
- Derry JM, Kerns JA, Weinberg KI, Ochs HD, et al.** WASP gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1127-35.
- Devriendt K, Kim AS, Mathijs G, Frints SG, et al.** Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet* 2001; 27:313-7.
- DiPalma JA, Strobel CT, Farrow JG.** Primary sclerosing cholangitis associated with hyperimmunoglobulin M immunodeficiency (dysgammaglobulinemia). *Gastroenterology* 1986; 91:464-8.
- DiSanto JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Fischer A, et al.** CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; 361:541-3.
- DiSanto JP, Dautry-Varsat A, Certain S, Fischer A, et al.** Interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain mutations in X-linked severe combined immunodeficiency disease result in the loss of high-affinity IL-2 receptor binding. *Eur J Immunol* 1994; 24:475-9.
- Doffinger R, Smahi A, Bessia C, Geissmann F, et al.** X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat Genet* 2001; 27:277-85.
- Dokal I.** Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol* 2000; 110:768-79.
- Drachtman RA, Alter BP.** Dyskeratosis congenita. *Dermatol Clin* 1995; 13:33-9.
- Du HY, Pumbo E, Ivanovich J, An P, et al.** TERC and TERT gene mutations in patients with bone marrow failure and the significance of telomere length measurements. *Blood* 2009; 113:309-16.
- Dupre L, Aiuti A, Trifari S, Martino S, et al.** Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* 2002; 17:157-66.
- Dupuis-Girod S, Corradini N, Hadj-Rabia S, Fournet JC, et al.** Osteopetrosis, lymphedema, anhidrotic ectodermal dysplasia, and immunodeficiency in a boy and incontinentia pigmenti in his mother. *Pediatrics* 2002; 109:e97.
- Emile JF, Geissmann F, Martin OC, Radford-Weiss I, et al.** Langerhans cell deficiency in reticular dysgenesis. *Blood* 2000; 96:58-62.
- Farrington M, Grosmaire LS, Nonoyama S, Fischer SH, et al.** CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:1099-103.
- Fearon ER, Kohn DB, Winkelstein JA, Vogelstein B, et al.** Carrier detection in the Wiskott Aldrich syndrome. *Blood* 1988; 72:1735-9.
- Ferrari S, Giliiani S, Insalaco A, Al-Ghoniium A, et al.** Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:12614-9.
- Filipovich AH, Stone JV, Tomany SC, Ireland M, et al.** Impact of donor type on outcome of bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the International Bone Marrow Transplant Registry and the National Marrow Donor Program. *Blood* 2001; 97:1598-603.
- Filipovich AH, Zhang K, Snow AL, Marsh RA.** X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins? *Blood* 2010; 116:3398-408.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY.** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:330-6.
- Fontenot JD, Rudensky AY.** A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6:331-7.
- Foster CB, Lehrnbecher T, Mol F, Steinberg SM, et al.** Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1998; 102:2146-55.
- Foy TM, Page DM, Waldschmidt TJ, Schoneveld A, et al.** An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. *J Exp Med* 1995; 182:1377-88.
- Fredrikson GN, Westberg J, Kuijper EJ, Tijssen CC, et al.** Molecular characterization of properdin deficiency type III: dysfunction produced by a single point mutation in exon 9 of the structural gene causing a tyrosine to aspartic acid interchange. *J Immunol* 1996; 157:3666-71.
- Fuchs A, Dagher MC, Vignais PV.** Mapping the domains of interaction of p40phox with both p47phox and p67phox of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system. *J Biol Chem* 1995; 270:5695-7.
- Fuleihan R, Ramesh N, Geha RS.** Role of CD40-CD40-ligand interaction in Ig-isotype switching. *Curr Opin Immunol* 1993; 5:963-7.
- Fuleihan R, Ramesh N, Horner A, Ahern D, et al.** Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *J Clin Invest* 1994; 93:1315-20.

