

The background of the entire page is a blurred image of human chromosomes, showing various pairs of chromosomes in different colors (green, blue, red, purple, yellow) and sizes, arranged in a somewhat circular pattern.

UAB

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES
DE BASE GENÉTICA QUE AFECTAN
AL SISTEMA INMUNE**

Mónica Martínez Gallo
Barcelona, 2007



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGIA

Tesis doctoral con el título:

**Diagnóstico Molecular de Enfermedades de Base
Genética que afectan al Sistema Inmune**

Presentada para la obtención del título de Doctor en Biología
por la Universidad Autónoma de Barcelona

Mónica Martínez Gallo
Barcelona, 2007

El Dr. Oscar de la Calle Martín y el Dr. José Luis Rodríguez Sánchez, Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y Profesor Titular del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona, en calidad de codirectores de esta Tesis,

HACEN CONSTAR

Que el trabajo titulado “Diagnóstico Molecular de Enfermedades de Base Genética que afectan al Sistema Inmune” presentado como Tesis Doctoral por Mónica Martínez Gallo para optar al grado de Doctor en Biología, reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa en su día ante el tribunal correspondiente.

Barcelona, Junio del 2007

Dr. Oscar de la Calle Martín
Codirector

Dr. José Luis Rodríguez Sánchez
Codirector

A mis padres y hermano

Demostrar é la forma mais incómoda de creer. Todo o raciocínio começa en una crença e acaba en una crença. Comença na crença no raciocínio e acaba na crença nas conclusoes do raciocínio.

Fernando Pessoa

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Profesor José Luis Rodríguez Sánchez, codirector de esta Tesis Doctoral, por haberme permitido formar parte de su equipo de investigación ofreciéndome la posibilidad de desarrollar este trabajo, por sus consejos, su ayuda y su paciencia sobre todo en la última etapa de la Tesis.

Al Dr. Oscar de la Calle Martín, codirector de esta Tesis Doctoral, por iniciarme en mi formación clínica e investigadora, por su dedicación y apoyo.

Al Dr. Cándido Juárez por su disponibilidad ante mil consultas, mil gracias por su apoyo y continuo ánimo. A la Dra. Carmen Gelpí por su contribución en mi formación científica. A la Dra. Silvia Vidal por trasmitirme su entusiasmo y sus consejos científicos y a la Dra. Elisabet Cantó por contagiarme su sentido crítico y por su amistad.

A todos los compañeros del Servicio de Inmunología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona por su ayuda y su amabilidad a lo largo de mis años de formación, especialmente a Carmen Hayles y a Nenuca Martínez.

A los Servicios de Hematología, Pediatría, Pneumología y Medicina Interna del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona por su desinteresada y constante ayuda.

A los pacientes y a sus familias, ya que sin ellos no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Quiero dar las gracias de forma especial a las personas que siempre han estado a mi lado, me han ayudado y me han apoyado en los momentos más difíciles y sobre todo expresarles mi más sincero cariño por haber confiado en mí.

A mis amigas y amigos, los mejores.

A mi familia.

A

A Adenina
 aa Aminoácido
 ADA Adenosín deaminasa
 Ado Adenosina
 AID Citidín deaminasa inducible por activación
 AIRE Regulador autoinmune
 ALPS Síndrome linfoproliferativo autoinmune
 ANAs Anticuerpos anti-nucleares
 APECED Poliendocrinopatía autoinmune y displasia ectodérmica
 APC Células profesionales presentadoras de antígeno
 AR Artritis reumatoide
 A-T Ataxia-telangiectasia
 ATLL Leucemia/linfoma de la célula T en el adulto
 ATM Ataxia telangiectasia mutations

B

BCR Receptor de la célula B
 BSA Albúmina sérica bovina
 Btk o BTK Cinasa de Bruton

C

C Citosina
 CBZ Carbamazepina
 CD *Cluster of differentiation*
 CD40L CD40 ligando
 cDNA DNA complementario
 CDR Regiones determinantes de complementariedad
 CML Cultivo mixto linfocitario
 CPM Motivo de unión al péptido
 CMV Citomegalovirus
 CPD connecting peptide domain
 c.m.p. Cuentas por minuto

ConA Concanavalina A
 CRD Dominio rico en cisteína
 CSR Cambio de clase de las Inmunoglobulinas
 CTL Linfocito T citotóxico
 CVID Inmunodeficiencia común variable

D

dAdo 2'-deoxiadenosina
 DA Deoxiadenina
 DD Dominio muerte
 DISC Complejo señalizador inductor de muerte
 DMSO Dimetilsulfóxido
 DN Doble negativ@
 DNA Acido desoxirribonucleico
 DNTs Células T doble negativas
 DP-T Células T doble positivas
 dNTP's 2'-Deoxirribonucleósidos-5'-trifosfato
 D.O. Densidad óptica
 DS Donantes sanos

E

EBV Virus Epstein-Barr
 EGC Enfermedad granulomatosa crónica
 E. Coli *Escherichia coli*
 EDTA Ácido etilen-diamino-tetraacético
 EICH Enfermedad del injerto contra el huésped
 ELP Electroproteínograma
 ESID Sociedad Europea de IDP

F

FADD Dominio muerte asociado a Fas
 FCS Fetal calf serum. Suero fetal de ternera
 FR Factor reumatoide
 FS Forward scatter

G

ABREVIATURAS

G Guanina
GHC Hormonas glucocorticoides
GVHD Enfermedad del injerto contra el huésped

H

HIGM Hiper IgM
HGC Hormonas glucocorticoides
HLA Antígeno leucocitario humano
HIV Virus de la inmunodeficiencia humana
HPRT Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa

I

IDP Inmunodeficiencias primarias.
IDCV Inmunodeficiencia común variable
Ig Inmunoglobulina
IEF Isoelectroenfoque
IF Inmunofijación
IFD Inmunofluorescencia directa
IFI Inmunofluorescencia indirecta
IFN Interferón
IL- Interleuquina
IP3 Inositol trifostato
IPEX Inmunodisregulación poliendocrino-enteropatía ligada al X
IVIG Inmunoglobulinas intravenosas

K

Kb Kilobase
KD Kilodaltons

L

LAD Defecto en moléculas de adhesión
LBA Lavado broqueoalveolar
LES Lupus eritematoso sistémico
LGLL Leucemia linfoide granular

M

Mb Megabases
MBG Membrana basal glomerular
MHC Complejo principal de Histo-compatibilidad
Min. Minutos
MLR Reacción mixta linfocitaria
MO Médula ósea

N

NADPH Adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NBT Nitroazul de tetrazoilo
N.D. No determinado
NEMO Gen modulador esencial de NF-kB
NK *Natural killer*
nm nanómetros

P

bp Pares de bases (*Base pair*)
p.e. Por ejemplo
PBMC Células mononucleares de sangre periférica
PBS Solución tampón fosfato
PCR Reacción en cadena de la polimerasa
PDN Prednisona
PE Ficoeritrina
PHA Fitohemaglutinina
PLC γ 2 Fosfolipasa C γ 2
PLP Paraformaldehído lisina peryodato
PMA Acetato de forbol miristato
PNP Purín nucleósido fosforilasa
PTI Púrpura trombocitopénica idiopática
PWN Mitógeno pokeweed

R

r.p.m. Revoluciones por minuto
RE Retículo endoplasmático
RSCA Análisis conformacional del DNA de doble hebra.