- Gambineri E, Perroni L, Passerini L, Bianchi L, et al.** *Clinical and molecular profile of a new series of patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome: inconsistent correlation between forkhead box protein 3 expression and disease severity.* J Allergy Clin Immunol 2008; 122:1105-12 e1.
- Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, et al.** *Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency.* Lancet 1968; 2:1366-9.
- Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, et al.** *Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development.* Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:6659-64.
- Giliani S, Fiorini M, Mella P, Candotti F, et al.** *Prenatal molecular diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome by direct mutation analysis.* Prenat Diagn 1999; 19:36-40.
- Giliani S, Bonfim C, de Saint Basile G, Lanzi G, et al.** *Omenn syndrome in an infant with IL7RA gene mutation.* J Pediatr 2006; 148:272-4.
- Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, et al.** *Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15.* EMBO J 1994; 13:2822-30.
- Gismondi A, Cifaldi L, Mazza C, Giliani S, et al.** *Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: ability of IL-2 to correct NK cell functional defect.* Blood 2004; 104:436-43.
- Gorlach A, Lee PL, Roesler J, Hopkins PJ, et al.** *A p47-phox pseudogene carries the most common mutation causing p47-phox-deficient chronic granulomatous disease.* J Clin Invest 1997; 100:1907-18.
- Graf D, Korthauer U, Mages HW, Senger G, et al.** *Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells.* Eur J Immunol 1992; 22:3191-4.
- Grierson H, Purtilo DT.** *Epstein-Barr virus infections in males with the X-linked lymphoproliferative syndrome.* Ann Intern Med 1987; 106:538-45.
- Grierson HL, Skare J, Hawk J, Pauza M, et al.** *Immunoglobulin class and subclass deficiencies prior to Epstein-Barr virus infection in males with X-linked lymphoproliferative disease.* Am J Med Genet 1991; 40:294-7.
- Grierson HL, Skare J, Church J, Silberman T, et al.** *Evaluation of families wherein a single male manifests a phenotype of X-linked lymphoproliferative disease (XLP).* Am J Med Genet 1993; 47:458-63.
- Gross TG, Filipovich AH, Conley ME, Pracher E, et al.** *Cure of X-linked lymphoproliferative disease (XLP) with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT): report from the XLP registry.* Bone Marrow Transplant 1996; 17:741-4.
- Habib T, Senadheera S, Weinberg K, Kaushansky K.** *The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3.* Biochemistry 2002; 41:8725-31.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, et al.** *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1.* Science 2003; 302:415-9.
- Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, et al.** *Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency.* N Engl J Med 2010; 363:355-64.
- Harrington DS, Weisenburger DD, Purtilo DT.** *Malignant lymphoma in the X-linked lymphoproliferative syndrome.* Cancer 1987; 59:1419-29.
- Hayward AR, Levy J, Facchetti F, Notarangelo L, et al.** *Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM.* J Immunol 1997; 158:977-83.
- Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, et al.** *X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions.* Nat Genet 1998; 19:32-8.
- Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, Zovich D, et al.** *Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice.* Nature 1990; 344:251-3.
- Heyworth PG, Curnutte JT, Rae J, Noack D, et al.** *Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (second update).* Blood Cells Mol Dis 2001; 27:16-26.
- Holmes B, Page AR, Good RA.** *Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function.* J Clin Invest 1967; 46:1422-32.
- Hollenbaugh D, Wu LH, Ochs HD, Nonoyama S, et al.** *The random inactivation of the X chromosome carrying the defective gene responsible for X-linked hyper IgM syndrome (X-HIM) in female carriers of HIGM1.* J Clin Invest 1994; 94:616-22.
- Honda K, Kanegane H, Eguchi M, Kimura H, et al.** *Large deletion of the X-linked lymphoproliferative disease gene detected by fluorescence in situ hybridization.* Am J Hematol 2000; 64:128-32.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S.** *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.* Science 2003; 299:1057-61.
- Huang J, Hitt ND, Kleinberg ME.** *Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558.* Biochemistry 1995; 34:16753-7.
- Huck K, Feyen O, Niehues T, Ruschendorf F, et al.** *Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation.* J Clin Invest 2009; 119:1350-8.

- Imai K, Nonoyama S, Ochs HD.** WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003a; 3:427-36.
- Imai K, Slupphaug G, Lee WI, Revy P, et al.** Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* 2003b; 4:1023-8.
- Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, et al.** Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood* 2004; 103:456-64.
- Inoue H, Kurosawa H, Nonoyama S, Imai K, et al.** X-linked thrombocytopenia in a girl. *Br J Haematol* 2002; 118:1163-5.
- Jacobs H, Bross L.** Towards an understanding of somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* 2001; 13:208-18.
- Janeway C.** *Immunobiology : the immune system in health and disease.* 2001; 5th. Churchill Livingstone ; Garland.
- Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, Chen YQ, et al.** Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* 1994; 370:151-3.
- Johnston RB, Newman SL.** Chronic granulomatous disease. *Pediatr Clin North Am* 1977; 24:365-76.
- Karpusas M, Hsu YM, Wang JH, Thompson J, et al.** 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 1995; 3:1426.
- Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F.** An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4:337-42.
- Kildeberg P.** The Aldrich syndrome. Report of a case and discussion of pathogenesis. *Pediatrics* 1961; 27:362-9.
- Kimura Y, Takeshita T, Kondo M, Ishii N, et al.** Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex. *Int Immunol* 1995; 7:115-20.
- Kinoshita K, Honjo T.** Unique and unprecedented recombination mechanisms in class switching. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:195-8.
- Knight SW, Heiss NS, Vulliamy TJ, Aalfs CM, et al.** Unexplained aplastic anaemia, immunodeficiency, and cerebellar hypoplasia (*Hoyeraal-Hreidarsson syndrome*) due to mutations in the dyskeratosis congenita gene, *DKC1*. *Br J Haematol* 1999; 107:335-9.
- Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, et al.** Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1999; 274:25051-60.
- Kondo M, Takeshita T, Ishii N, Nakamura M, et al.** Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* 1993; 262:1874-7.
- Konno A, Wada T, Schurman SH, Garabedian EK, et al.** Differential contribution of Wiskott-Aldrich syndrome protein to selective advantage in T- and B-cell lineages. *Blood* 2004; 103:676-8.
- Korthauer U, Graf D, Mages HW, Briere F, et al.** Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; 361:539-41.
- Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, et al.** CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest* 2010; 120:214-22.
- Kwan SP, Hagemann TL, Blaese RM, Knutsen A, et al.** Scanning of the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) gene: identification of 18 novel alterations including a possible mutation hotspot at Arg86 resulting in thrombocytopenia, a mild WAS phenotype. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1995-8.
- Lacout C, Haddad E, Sabri S, Svinarchouk F, et al.** A defect in hematopoietic stem cell migration explains the nonrandom X-chromosome inactivation in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 2003; 102:1282-9.
- Lagresle-Peyrou C, Six EM, Picard C, Rieux-Laucat F, et al.** Human adenylate kinase 2 deficiency causes a profound hematopoietic defect associated with sensorineural deafness. *Nat Genet* 2009; 41:106-11.
- Landy SJ, Donnai D.** Incontinentia pigmenti (*Bloch-Sulzberger syndrome*). *J Med Genet* 1993; 30:53-9.
- Lane P, Brocker T, Hubele S, Padovan E, et al.** Soluble CD40 ligand can replace the normal T cell-derived CD40 ligand signal to B cells in T cell-dependent activation. *J Exp Med* 1993; 177:1209-13.
- Levitt D, Haber P, Rich K, Cooper MD.** Hyper IgM immunodeficiency. A primary dysfunction of B lymphocyte isotype switching. *J Clin Invest* 1983; 72:1650-7.
- Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, et al.** Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr* 1997; 131:47-54.
- Liese JG, Wintergerst U, Tympner KD, Belohradsky BH.** High- vs low-dose immunoglobulin therapy in the long-term treatment of X-linked agammaglobulinemia. *Am J Dis Child* 1992; 146:335-9.
- Liese JG, Jendrossek V, Jansson A, Petropoulou T, et al.** Chronic granulomatous disease in adults. *Lancet* 1996; 347:220-3.
- Lin Q, Rohrer J, Allen RC, Larche M, et al.** A single strand conformation polymorphism study of CD40 ligand. Efficient mutation analysis and carrier detection for X-linked hyper IgM syndrome. *J Clin Invest* 1996; 97:196-201.