ABREVIATURAS

RSV Virus respiratorio sincitial

S

SBT Tipaje basado en secuenciación

SCI Suero de conejo inactivado

SCID Inmunodeficiencia severa combinada

SDS Dodecil-sulfato sódico

SEA Enterotoxina A del *Stafilococo aureus*

SEB Enterotoxina B del *Stafilococo aureus*

Seg. Segundos

SH Dominio de homología Src

SI Sistema inmune

SKY Cariotipo espectral multicolor

SHM Hipermutación somática

SNP *Single nucleotide polymorphism*

SP Simple positivo

SS Side Scatter

SSCP Análisis polimorfismo conformacional de cadena única

SSP *Primers* específicos de secuencia

T

T Timina

t.a. Temperatura ambiente

TAC Tomografía axial computerizada

TBE Tris borato EDTA

TCR Receptor de la célula T

TE Tris-EDTA

TH Dominio homología Tec

TLR Receptor Toll like

TPH Trasplante de precursores hematopoyéticos

TM Transmembrana

TMB Tetrametilbenzidina

TNF Factor de necrosis tumoral

T-PLL Leucemia prolinfocítica T

U

UNG Uracil N-glicosilasa

UTR Región no traducida

UV Ultravioleta

V

VIH Virus de la inmunodeficiencia humana

VSG Velocidad de sedimentación globular

W

WHO Organización mundial de la salud

WAS Síndrome de Wiskott Aldrich

WB Washing buffer

X

XHIM Hiper IgM ligada al X

XLA Agammaglobulinemia ligada al X

XLP Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X

ABREVIATURAS

- **ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS.**

<i>AMINOACIDO</i>	<i>ABREVIATURA</i>	<i>SIMBOLO</i>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Acido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Acido Glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1	INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS.....	1
1.1	Valoración del sistema inmunológico en IDP	3
1.2	Clasificación de Inmunodeficiencias Primarias	7
1.2.1	Inmunodeficiencias combinadas de células T y células B.....	7
1.2.2	Inmunodeficiencias de anticuerpos	10
1.2.3	Otros síndromes con inmunodeficiencias bien definidos.....	13
1.2.4	Enfermedades de disregulación inmune.....	15
1.2.5	Inmunodeficiencias por defectos en la fagocitosis	16
1.2.6	Defectos en la inmunidad innata.....	19
1.2.7	Enfermedades autoinflamatorias	20
1.2.8	Deficiencias del complemento.....	21
1.3	Inmunodeficiencias combinadas.....	23
1.3.1	Deficiencia en adenosín deaminasa (ADA).....	23
1.3.1.1	Función y mecanismos patogénicos de la deficiencia en ADA	23
1.3.1.2	Organización molecular de ADA. Fenotipo y heterogeneidad genética.....	24
1.3.1.3	Tratamiento.....	25
1.4	Inmunodeficiencias de anticuerpos.....	27
1.4.1	Agammaglobulinemia ligada al X (XLA).....	27
1.4.1.1	Hallazgos clínicos, de laboratorio y presentación en el XLA.....	28
1.4.1.2	El gen BTK y el diagnóstico molecular del XLA	29
1.4.1.3	Terapia en el XLA.....	32
1.4.2	Síndrome de Hiper-IgM no ligado al X.....	33
1.4.2.1	Generación del repertorio de anticuerpos	33
1.4.2.2	Clasificación de los síndromes de Hiper IgM.....	35
1.4.2.3	Tratamiento y pronóstico.....	38
1.5	Defectos en la función fagocítica.....	39
1.5.1	Enfermedad Granulomatosa crónica.....	39
1.5.1.1	Defectos en la NADPH oxidasa	39
1.5.1.2	Tratamiento.....	42
1.6	Enfermedades de disregulación inmune	43
1.6.1	Síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS).....	43
1.6.1.1	Rasgos clínicos y diagnóstico.....	44
1.6.1.2	Tipos de ALPS	46
1.6.1.3	Apoptosis y homeostasis del linfocito.....	48
1.6.1.4	Estructura del gen TNFRF6, mutaciones y penetrancia de la enfermedad	51
1.6.1.4.1	Mutaciones más frecuentes y penetrancia.....	51
1.6.1.5	Rasgos anatomopatológicos	53
1.6.1.6	Tratamiento.....	53
2	CÉLULAS T	55
2.1	Estructura del receptor de la célula T (TCR).....	55
2.2	Moléculas accesorias de las células T	56
2.3	Maduración de la célula T.....	58

2.3.1	El timo en la maduración tímica.....	58
2.3.2	Estados de maduración de la célula T.....	59
2.3.3	Modelos teóricos de selección positiva.....	61
2.3.4	Silenciador del CD4.....	63
2.4	Células doble positivas (DP).....	64
OBJETIVOS.....		67
MATERIAL Y MÉTODOS		
1.	MUESTRAS Y LÍNEAS CELULARES.....	68
2.	DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS.....	68
2.1.	Dosificación de inmunoglobulinas.....	68
2.2.	Determinación de subclases de IgG e IgA.....	68
2.3.	Inmunofijación.....	69
3.	DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS.....	69
3.1.	Determinación de anticuerpos anti-nucleares por IFI sobre tejidos de rata.....	69
3.1.1.	Preparación de los tejidos.....	69
3.1.2.	Inmunofluorescencia indirecta sobre tejidos de rata.....	70
4.	CITOMETRÍA DE FLUJO.....	70
4.1.	Panel de anticuerpos utilizados.....	71
4.1.1.	Anticuerpos monoclonales utilizados en el diagnóstico.....	71
4.2.	Separación de células mononucleares de sangre periférica.....	72
4.3.	Preparación de las muestras.....	73
4.3.1.	Tinción directa (IFD).....	73
4.3.2.	Tinción indirecta (IFI).....	73
4.3.3.	Tinción intracelular.....	74
4.3.4.	Estudio del Repertorio TCR por citometría.....	75
5.	ESTUDIOS DE FUNCIÓN LINFOCITARIA.....	75
5.1.	Condiciones de cultivo estándar.....	75
5.2.	Estimulación con fitohematoglutina (PHA) e interleucina 2 (IL-2).....	75
5.3.	Estimulación con phorbol 12- myristate-13-acetate (PMA) e ionóforo.....	76
5.4.	Proliferación celular.....	76
5.5.	Cuantificación de la actividad respiratoria oxidativa.....	77
6.	ESTUDIO DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA. APOPTOSIS.....	78
6.1.	Inducción de apoptosis.....	78
6.2.	Tinción con anexina-V.....	79
6.3.	Viabilidad. Tinción Turk.....	79
7.	ESTUDIO DE PROTEÍNAS.....	80
7.1.	Obtención de los extractos celulares.....	80
7.2.	Cuantificación de la proteína.....	80
7.3.	Análisis por inmunoblot de la proteína Btk.....	80

INDICE

8. ESTUDIOS GENÉTICOS.....	81
8.1. Extracción de DNA	81
8.2. Extracción de RNA	82
8.2.1. Método Ultraspec.....	82
8.2.2. Kit de Extracción "Total RNA Isolation".....	82
8.3. Amplificación de secuencias.....	84
8.4. Síntesis de cDNA	85
8.4.1. Amplificación de cDNA	85
8.5. Detección del DNA amplificado.....	86
8.6. Enzimas de restricción.....	87
8.7. Secuenciación de un producto de PCR.....	87
8.8. Estudio de círculos de reordenamiento del TCR (TRECS)	89
8.9. Estudio de la clonalidad del TCR.....	89
9. ESTUDIO CITOGÉNÉTICO MEDIANTE CARIOTIPO ESPECTRAL (SKY)	90
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	90

RESULTADOS

1. ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA.....	93
1.1. Descripción del caso clínico.....	93
1.2. Parámetros inmunológicos	93
1.3. Resultado de la prueba funcional (NBT).....	94
1.4. Estudio genético.....	95
2. AGAMMAGLOBULINEMIA LIGADA AL X (XLA).....	98
2.1. Caso clínico.....	98
2.2. Parámetros inmunológicos	98
2.3. Estudio de la expresión de Btk mediante citometría de flujo	100
2.4. Estudio de la proteína <i>Btk</i>	100
2.5. Estudio genético.....	101
3. SÍNDROME DE HIPER-IGM NO LIGADO AL X.....	103
3.1. Descripción de los casos clínicos	103
3.2. Parámetros inmunológicos	103
3.3. Estudio de la expresión de CD40 ligando (CD40L) y CD40.	107
3.4. Proliferación celular	109
3.5. Estudio genético.....	109
3.5.1. Estudio de tipaje HLA	110
3.6. Estudio de sinovia	110
4. DEFICIENCIA EN ADENOSÍN DEAMINASA.....	112
4.1. Caso clínico.....	112
4.2. Parámetros inmunológicos	112
5. SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO AUTOINMUNE (ALPS).....	115
5.1. Descripción de los casos clínicos	115