Lindvall JM, Blomberg KE, Valiaho J, Vargas L, et al. *Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling.* *Immunol Rev* 2005; 203:200-15.

Lutskiy MI, Beardsley DS, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. *Mosaicism of NK cells in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome.* *Blood* 2005; 106:2815-7.

Lyon MF. *Lyonisation of the X Chromosome.* *Lancet* 1963; 2:1120-1.

MacCarthy-Morrogh L, Gaspar HB, Wang YC, Katz F, et al. *Absence of expression of the Wiskott-Aldrich syndrome protein in peripheral blood cells of Wiskott-Aldrich syndrome patients.* *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 88:22-7.

Macchi P, Villa A, Giliani S, Sacco MG, et al. *Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID).* *Nature* 1995; 377:65-8.

Markin RS, Linder J, Zuerlein K, Mroczek E, et al. *Hepatitis in fatal infectious mononucleosis.* *Gastroenterology* 1987; 93:1210-7.

Marsh RA, Villanueva J, Kim MO, Zhang K, et al. *Patients with X-linked lymphoproliferative disease due to BIRC4 mutation have normal invariant natural killer T-cell populations.* *Clin Immunol* 2009; 132:116-23.

Marsh RA, Madden L, Kitchen BJ, Mody R, et al. *XIAP deficiency: a unique primary immunodeficiency best classified as X-linked familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and not as X-linked lymphoproliferative disease.* *Blood* 2010; 116:1079-82.

Martinez-Pomar N, Munoz-Saa I, Heine-Suner D, Martin A, et al. *A new mutation in exon 7 of NEMO gene: late skewed X-chromosome inactivation in an incontinentia pigmenti female patient with immunodeficiency.* *Hum Genet* 2005; 118:458-65.

Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, et al. *A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity.* *Blood* 2009; 114:3309-15.

Mayer EJ, Shuttleworth GN, Greenhalgh KL, Sansom JE, et al. *Novel corneal features in two males with incontinentia pigmenti.* *Br J Ophthalmol* 2003; 87:554-6.

Mazzolari E, Forino C, Fontana M, D'Ippolito C, et al. *A new case of IPEX receiving bone marrow transplantation.* *Bone Marrow Transplant* 2005; 35:1033-4.

McBlane JF, van Gent DC, Ramsden DA, Romeo C, et al. *Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps.* *Cell* 1995; 83:387-95.

Meier UT. *The many facets of H/ACA ribonucleoproteins.* *Chromosoma* 2005; 114:1-14.

Milner JD, Brechley JM, Laurence A, Freeman AF, et al. *Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome.* *Nature* 2008; 452:773-6.

Mills EL, Rholl KS, Quie PG. *X-linked inheritance in females with chronic granulomatous disease.* *J Clin Invest* 1980; 66:332-40.

Molina IJ, Sancho J, Terhorst C, Rosen FS, et al. *T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses.* *J Immunol* 1993; 151:4383-90.

Morra M, Lu J, Poy F, Martin M, et al. *Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells.* *Embo J* 2001; 20:5840-52.

Muegge K, Vila MP, Durum SK. *Interleukin-7: a cofactor for V(D)J rearrangement of the T cell receptor beta gene.* *Science* 1993; 261:93-5.

Niehues T, Reichenbach J, Neubert J, Gudowius S, et al. *Nuclear factor kappaB essential modulator-deficient child with immunodeficiency yet without anhidrotic ectodermal dysplasia.* *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1456-62.

Nisimoto Y, Freeman JL, Motalebi SA, Hirshberg M, et al. *Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase.* *J Biol Chem* 1997; 272:18834-41.

Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A. *CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation.* *Immunol Today* 1992; 13:431-3.

Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, et al. *Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor.* *Science* 1993a; 262:1877-80.

Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, Filipovich AH, et al. *Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans.* *Cell* 1993b; 73:147-57.

Nolan KF, Schwaible W, Kaluz S, Dierich MP, et al. *Molecular cloning of the cDNA coding for properdin, a positive regulator of the alternative pathway of human complement.* *Eur J Immunol* 1991; 21:771-6.