5.2.	Estudio serológico, inmunoglobulinas y autoanticuerpos	120
5.3.	Análisis fenotípico de las poblaciones linfocitarias.....	121
5.4.	Inducción de la apoptosis	123
5.5.	Estudio genético.....	125
5.6.	Hallazgos anatomopatológicos	127
6.	LINFOPROLIFERACIÓN DP	130
6.1.	Descripción del caso clínico.....	130
6.2.	Evolución de poblaciones en sangre periférica y en lavado broncoalveolar (LBA) ...	132
6.3.	Fenotipo de la población en sangre periférica.....	134
6.3.1.	Niveles de expresión de CD4 y CD8 $\alpha\beta$ en las células CD3+CD4+CD8+	134
6.3.2.	Análisis de la expresión de las isoformas de CD45	136
6.4.	Marcadores generales de linaje celular	138
6.5.	Análisis de la expresión de moléculas de activación y de adhesión.....	140
6.6.	Análisis de moléculas coestimuladoras (CD28, CD80)	142
6.7.	Análisis de la expresión de CD103 en los linfocitos del paciente	143
6.8.	Estudio de la expresión de receptores de quimiocinas en linfocitos T DP.....	144
6.9.	Estudios funcionales	147
6.9.1.	Proliferación celular	147
6.9.2.	Expresión de CD40 ligando tras inducción con PMA e ionóforo	150
6.9.3.	Expresión de perforina.....	151
6.9.4.	Análisis de la inducción de apoptosis vía FAS.....	151
6.10.	Efecto de la prednisona en la viabilidad de células activadas con PHA.....	152
6.11.	Estudio del sistema inmune humoral. Otros parámetros inmunológicos	153
6.12.	Análisis de los niveles de círculos de reordenamiento del TCR (TRECS).....	153
6.13.	Estudio del repertorio V β y γ del TCR.....	154
6.14.	Estudio citogenético: Cariotipo espectral (SKY)	158
6.15.	Estudio genético.....	160

DISCUSIÓN

Enfermedad granulomatosa crónica (EGC)	164
Agammaglobulinemia ligada al X (XLA)	166
Hiper IgM no ligada al X.....	168
Déficit en adenosín deaminasa (ADA).....	171
Síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS)	172
Linfoproliferación doble positiva.....	175

CONCLUSIONES

Conclusiones.....	183
-------------------	-----

REFERENCIAS

Referencias	186
-------------------	-----

INDICE

INDICE DE FIGURAS

Figura I-1. Distribución de las principales categorías de IDP según el ESID.....	2
Figura I-2. Reacción catalizada por el enzima adenosín deaminasa.....	23
Figura I-3. Representación esquemática del desarrollo de los linfocitos B.....	27
Figura I-4. Representación esquemática de la proteína Btk y exones que codifican cada dominio.....	30
Figura I-5. Modelo esquemático de señalización intracelular de Btk.....	31
Figura I-6. Esquema del desarrollo del linaje de células B. HIGM.	33
Figura I-7. Representación esquemática de la actividad de AID	34
Figura I-8. Representación esquemática de las bases moleculares del HIGM.....	36
Figura I-9. Estructura del complejo NADPH oxidasa.....	40
Figura I-10. Complejo de señalización en apoptosis.....	50
Figura I-11. Dominios proteicos de Fas y estructura genómica del gen TNFRSF6.....	51
Figura I-12. Representación de mutaciones en el gen <i>TNFRSF6</i>	52
Figura I-13. Estructura del complejo TCR-CD3.....	55
Figura I-14. Esquema de selección tímica.....	59
Figura I-15. Esquema de maduración tímica.....	60
Figura I-16. Esquema del compromiso CD4 o CD8 según el modelo de señalización cinética	63
Figura 1.1. Cuantificación de la actividad NAPH-oxidasa por citometría de flujo.....	94
Figura 1.2. Esquema del gen <i>NCF1</i> y su pseudogen.....	95
Figura 1.3. Esquema de los dominios de la proteína <i>p47-phox</i>	96
Figura 1.4. Digestión del producto de PCR correspondiente al exón 2 del gen <i>NCF1</i>	97
Figura 2.1. Análisis de las poblaciones linfocitarias del paciente con XLA.....	98
Figura 2.2. Análisis de la proteína Btk mediante tinción intracelular.....	100
Figura 2.3. Western blot para la detección de proteína Btk.....	101
Figura 2.4. Esquema de los dominios y exones de BTK.....	101
Figura 3.1. Diagrama cronológico de la concentración sérica de los isotipos de Igs.....	104
Figura 3.2. Inmunofijación del suero.....	105
Figura 3.3. Análisis de la expresión de CD21 y CD20 en pacientes con HIGM.....	106
Figure 3.4. Fenotipo de las células B en pacientes con HIGM.....	106

Figura 3.5. Análisis de moléculas de activación HLA-DR, CD25 e ICOS en células T.....	107
Figura 3.6. Análisis de la expresión de CD40 ligando en linfocitos T CD4.....	108
Figura 3.7. Expresión de CD20 y CD40 en células B.....	108
Figura 3.8. Respuesta proliferativa frente a mitógenos de los pacientes con HIGM.....	109
Figura 3.9. Fluorescencia directa sobre sinovia del paciente P1.....	111
Figura 5.1. Árbol genealógico de las familias con sospecha de ALPS.....	118
Figura 5.2. Análisis de la población DN TCR $\alpha\beta$	122
Figura 5. 3. Análisis de la expresión Fas en las células CD3.....	123
Figura 5.4. Apoptosis <i>in vitro</i>	124
Figura 5.5. Diagrama de barras donde se indica el porcentaje de apoptosis.....	125
Figura. 5.6. Análisis molecular del exón 9 del gen <i>TNFRF6</i> en las familias A y B.....	126
Figura 5.7. Hallazgos patológicos en pacientes con ALPS.....	128
Figura 6.1. Placas tórax, TAC y biopsias del paciente con linfoproliferación DP.....	131
Figura 6.2. Diagrama cronológico de la evolución de las subpoblaciones T.....	132
Figura 6.3. Esquema de la distribución de poblaciones linfocitarias en sangre y en LBA.....	133
Figura 6.4. Identificación y cuantificación de la subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8....	134
Figura 6.5. Expresión de la molécula CD8 β en los linfocitos CD3.....	136
Figura 6.6. Expresión de CD45RO+ y CD45RA+ en linfocitos de sangre periférica.....	136
Figura 6.7. Expresión de CD45RO+ en las subpoblaciones de células T del paciente.....	137
Figura 6.8. Expresión de CD57, CD56, CD19 y CD27 en la población DP.....	138
Figura 6.9. Expresión de TcR $\alpha\beta$, TcR $\gamma\delta$, CD7 y CD2.....	139
Figura 6.10. Expresión de la molécula CD5 en linfocitos.....	139
Figura 6.11. Expresión de moléculas de adhesión linfocitaria CD18, CD11a y CD44.....	140
Figura 6.12. Expresión de CD69, CD25 y HLA-DR.....	141
Figura 6.13. Expresión de CD71 en linfocitos CD3.....	141
Figura 6.14. Expresión de HLA-DR y CD28 en linfocitos CD3.....	142
Figura 6.15. Expresión de moléculas coestimuladoras en linfocitos CD3.....	143
Figura 6.16. Expresión de CD103.....	144
Figura 6.17. Análisis de expresión de receptores quimiocinas y citoquinas.....	145
Figura 6.18. Análisis de expresión de CCR6, CCR4 y CXCR4.....	146
Figura 6.19. Ensayo de proliferación frente a estímulos mitogénicos.....	147

INDICE

Figura 6.20. Respuesta proliferativa frente a PHA y anti-CD3.....	148
Figura 6.21. Análisis mediante citometría de flujo de la unión a ConA y PHA.....	149
Figura 6.22. Gráfico del ensayo de proliferación con PHA y con PHA+IL2.....	149
Figura 6.23. Análisis de la expresión de CD40L.....	150
Figura 6.24. Expresión de perforina.....	151
Figura 6.25. Expresión de anexina-V.....	152
Figura 6.26. Porcentaje de apoptosis tras tratamiento <i>in vitro</i> con Prednisona.....	152
Figura 6.27. Niveles de TRECS en DSy en las células del paciente.....	154
Figura 6.28. Análisis de los reordenamientos génicos de la cadena β del TCR.....	156
Figura 6.29. Análisis Immunoscope.....	157
Figura 6.30. Análisis Landscape.....	158
Figura 6.31. Cariotipo espectral multicolor (SKY).....	159
Figura 6.32. Análisis molecular de la cadena alpha del TCR.....	160
Figura 6.33. Análisis de la zona reguladora del CD4.....	161
Figura D.1. Alineamiento de la secuencia peptídica correspondiente al exón 4 de Btk.....	167
Figura D.2. Alineamiento de la secuencia peptídica correspondiente al exón 9 de Fas en las familias A y B.....	173

INDICE DE TABLAS

Tabla I-1. Inmunodeficiencias severas combinadas (I).....	8
Tabla I-1. Inmunodeficiencias severas combinadas (II).....	9
Tabla I-2. Inmunodeficiencias de anticuerpos (I).....	11
Tabla I-2. Inmunodeficiencias de anticuerpos (II).....	12
Tabla I-3. Otros síndromes inmunodeficitarios bien definidos.	14
Tabla I-4. Enfermedades de disregulación inmunológica (I).....	15
Tabla I-4. Enfermedades de disregulación inmunológica (II).....	16
Tabla I-5. Defectos congénitos en el número, función de los fagocitos o ambos (I).....	17
Tabla I-5. Defectos congénitos en el número, función de los fagocitos o ambos (II).....	18
Tabla I-6. Defectos en la inmunidad innata.....	19
Tabla I-7. Enfermedades autoinflamatorias (I).....	20
Tabla I-7. Enfermedades autoinflamatorias (II).....	21

Tabla I-8. Deficiencias del complemento.....	22
Tabla I-9. Frecuencia de los defectos genéticos en HIGM.....	38
Tabla I-10. Frecuencia de los defectos genéticos en EGC.....	41
Tabla I-11. Criterios diagnósticos de ALPS.....	45
Tabla I-12. Fenotipo y base genética en ALPS.....	47
Tabla M.1. Valores de ref. de poblaciones linfocitarias e inmunoglobulinas según la edad.....	91
Tabla M.2. Anticuerpos monoclonales utilizados en citometría de flujo.....	71
Tabla M.3. Combinaciones utilizadas para estudiar los receptores de quimiocinas.....	72
Tabla M.4. Oligonucleótidos utilizados para amplificación y secuenciación de DNA genómico.....	84
Tabla M.5. Oligonucleótidos utilizados para amplificación de cDNA.....	86
Tabla 1.1. Recuento leucocitario, linfocitario y árbol genealógico en EGC.....	93
Tabla 2.1. IgS y distribución de subpoblaciones linfocitarias en paciente XLA.....	99
Tabla 3.1. Perfil de todos los isotipos y subclases de IgS en pacientes con HIGM.....	104
Tabla 3.2. Análisis de las poblaciones linfocitarias en pacientes con HIGM.....	105
Tabla 4.1. Determinación de la actividad enzimática de las enzimas ADA y PNP.....	113
Tabla 4.2. Tipaje HLA en Síndrome de ADA.....	113
Tabla 4.3. Cultivo Mixto linfocitario en Síndrome de ADA.....	114
Tabla 4.4. Análisis de poblaciones linfocitarias e inmunoglobulinas en Síndrome de ADA.....	114
Tabla 5.1. Características clínicas de los pacientes con sospecha de ALPS.....	116
Tabla 5.2. Dosificación de IgS, de C3, C4 y FR en pacientes con sospecha de ALPS.....	120
Tabla 5.3. Subpoblaciones linfocitarias en pacientes con sospecha de ALPS.....	121
Tabla 5.4. Tabla resumen de pacientes con ALPS.....	129
Tabla 6.1. MFI de los receptores CD3, CD4 y CD8	135
Tabla 6.2. Comparación del porcentaje y la MFI en células CD45RO.....	137
Tabla 6.3. Parámetros inmunológicos en paciente con linfoproliferación DP.....	153
Tabla 6.4. Porcentaje de células positivas para las familias V β del TCR.....	155
Tabla D.1. Fenotipo de poblaciones T-DP	178

INTRODUCCIÓN

1 *Inmunodeficiencias primarias*

El **Sistema Inmune** es el conjunto de células y moléculas responsables de la inmunidad, cuyo objetivo es proteger al organismo de agentes externos nocivos. Existen dos tipos de inmunidad: la innata y la específica. Se denomina **Inmunidad Innata** (también llamada natural) al conjunto de mecanismos que existen antes de la infección, responden rápidamente y de la misma manera frente a infecciones repetidas, formando así la primera línea de defensa de la respuesta inmune. En comparación con la Inmunidad Innata, la **Inmunidad Específica** (también denominada adquirida o adaptativa) desarrolla una respuesta específica para cada antígeno, amplificada y más eficaz contra infecciones repetidas del mismo microorganismo.

La integridad del sistema inmune es fundamental para la defensa contra organismos infecciosos y por lo tanto, para la supervivencia. Los defectos en uno o más componentes del sistema inmunitario pueden provocar enfermedades graves que se denominan inmunodeficiencias, las cuales son muy heterogéneas tanto clínica como etiológicamente. El término **Inmunodeficiencias** engloba todo un conjunto de entidades patológicas causadas por alteraciones cualitativas o cuantitativas de uno o más componentes específicos o inespecíficos del sistema inmune. Atendiendo a su causa, pueden clasificarse en dos grandes grupos, primarias o congénitas y secundarias o adquiridas. (Rosen et al. 1984).

Las **inmunodeficiencias primarias o congénitas** (IDP) constituyen un grupo de enfermedades de etiología diversa que tienen en común un defecto cualitativo o cuantitativo del sistema inmunitario a consecuencia del cual se alteran sus funciones, comprometiendo la defensa contra las agresiones externas.

El sistema inmune puede además verse afectado secundariamente por una variedad de condiciones patológicas (incluyendo neoplasias, infecciones, enfermedades metabólicas, malnutrición y respuesta a tratamientos) dando como resultado las **inmunodeficiencias secundarias o adquiridas**. Tanto las inmunodeficiencias primarias como las secundarias dan lugar a un espectro parecido de complicaciones, causando un incremento de la susceptibilidad a infecciones de variada gravedad por protozoos, bacterias, hongos y virus, así como a enfermedades autoinmunes y neoplasias. Dado que la relación entre la enfermedad y la inmunidad es interactiva, la infección también puede ser causa de una inmunodeficiencia (Rosen et al. 1995).