Nomura K, Kanegane H, Karasuyama H, Tsukada S, et al. *Genetic defect in human X-linked agammaglobulinemia impedes a maturational evolution of pro-B cells into a later stage of pre-B cells in the B-cell differentiation pathway.* *Blood* 2000; 96:610-7.

Nonoyama S, Hollenbaugh D, Aruffo A, Ledbetter JA, et al. *B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells.* *J Exp Med* 1993; 178:1097-102.

Noordzij JG, Verkaik NS, Hartwig NG, de Groot R, et al. *N-terminal truncated human RAG1 proteins can direct T-cell receptor but not immunoglobulin gene rearrangements.* *Blood* 2000; 96:203-9.

- Notarangelo LD, Duse M, Ugazio AG.** *Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM).* Immunodef Rev 1992; 3:101-21.
- Notarangelo LD, Peitsch MC.** *CD40lbase: a database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper-IgM syndrome.* Immunol Today 1996; 17:511-6.
- Notarangelo LD, Giliani S, Mella P, Schumacher RF, et al.** *Combined immunodeficiencies due to defects in signal transduction: defects of the gamma-c-JAK3 signaling pathway as a model.* Immunobiology 2000; 202:106-19.
- Notarangelo LD, Mazza C, Giliani S, D'Aria C, et al.** *Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia.* Blood 2002; 99:2268-9.
- Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, et al.** *Primary immunodeficiencies: 2009 update.* J Allergy Clin Immunol 2009; 124:1161-78.
- Notarangelo LD.** *Primary immunodeficiencies.* J Allergy Clin Immunol 2010; 125:S182-94.
- Ochs HD, Slichter SJ, Harker LA, Von Behrens WE, et al.** *The Wiskott-Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets.* Blood 1980; 55:243-52.
- Ochs HD, Smith CI.** *X-linked agammaglobulinemia. A clinical and molecular analysis.* Medicine (Baltimore) 1996; 75:287-99.
- Ochs HD, Thrasher AJ.** *The Wiskott-Aldrich syndrome.* J Allergy Clin Immunol 2006; 117:725-38; quiz 39.
- Ochs HD, Smith CIE, Puck J.** *Primary immunodeficiency diseases : a molecular and genetic approach.* 2007; 2nd. Oxford University Press.
- Oliveira JB, Fleisher TA.** *Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies.* J Allergy Clin Immunol 2010; 125:S297-305.
- Orange JS, Ramesh N, Remold-O'Donnell E, Sasahara Y, et al.** *Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses.* Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:11351-6.
- Orange JS, Levy O, Brodeur SR, Krzewski K, et al.** *Human nuclear factor kappa B essential modulator mutation can result in immunodeficiency without ectodermal dysplasia.* J Allergy Clin Immunol 2004; 114:650-6.
- Ott G, Ott MM, Feller AC, Seidl S, et al.** *Prevalence of Epstein-Barr virus DNA in different T-cell lymphoma entities in a European population.* Int J Cancer 1992; 51:562-7.
- Owen CJ, Jennings CE, Imrie H, Lachaux A, et al.** *Mutational analysis of the FOXP3 gene and evidence for genetic heterogeneity in the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy syndrome.* J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:6034-9.
- Pacheco TR, Levy M, Collyer JC, de Parra NP, et al.** *Incontinentia pigmenti in male patients.* J Am Acad Dermatol 2006; 55:251-5.
- Padayachee M, Feighery C, Finn A, McKeown C, et al.** *Mapping of the X-linked form of hyper-IgM syndrome (HIGM1) to Xq26 by close linkage to HPRT.* Genomics 1992; 14:551-3.
- Pannicke U, Honig M, Hess I, Friesen C, et al.** *Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2.* Nat Genet 2009; 41:101-5.
- Park JY, Shcherbina A, Rosen FS, Prodeus AP, et al.** *Phenotypic perturbation of B cells in the Wiskott-Aldrich syndrome.* Clin Exp Immunol 2005; 139:297-305.
- Parolini O, Ressmann G, Haas OA, Pawlowsky J, et al.** *X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl.* N Engl J Med 1998; 338:291-5.
- Parrish JE, Scheuerle AE, Lewis RA, Levy ML, et al.** *Selection against mutant alleles in blood leukocytes is a consistent feature in Incontinentia Pigmenti type 2.* Hum Mol Genet 1996; 5:1777-83.
- Pasquier B, Yin L, Fondaneche MC, Relouzat F, et al.** *Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product.* J Exp Med 2005; 201:695-701.
- Paul WE.** *Fundamental immunology.* 2008; 6th. Lippincott Williams & Wilkins.
- Pawson T.** *Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics.* Nature 1995; 373:477-8.
- Peitsch MC, Jongeneel CV.** *A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors.* Int Immunol 1993; 5:233-8.
- Pepper AE, Buckley RH, Small TN, Puck JM.** *Two mutational hotspots in the interleukin-2 receptor gamma chain gene causing human X-linked severe combined immunodeficiency.* Am J Hum Genet 1995; 57:564-71.
- Peron S, Pan-Hammarstrom Q, Imai K, Du L, et al.** *A primary immunodeficiency characterized by defective immunoglobulin class switch recombination and impaired DNA repair.* J Exp Med 2007; 204:1207-16.
- Poliani PL, Vermi W, Facchetti F.** *Thymus microenvironment in human primary immunodeficiency diseases.* Curr Opin Allergy Clin Immunol 2009; 9:489-95.
- Powell BR, Buist NR, Stenzel P.** *An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy.* J Pediatr 1982; 100:731-7.

Proust A, Guillet B, Picard C, de Saint Basile G, et al. Detection of 28 novel mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia based on multiplex PCR. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 39:102-6.

Puck JM, Nussbaum RL, Conley ME. Carrier detection in X-linked severe combined immunodeficiency based on patterns of X chromosome inactivation. *J Clin Invest* 1987; 79:1395-400.

Puck JM, Deschenes SM, Porter JC, Dutra AS, et al. The interleukin-2 receptor gamma chain maps to Xq13.1 and is mutated in X-linked severe combined immunodeficiency, SCIDX1. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1099-104.

Puck JM, Pepper AE, Henthorn PS, Candotti F, et al. Mutation analysis of IL-2RG in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* 1997; 89:1968-77.

Purtilo DT, Cassel CK, Yang JP, Harper R. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1975; 1:935-40.

Rae J, Newburger PE, Dinauer MC, Noack D, et al. X-Linked chronic granulomatous disease: mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox component of respiratory-burst oxidase. *Am J Hum Genet* 1998; 62:1320-31.

Rawlings SL, Crooks GM, Bockstoce D, Barsky LW, et al. Spontaneous apoptosis in lymphocytes from patients with Wiskott-Aldrich syndrome: correlation of accelerated cell death and attenuated bcl-2 expression. *Blood* 1999; 94:3872-82.

Remold-O'Donnell E, Cooley J, Shcherbina A, Hagemann TL, et al. Variable expression of WASP in B cell lines of Wiskott-Aldrich syndrome patients. *J Immunol* 1997; 158:4021-5.

Revesz T, Fletcher S, al-Gazali LI, DeBuse P. Bilateral retinopathy, aplastic anaemia, and central nervous system abnormalities: a new syndrome? *J Med Genet* 1992; 29:673-5.

Revy P, Geissmann F, Debre M, Fischer A, et al. Normal CD40-mediated activation of monocytes and dendritic cells from patients with hyper-IgM syndrome due to a CD40 pathway defect in B cells. *Eur J Immunol* 1998; 28:3648-54.

Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 2000; 102:565-75.

Richter D, Conley ME, Rohrer J, Myers LA, et al. A contiguous deletion syndrome of X-linked agammaglobulinemia and sensorineural deafness. *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12:107-11.

Rieux-Laucat F, Bahadoran P, Brousse N, Selz F, et al. Highly restricted human T cell repertoire in peripheral blood and tissue-infiltrating lymphocytes in Omenn's syndrome. *J Clin Invest* 1998; 102:312-21.

Rigaud S, Fondaneche MC, Lambert N, Pasquier B, et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 2006; 444:110-4.