La **clasificación general de las IDP** que permite una comprensión del defecto causante se basa en la función de los elementos del sistema inmune comprometidos. La unión internacional de sociedades científicas de inmunología en IDP, la organización mundial de la salud (WHO) (World Health Organization) definió varias categorías de inmunodeficiencias primarias según la siguiente clasificación (Fudenberg et al. 1971):

1. Deficiencias celulares combinadas T y B
2. Defectos en la defensa del huésped, no específicas (fagocitos, complemento)
3. Defectos de la inmunidad humoral específica (linfocitos B, anticuerpos)

INTRODUCCIÓN

La última actualización de esta clasificación se extiende a las siguientes categorías (Notarangelo et al. 2006):

1. Inmunodeficiencias combinadas T y B
2. Deficiencias predominantemente de anticuerpos
3. Otros síndromes inmunodeficitarios bien definidos
4. Enfermedades de disregulación inmune
5. Defectos congénitos en el número de fagocitos, en su función o en ambos
6. Defectos en el sistema inmune innato
7. Enfermedades autoinflamatorias
8. Deficiencias del complemento

Se han descrito más de 120 IDP, muchas de las cuales son excepcionalmente infrecuentes y en la mayoría de los casos están asociadas con defectos genéticos (Rosen et al. 1984). El estudio de pacientes con IDP, los recientes avances en técnicas moleculares, en inmunobiología y en genética han dado lugar a la identificación y caracterización de más de 25 nuevas enfermedades genéticas del sistema inmune desde 1997. Identificándose en muchos casos los genes responsables, hecho que ha permitido que el diagnóstico y la terapia sean más específicos y efectivos (1999) (Notarangelo et al. 2006).

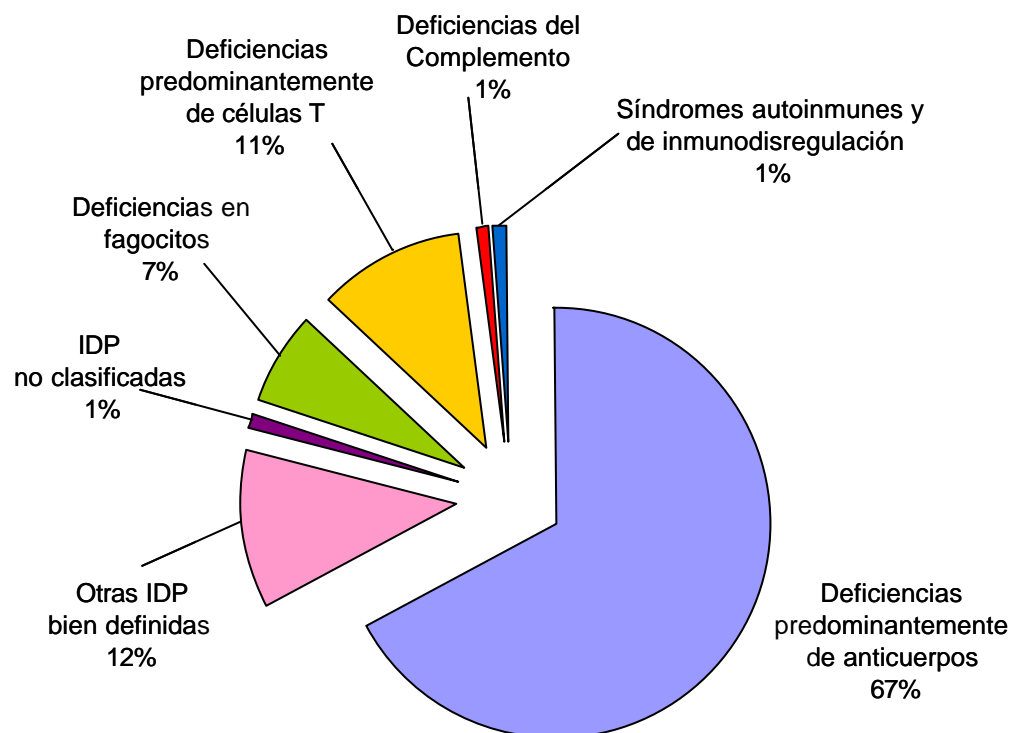


Figura I-1. Distribución de las principales categorías de IDP según el registro de la Sociedad Europea de IDP (ESID) www.esid.org/home.php.

Las IDP generalmente se producen por defectos genéticos que interfieren con el desarrollo de células o moléculas que participan en la respuesta inmune. Se presentan con escasa incidencia, destacándose el déficit selectivo de IgA como la más frecuente con una prevalencia de 1:500-700 personas. La incidencia de las demás IDP se encuentra en un rango de 1:10.000 a 1:200.000. Según los resultados del último registro (2004-2006) de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID), las IDP más comunes son las que involucran la inmunidad humoral y representan el 67%. Las IDP predominantemente de linfocitos T el 11%. Los defectos fagocíticos corresponden aproximadamente a un 7% y los defectos de complemento a un 1%. La distribución general se muestra en la **Figura I-1**. (Eades-Perner et al. 2007). La comparación de estos datos con el Registro Español de IDP (REDIP) presenta algunas diferencias, ya que el porcentaje de los defectos predominantemente de anticuerpos se eleva al 77%, seguido de las IDP bien definidas con un 8% y la deficiencias del complemento que se sitúan en el tercer lugar con un 5% (<http://web.hsd.es/redip/>).

1.1 Valoración del sistema inmunológico en IDP

El progreso en la inmunología clínica y molecular ha aumentado el conocimiento en las IDP, además de incrementar las opciones diagnósticas y de tratamiento para los pacientes afectados. Aunque muchas IDP pueden ser tratadas, el diagnóstico temprano es de primordial importancia.

Los principales candidatos para la evaluación del sistema inmune son:

- 1) Los niños nacidos de familias que ya han tenido algún miembro con IDP, con algún patrón de herencia conocido.
- 2) Pacientes con infecciones recurrentes o persistentes, que no responden apropiadamente a los antibióticos.
- 3) Niños que presenten retraso en el crecimiento, que sufran de diarrea y malabsorción.
- 4) Pacientes que desarrollen infecciones oportunistas, incluidos adultos con enfermedad pulmonar obstructiva, a menudo asociado con bronquiectasias.
- 5) Pacientes con infecciones recurrentes en la piel.
- 6) Niños con retraso en la caída del cordón umbilical o periodontitis.
- 7) Pacientes con infecciones recurrentes por *Neisseria*.
- 8) Niños con síntomas clínicos que incluyen una función anormal del sistema inmune, por ejemplo trombocitopenia, albinismo o ataxia telangiectasia (Lim et al. 1998).

La aproximación diagnóstica desde el punto de vista práctico, no sólo está influenciada por el criterio clínico sino también por la edad del paciente, el sexo, la raza y la posibilidad de consanguineidad. La evaluación molecular de cada paciente, además del diagnóstico permitirá la identificación de portadores y facilitará el diagnóstico prenatal. La historia familiar y la aparición de infecciones recurrentes son en la mayoría de los casos los datos iniciales que apuntan hacia un diagnóstico de inmunodeficiencia.

A continuación se describen los principales indicadores para el diagnóstico (Puck 1997):

INTRODUCCIÓN

*La **edad** de presentación de la enfermedad es un buen indicador para el diagnóstico. Muchas de las IDP presentan en el periodo perinatal y en la infancia. No obstante, otras enfermedades con mutaciones genéticas muestran su fenotipo a lo largo de la vida del individuo. Por lo que la historia clínica del paciente es útil en el diagnóstico, debiendo enfatizar en la edad de comienzo de los síntomas, la naturaleza, severidad y la etiología de las infecciones, los órganos implicados, la necesidad de antibióticos, la respuesta al tratamiento y la periodicidad de las infecciones, así como su carácter crónico o agudo.

*La identificación del **patógeno causal** de las infecciones recurrentes en muchos casos es la clave para conocer el tipo de defecto inmunológico. Las infecciones recurrentes que implican a las vías aéreas altas y bajas a menudo se asocian con deficiencias en células B. Ya que la protección frente a organismos Gram positivos y negativos depende de anticuerpos específicos que actúan como opsoninas. Por lo que en estos pacientes se empezará evaluando la función de la célula B y su habilidad en la producción de anticuerpos. Por otro lado, si el paciente presenta infecciones recurrentes debidas a bacterias encapsuladas, especialmente *Neisseria*, sugeriría el estudio del sistema del complemento. Neumonías de comienzo temprano por *Pneumocystis carini* son típicas en deficiencias de células T o del síndrome de Hiper-IgM ligado al X (XHIM). Infecciones recurrentes en la piel por *Staphilococos*, *Serratia marcescens*, o *Candida albicans* sugieren un defecto en los neutrófilos, así como infecciones por agentes inusuales como enterovirus pueden servir para diagnosticar Agammaglobulinemia ligada la cromosoma X (XLA).

*El **examen físico** puede ser totalmente negativo, por ejemplo en los pacientes con déficit del complemento o en varones con Síndrome linfoproliferativo ligado al X (XLP) antes de su exposición al virus de Epstein-Barr (EBV). En el caso de los pacientes con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) aparecen crónicamente enfermos, presentando un fallo en el crecimiento, irritabilidad, palidez. La piel está frecuentemente afectada con eritrodermia, eczema, piodermia o lesiones por hongos. La presencia de petequias y hematomas sugieren problemas de coagulación. La presencia de verrugas de duración prolongada por *Molluscum contagiosum*, o lesiones recurrentes inducidas por virus indicaría defectos en las células B. La alopecia o una escasa cantidad de pelo es un rasgo común en niños con SCID. Un albinismo parcial con infecciones recurrentes es típico del síndrome de Chediak-Higashi. El examen de la cavidad bucal puede dar muchas pistas: candidiasis al tratamiento sugiere un defecto en las células T o en los neutrófilos y puede implicar al esófago. Ulceras recurrentes en la boca puede indicar neutropenia cíclica o infección recurrente por *Herpes simple* y un defecto en las células T. Malformaciones congénitas cardíacas y de grandes vasos especialmente si está asociado con hipocalcemia en el nacimiento, es diagnóstico del síndrome de DiGeorge.

La ausencia de amígdalas está a menudo asociado con defectos en las células B. Tos persistente por la noche o a la hora de levantarse sugiere la presencia de enfermedad crónica pulmonar y bronquiectasias. Una periodontitis extensiva es el sello de defectos de adhesión de

leucocitos. Una tardía caída del cordón umbilical y una progresiva onfalitis asociado con neutrofilia sugiere un defecto en moléculas de adhesión.

Los ganglios linfáticos suelen ser pequeños o estar ausentes en pacientes con la enfermedad granulomatosa crónica (EGC). Abscesos en el hígado, linfadenopatía supurativa, hepato-esplenomegalia, y fístulas perirectales están a menudo también asociados con enfermedad granulomatosa crónica. Ataxia cerebelar progresiva, en asociación con telangiectasia implicando conjuntiva, cara y hombros son hallazgos clásicos de ataxia telangiectasia.

*El diagnóstico definitivo de una IDP depende finalmente de las evidencias del **diagnóstico de laboratorio**, ya que los hallazgos físicos pueden no ser específicos, discretos o ausentes (Tangsinmankong et al. 2001). Inicialmente deben realizarse análisis hematológicos y bioquímicos generales para descartar enfermedades infrecuentes de naturaleza no inmunológica, como la fibrosis quística.

Posteriormente, tienen que analizarse los rangos normales de linfocitos y de subpoblaciones, así como la determinación cuantitativa de las inmunoglobulinas en suero, ambos parámetros son edad dependiente. Respecto a los **niveles de inmunoglobulinas** la interpretación puede ser difícil y tiene que ser considerada la edad del paciente, la posibilidad de pérdida de proteínas o una terapia con inmunoglobulinas intravenosas (IVIG). En cambio los niveles de las subclases de inmunoglobulinas deben ser medidos solo en ciertas circunstancias, en pacientes con concentraciones normales o casi normales de IgG y con una deficiencia de anticuerpos demostrado, por ejemplo en respuestas anormales a antígenos polisacáridos y proteicos; en pacientes con una deficiencia selectiva de IgA o en la deficiencia de IgG2/IgG4; en adultos con sinusitis persistente e infecciones del tracto respiratorio alto que tienen niveles de inmunoglobulinas normales en suero, que pueden tener una pérdida selectiva de IgG2 o IgG3. De la misma forma, si no más importante es la valoración de la actividad específica de los anticuerpos. Por lo que ha de estudiarse la presencia de isohematoglutininas anti-A o anti-B. Más informativo es el uso de inmunización con antígenos para medir la cinética de respuesta específica de anticuerpos.

Una linfopenia persistente es característica en muchas IDP, por lo que hay que evaluar el **número absoluto de linfocitos y las subpoblaciones** tanto en porcentaje como en números absolutos. Un análisis estándar mediante citometría de flujo es muy útil para cuantificar células T, B y NKs así como las subpoblaciones de células T helper (CD4), T citotóxicas (CD8), proporción de TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, de células "naive" y memoria (CD45RA+ o CD45RO+), y para conocer su estado de activación (expresión de CD69, CD40 ligando, MHC de clase II). El número de células T (CD3) y la proporción de las poblaciones también depende de la edad, encontrándose incrementado en el nacimiento y la infancia y disminuyendo con la edad.

La respuesta *in vitro* de los linfocitos a mitógenos, incluyendo la fitohematoglutinina (PHA), el mitógeno pokeweed (PWN) y la concanavalina A (ConA), o el entrecruzamiento de moléculas de superficie de la célula T con anti-CD3 o anti-CD28 permite valorar la función de las células T. Un ensayo más sensible para medir la función de los linfocitos T en adultos y niños más mayores es la estimulación *in vitro* con antígenos específicos a los que el paciente ha sido previamente expuesto,

INTRODUCCIÓN

como por ejemplo el toxoide tetánico o antígenos de *Candida albicans*. El cultivo mixto linfocitario (CML) utilizando células con diferencias en el antígeno leucocitario humano (HLA) que pueden sustituir a antígenos específicos también puede dar idea de la buena funcionalidad de las células T.

Algunos autores han sugerido que los **criterios diagnósticos** pueden ser divididos en tres categorías: definitivo, probable y posible (Conley et al. 1999).

- Los pacientes que se incluyen en la categoría de diagnóstico **definitivo** tienen un 98% de probabilidad de que en 20 años mantengan su diagnóstico. La detección de mutaciones es el método más confiable para establecer el diagnóstico.

- Los pacientes que se incluyen en la categoría de **probable** son aquellos que teniendo todas las características clínicas y de laboratorio de una determinada patología no tienen documentada la alteración en el gen, en el ARNm o en la proteína reconocida como alterada en esa enfermedad. Se asume que ellos tienen una probabilidad mayor de 85% de mantener su diagnóstico durante 20 años.

- Los pacientes con un diagnóstico **posible** son los que reúnen algunas pero no todas las características clínicas o de laboratorio de una determinada enfermedad. El antecedente de la historia familiar puede ser de utilidad para realizar el diagnóstico de inmunodeficiencia, aunque aproximadamente el 50% de los casos de inmunodeficiencias ligadas al X documentadas por detección de la mutación, no tienen el antecedente familiar ya que éste correspondería a la primera manifestación de una nueva mutación.

Durante el diagnóstico de una IDP debe plantearse el diagnóstico diferencial con varias enfermedades que determinen una inmunodeficiencia secundaria, tales como:

- Tumores: Leucemia, linfoma y tumores sólidos.
- Terapia inmunosupresora secundaria a trasplante de órganos o quimioterapia oncológica, radioterapia.
- Enfermedades infecciosas como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), EBV, *Mycobacterium*, *Cryptococcus* entre otras.
- Uso prolongado de corticoides.
- Enfermedades inflamatorias sistémicas autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (LES), artritis idiopática juvenil, sarcoidosis entre otras.
- Terapia anticonvulsiva que ha sido asociada a deficiencia de inmunoglobulinas séricas.
- Reacciones adversas a drogas como es el caso de las sulfonamidas que pueden ocasionar mielosupresión.
- Patologías perdedoras de proteínas.
- Otras: Asplenia, síndrome de Down, diabetes mellitus, enfermedad hepática severa, insuficiencia renal crónica, desnutrición, síndrome alcohólico fetal y otros.