Roifman CM, Lederman HM, Lavi S, Stein LD, et al. Benefit of intravenous IgG replacement in hypogammaglobulinemic patients with chronic sinopulmonary disease. *Am J Med* 1985; 79:171-4.

Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 2005; 35:1681-91.

Roos D, de Boer M, Borregard N, Bjerrum OW, et al. Chronic granulomatous disease with partial deficiency of cytochrome b558 and incomplete respiratory burst: variants of the X-linked, cytochrome b558-negative form of the disease. *J Leukoc Biol* 1992; 51:164-71.

Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, et al. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 1996; 87:1663-81.

Rosenzweig SD, Holland SM. Phagocyte immunodeficiencies and their infections. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:620-6.

Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I-kappaB kinase complex. *Nature* 1998; 395:297-300.

Russell WL, Russell LB, Cupp MB. Dependence of Mutation Frequency on Radiation Dose Rate in Female Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1959; 45:18-23.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182:18-32.

Savage SA, Giri N, Baerlocher GM, Orr N, et al. TINF2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet* 2008; 82:501-9.

Sbarra AJ, Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1959; 234:1355-62.

Schifferli JA, Ng YC, Peters DK. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N Engl J Med* 1986; 315:488-95.

Schwarz K, Gauss GH, Ludwig L, Pannicke U, et al. RAG mutations in human B cell-negative SCID. *Science* 1996; 274:97-9.

Seemayer TA, Gross TG, Egeler RM, Pirruccello SJ, et al. X-linked lymphoproliferative disease: twenty-five years after the discovery. *Pediatr Res* 1995; 38:471-8.

Seyama K, Nonoyama S, Gangsaas I, Hollenbaugh D, et al. Mutations of the CD40 ligand gene and its effect on CD40 ligand expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Blood* 1998; 92:2421-34.

- Shearer WT, Ritz J, Finegold MJ, Guerra IC, et al.** Epstein-Barr virus-associated B-cell proliferations of diverse clonal origins after bone marrow transplantation in a 12-year-old patient with severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 1985; 312:1151-9.
- Sideras P, Smith CI.** Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. *Adv Immunol* 1995; 59:135-223.
- Silverstein AM.** Essential hypocomplementemia: report of a case. *Blood* 1960; 16:1338-41.
- Skare JC, Milunsky A, Byron KS, Sullivan JL.** Mapping the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:2015-8.
- Slatter MA, Gennery AR.** Clinical immunology review series: an approach to the patient with recurrent infections in childhood. *Clin Exp Immunol* 2008; 152:389-96.
- Smahi A, Hyden-Granskog C, Peterlin B, Vabres P, et al.** The gene for the familial form of incontinentia pigmenti (IP2) maps to the distal part of Xq28. *Hum Mol Genet* 1994; 3:273-8.
- Smahi A, Courtois G, Vabres P, Yamaoka S, et al.** Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. *The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium.* *Nature* 2000; 405:466-72.
- Smahi A, Courtois G, Rabia SH, Doffinger R, et al.** The NF-kappaB signalling pathway in human diseases: from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Hum Mol Genet* 2002; 11:2371-5.
- Smith CI, Notarangelo LD.** Molecular basis for X-linked immunodeficiencies. *Adv Genet* 1997; 35:57-115.
- Spriggs MK, Armitage RJ, Strockbine L, Clifford KN, et al.** Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J Exp Med* 1992; 176:1543-50.
- Stiehm ER, Chin TW, Haas A, Peerless AG.** Infectious complications of the primary immunodeficiencies. *Clin Immunol Immunopathol* 1986; 40:69-86.
- Stiehm ER, Ochs HD, Winkelstein JA.** Immunologic disorders in infants & children. 2004; 5th. Saunders.
- Stout RD, Suttles J, Xu J, Grewal IS, et al.** Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J Immunol* 1996; 156:8-11.
- Strahm B, Rittweiler K, Duffner U, Brandau O, et al.** Recurrent B-cell non-Hodgkin's lymphoma in two brothers with X-linked lymphoproliferative disease without evidence for Epstein-Barr virus infection. *Br J Haematol* 2000; 108:377-82.
- Sullivan JL, Woda BA.** X-linked lymphoproliferative syndrome. *Immunodeficiency Rev* 1989; 1:325-47.
- Sumegi J, Seemayer TA, Huang D, Davis JR, et al.** A spectrum of mutations in SH2D1A that causes X-linked lymphoproliferative disease and other Epstein-Barr virus-associated illnesses. *Leuk Lymphoma* 2002; 43:1189-201.
- Tabata Y, Villanueva J, Lee SM, Zhang K, et al.** Rapid detection of intracellular SH2D1A protein in cytotoxic lymphocytes from patients with X-linked lymphoproliferative disease and their family members. *Blood* 2005; 105:3066-71.
- Takada H, Kanegane H, Nomura A, Yamamoto K, et al.** Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation. *Blood* 2004; 103:185-7.
- Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, et al.** Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science* 1992; 257:379-82.
- Thomas C, de Saint Basile G, Le Deist F, Theophile D, et al.** Brief report: correction of X-linked hyper-IgM syndrome by allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1995; 333:426-9.
- Thrasher AJ, Burns SO.** WASP: a key immunological multitasker. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:182-92.
- Touraine JL, Raudrant D, Royo C, Rebaud A, et al.** In-utero transplantation of stem cells in bare lymphocyte syndrome. *Lancet* 1989; 1:1382.
- Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, et al.** Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993; 72:279-90.
- van der Vliet HJ, Nieuwenhuis EE.** IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol* 2007; 2007:89017.
- Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, Holland J, et al.** The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993; 361:226-33.
- Vihinen M, Arredondo-Vega FX, Casanova JL, Etzioni A, et al.** Primary immunodeficiency mutation databases. *Adv Genet* 2001; 43:103-88.
- Villa A, Notarangelo L, Macchi P, Mantuano E, et al.** X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in the WASP gene. *Nat Genet* 1995; 9:414-7.
- Villa A, Santagata S, Bozzi F, Giliani S, et al.** Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome. *Cell* 1998; 93:885-96.
- Vowels MR, Tang RL, Berdoukas V, Ford D, et al.** Brief report: correction of X-linked lymphoproliferative disease by transplantation of cord-blood stem cells. *N Engl J Med* 1993; 329:1623-5.
- Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, et al.** The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* 2001a; 413:432-5.

- Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, Marrone A, et al.** Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:8073-8.
- Vulliamy TJ, Knight SW, Mason PJ, Dokal I.** Very short telomeres in the peripheral blood of patients with X-linked and autosomal dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol Dis* 2001b; 27:353-7.
- Walne AJ, Vulliamy T, Marrone A, Beswick R, et al.** Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10. *Hum Mol Genet* 2007; 16:1619-29.
- Walne AJ, Dokal I.** Advances in the understanding of dyskeratosis congenita. *Br J Haematol* 2009; 145:164-72.
- Wallach TM, Segal AW.** Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem J* 1997; 321 (Pt 3):583-5.
- Wang WC, Cordoba J, Infante AJ, Conley ME.** Successful treatment of neutropenia in the hyperimmunoglobulin M syndrome with granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1994; 16:160-3.
- Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, et al.** The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008; 111:77-85.
- Wei WZ, Morris GP, Kong YC.** Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:73-8.
- Wengler G, Gorlin JB, Williamson JM, Rosen FS, et al.** Nonrandom inactivation of the X chromosome in early lineage hematopoietic cells in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 1995; 85:2471-7.
- Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, et al.** X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001; 27:18-20.
- Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH.** Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 2002; 39:537-45.
- Williams LL, Rooney CM, Conley ME, Brenner MK, et al.** Correction of Duncan's syndrome by allogeneic bone marrow transplantation. *Lancet* 1993; 342:587-8.
- Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Jr., Boyle J, et al.** Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79:155-69.
- Wiskott A.** Familiärer, angeborener Morbus Werlhofii? *Monatsschr Kinderheilkd* 1937; 68:212-16.
- Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, et al.** FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006; 126:375-87.
- Zonana J, Elder ME, Schneider LC, Orlow SJ, et al.** A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO). *Am J Hum Genet* 2000; 67:1555-62.
- Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, et al.** Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106:2903-11.
- zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, et al.** EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 1970; 228:1056-8.