1.2 Clasificación de Inmunodeficiencias primarias

1.2.1 ***Inmunodeficiencias combinadas de células T y células B***

La **Inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID)**, es una inmunodeficiencia primaria causada por mutaciones en genes implicados en el desarrollo de las células T y/o de la célula B. La herencia puede ser autosómica recesiva o ligada al cromosoma X, aunque en el 70% de los niños con este defecto no se ha encontrado antecedentes en la historia familiar (Hague et al. 1994). En la **Tabla I-1** se detalla la última clasificación de los diferentes tipos de SCID publicada por la WHO donde se recogen los parámetros más frecuentemente alterados, así como su patogénesis, herencia y rasgos asociados

El SCID es fatal sin tratamiento y está caracterizado por la pérdida de función celular y humoral del sistema inmune. Casi todos los pacientes carecen o cuentan con una baja cantidad de células T, así como de su funcionalidad. El número de células B y NK varía dependiendo del defecto genético. Estos defectos llevan a una susceptibilidad extrema a infecciones, falta de desarrollo e hipogammaglobulinemia. En ocasiones pueden confundirse con el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) transmitido por la madre, debiéndose investigar por biología molecular la presencia de genoma viral (Buckley et al. 1997). Puede haber ausencia de sombra tímica y los órganos linfoides secundarios son hipoplásicos.

El síntoma más común en los niños con SCID es una cantidad excesiva de infecciones por patógenos oportunistas, que se manifiestan en los primeros meses de vida y son mucho más graves que en niños inmunocompetentes, en muchos casos poniendo en peligro la supervivencia del individuo. Entre estas se pueden incluir neumonía, meningitis o infecciones hematológicas. Una infección por *Pneumocystis carinii* que puede dar lugar a una neumonía mortal si no es diagnosticada a tiempo. También es peligroso el virus de la varicela cuando afecta órganos internos, el citomegalovirus (CMV), el virus Epstein-Barr (EBV), el virus respiratorio sincitial (RSV), el virus parainfluenzae, el herpes labial (*Herpes Simple tipo 1*), virus de la polio, rubéola, adenovirus y rotavirus.

Las infecciones por hongos son difíciles de erradicar en estos pacientes incluso con tratamiento, es el caso del muget (infección por candida en la boca). La diarrea persistente también es un problema común en estos niños llevando a una pérdida severa de peso y desnutrición. Es muy difícil en estos pacientes deshacerse de los organismos infectantes una vez se han establecido.

INTRODUCCIÓN

Tabla I-1. INMUNODEFICIENCIAS SEVERAS COMBINADAS (I)

Nombre	Igs séricas	Células B circulantes	Células T circulantes	Patogénesis	Herencia	Rasgos asociados
1,T-B+ SCID. Ligada al X deficiencia en γ c	Disminuidas	Normal o incrementadas	Marcadamente disminuidas	Mutaciones en la cadena gamma del receptor de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 y IL-21	Ligada al cromosoma X	Disminución marcada de células NK
1,T-B+ SCID. Autosómica recesiva	Disminuidas	Normal o incrementadas	Marcadamente disminuidas	Mutación en Jak-3	Autosómica recesiva	Disminución marcada de células NK
1,T-B+ SCID. Deficiencia en la cadena α de IL7R	Disminuidas	Normal o incrementadas	Marcadamente disminuidas	Mutaciones en el gen de la cadena α del IL7R	Autosómica recesiva	Células NK normales
1,T-B+ SCID. Deficiencia en CD45	Disminuidas	Normal	Marcadamente disminuidas	Mutaciones en el gen de CD45	Autosómica recesiva	Células T γ/δ normales
1, T-B+ SCID. Deficit en CD3 γ y CD3 ϵ	Disminuidas	Normal	Marcadamente disminuidas	Defectos en la transcripción de las cadenas CD3 γ y CD3 ϵ	Autosómica recesiva	Células NK normales
2,T-B- SCID. Deficiencia en RAG1/2	Disminuidas	Marcadamente disminuidas	Marcadamente disminuidas	Mutaciones en los genes RAG 1 o 2	Autosómica recesiva	Recombinación VDJ defectuosa.
2,T-B- SCID. Deficiencia en Artemis	Disminuidas	Disminuidas	Disminuidas	Deficiencia en la recombinación VDJ	Autosómica recesiva	Recombinación VDJ defectuosa. Sensibilidad a la radiación
2,T-B- SCID. Deficiencia Adenosin deaminasa (ADA)	Disminuidas	Disminución progresiva	Disminución progresiva	Defectos en células T y B por metabolitos tóxicos	Autosómica recesiva	
2,T-B- SCID. Disgenesia reticular	Disminuidas	Marcadamente disminuidas	Marcadamente disminuidas	Maduración defectuosa de células T, B y células mieloides	Autosómica recesiva	Granulocitopenia; trombopenia

Continua -->

Las **vacunas** con virus atenuados vivos como la vacuna oral del poliovirus, la tuberculosis, rubéola, varicela y muchos otros pueden causar infecciones graves o fatales y deben ser evitadas en pacientes con SCID. Se les puede dar vacunas muertas o inactivadas como la del poliovirus, difteria, tétano toxoide y pertusis, aunque es improbable que estos niños produzcan anticuerpos específicos por su defecto inmunológico.

Algunos niños pueden tener una complicación provocada por los linfocitos T de la madre, que entra en la circulación del niño a través de la placenta antes del nacimiento. Esta reacción se denomina enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD) y toma gran variedad de formas, aunque la más común provoca una erupción que puede ser confundida con un eczema.

Tabla I-1. INMUNODEFICIENCIAS SEVERAS COMBINADAS (II)

Nombre	Igs séricas	Células B circulantes	Células T circulantes	Patogénesis	Herencia	Rasgos asociados
Síndrome de Omenn	Disminuidas pero con aumento de IgE	Normal o disminuidas	Presentes: heterogeneidad restrictiva	Mutaciones sin sentido en los genes de RAG1 y 2	Autosómica recesiva	Eritroderma; Eosinofilia; hepatoesplenomegalia
DNA ligasa IV	Disminuidas	Disminuidas	Disminuidas	Defecto en la DNA ligasa IV.	Autosómica recesiva	Microcefalia, distrofia facial y sensibilidad a la radiación.
Síndrome de hiper-IgM ligado al X	IgM incrementada o normal; Disminuidos el resto de isotipos	Células B memoria IgM o IgD presentes, el resto ausentes	Normal	Mutaciones en el gen de CD40 ligando	Ligada al cromosoma X	Neutropenia; Trombocitopenia; A. hemolítica; implicación hepática y gastrointestinal; infecciones oportunistas
Deficiencia en CD40	IgM incrementada o normal; Disminuidos el resto de isotipos	Células B memoria IgM o IgD presentes, el resto ausentes	Normal	Mutaciones en el gen de CD40	Autosómica recesiva	Neutropenia
Deficiencia en purina nucleosido fosforilasa (PNP)	Normal o disminuido	Normal	Progresivamente disminuido	Defectos en células T por metabolitos tóxicos	Autosómica recesiva	Anemia hemolítica autoinmune; síntomas neurologicos
Deficiencia en clase II	Normal o disminuido	Normal	Normal, disminuido el número de cl. CD4	Mutaciones en factores de transcripción para moléculas de clase II	Autosómica recesiva	
Deficiencia en la cadena γ del CD3	Normal	Normal	Normal (reducida expresión de TCR)	Defecto en la cadena gamma del CD3	Autosómica recesiva	
Deficiencia en CD8	Normal	Normal	Ausencia de células CD8	Mutaciones en la cadena alfa de CD8	Autosómica recesiva	
Deficiencia en ZAP-70	Normal	Normal	Disminuidas las CD8, normales las CD4	Mutaciones en el gen de la quinasa ZAP-70	Autosómica recesiva	
Deficiencia en TAP-1	Normal	Normal	Disminuidas las CD8, normales las CD4	Mutaciones en TAP-1 y TAP-2	Autosómica recesiva	Deficiencia en MHC de clase I
Deficiencia Winged Helix Nude (WHN)	Disminuidas	Normal	Marcadamente disminuidas	Mutaciones en el gen WHN	Autosómica recesiva	Alopecia, epitelio tímico anormal

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico se sospecha primero usualmente en niños con los síntomas mencionados. Sin embargo, el historial de la familia, el número de linfocitos totales en sangre periférica, el estudio de las subpoblaciones linfocitarias (tanto el número como su funcionalidad) normalmente disminuida, así como los niveles de inmunoglobulinas generalmente bajos son parámetros importantes a la hora de generar el diagnóstico. Sin un diagnóstico y tratamiento temprano, los niños con SCID mueren durante el primer año de vida.

La **terapia** más exitosa para el SCID es la reconstitución inmune por medio de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Aunque la terapia de reemplazo de inmunoglobulinas intravenosa (IVIG) debe ser administrada a niños con SCID, esta no restaurará la función de los linfocitos T defectuosos, si reemplaza los anticuerpos ausentes que resultan del defecto de linfocitos B y es por tanto beneficiosa. Por último, otro tratamiento que ha sido utilizado en SCID es la terapia génica, siendo la deficiencia de Adenosin deaminasa (ADA), el primer tipo de SCID al cual se aplicó.

1.2.2 ***Inmunodeficiencias de anticuerpos***

Los defectos moleculares en este grupo de IDP son muy heterogéneos pudiendo afectar a cualquier elemento de la respuesta humoral, dando lugar a una falta cuantitativa y/o cualitativa de la producción de anticuerpos (Chapel et al. 2003). Puede implicar únicamente a la producción de un isotipo de inmunoglobulina (por ejemplo en el déficit selectivo de IgA), a la producción de varios (como la IgA e IgG en el Síndrome de Hiper IgM) o a todas las clases de inmunoglobulinas (en el XLA). La clasificación de las inmunodeficiencias de anticuerpos se muestra en la **Tabla I-2**.

En los diferentes déficits de anticuerpos, la anomalía básica puede encontrarse en diferentes estadios de maduración de la célula B o en las respuestas de las células B maduras a la estimulación antigénica. Una alteración de la función de la célula T cooperadora también puede dar un defecto en la producción de anticuerpos.

Los pacientes con deficiencias en anticuerpos sufren gran variedad de infecciones en el tracto respiratorio y gastrointestinal. La severidad de las infecciones refleja el grado de disfunción inmunológica. Los patógenos que más frecuentemente infectan a individuos con déficit de inmunoglobulinas son bacterias encapsuladas como *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*; estos organismos causan enfermedades como otitis, sinusitis, neumonía, meningitis, osteomielitis, artritis séptica y sepsis. Aunque pacientes con este tipo de déficit son también susceptibles a tener infecciones víricas, incluyendo echovirus, enterovirus y hepatitis C (con una alta prevalencia en individuos con déficit de IgA) y a ciertos parásitos como *Giardia lamblia*. Los pacientes con hipogammaglobulinemia tienen alta susceptibilidad a padecer infecciones sistémicas por *Mycoplasma* (Bonilla et al. 2003).

Las deficiencias de anticuerpos son las más frecuentes dentro de las inmunodeficiencias específicas, las menos graves y las que mejor responden al tratamiento. Son tratadas con IVIG con el objetivo de prevenir las infecciones.

Tabla I-2. INMUNODEFICIENCIAS DE ANTICUERPOS (I)

Nombre	Igs séricas	Células B circulantes	Patogénesis	Herencia	rasgos asociados
1. Severa reducción en todos los isotipos de inmunoglobulinas con células B ausentes					
Agammaglobulinemia ligada al X	Todos los isotipos disminuidos	Disminuidas profundamente	Mutaciones en <i>btk</i>	Ligada al cromosoma X	Infecciones bacterianas severas
Deficiencia de la cadena pesada μ	Todos los isotipos disminuidos	Ausentes	Mutaciones en genes de μ	Autosómica recesiva	Infecciones bacterianas severas
Deficiencia en lamda 5	Todos los isotipos disminuidos	Ausentes	Mutaciones en lambda 5	Autosómica recesiva	Infecciones bacterianas severas
Deficiencia en $Ig\alpha$	Todos los isotipos disminuidos	Ausentes	Mutaciones en $Ig\alpha$	Autosómica recesiva	Infecciones bacterianas severas
Deficiencia en BLNK	Todos los isotipos disminuidos	Disminuidas profundamente	Mutaciones en BLNK	Autosómica recesiva	Infecciones bacterianas severas
Inmunodeficiencia con timoma	Todos los isotipos disminuidos	Disminuidas profundamente	Desconocido		Infecciones bacterianas severas
2. Severa reducción de al menos dos isotipos de inmunoglobulinas con un número normal o reducido de células B					
Inmunodeficiencia común variable	Disminuida IgG e IgA; IgM normal	normal o disminuidas	Desconocido	Variable	Puede tener enfermedad autoinmune, linfoproliferativa y/o granulomatosa
Deficiencia en ICOS	Disminuida IgG e IgA; IgM normal	normal o disminuidas	Mutaciones en ICOS	Autosómica recesiva	Infecciones bacterianas recurrentes
Deficiencia en CD19	Disminuida IgG e IgA; IgM normal	normal o disminuidas	Mutaciones en CD19	Autosómica recesiva	Infecciones bacterianas recurrentes
Deficiencia en TACI	Disminuida IgG e IgA; IgM normal	normal	Mutaciones en TACI	Autosómica dominante o recesiva	Puede tener enfermedad autoinmune, linfoproliferativa y/o granulomatosa
Deficiencia en el receptor BAFF	Disminuida IgG e IgA; IgM normal	normal	Mutaciones en el receptor BAFF	Autosómica recesiva	Infecciones bacterianas recurrentes

Continúa -->

Tabla I-2. INMUNODEFICIENCIAS DE ANTICUERPOS (II)

Nombre	Igs séricas	Células B circulantes	Patogénesis	Herencia	rasgos asociados
3. Severa reducción de IgG e IgA con incremento de IgM y un número normal de células B					
Deficiencia en AID	Disminuida IgG e IgA; IgM aumentada	normal	Mutaciones en AICDA	Autosómica recesiva	Aumento de ganglios linfáticos y centros germinales
Deficiencia en UNG	Disminuida IgG e IgA; IgM aumentada	normal	Mutaciones en UNG	Autosómica recesiva	Aumento de ganglios linfáticos y centros germinales
4. Deficiencias en cadenas ligeras o isotipo con un número normal de células B					
Deleciones en el gen de la cadena pesada de Igs	IgG1, IgG2, IgG4 ausentes; IgE e IgA1 o IgA2 en algunos casos	Normal o disminuido	Deleción cromosómica en 14q32	Autosómica recesiva	No siempre sintomático
Deficiencia en cadena Kappa	IgK disminuida: respuesta de anticuerpos normal o disminuida	normal o disminuidas células con Kappa	En algunos pacientes mutaciones puntuales en el cromosoma 2p11	Autosómica recesiva	
Deficiencia de Subclases de IgG	Disminución en uno o más isotipos de IgG. Disminución de IgA1 e IgA2.	Normal o inmaduras	Defectos en la diferenciación del isotipo	Desconocido	
Deficiencia de IgA	Disminución de IgA1 e IgA2.	normal o disminuida sIgA+	Fallo en la diferenciación terminal de las células B IgA+	Variable	Desordenes alérgicos y autoinmunes; algunas infecciones
5. Deficiencia específica de anticuerpos con Igs y células B normales	Normal	Normal	Desconocido	Desconocido	Defecto selectivo para hacer anticuerpos específicos
6. Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia	Disminución de IgG e IgA	Normal	Defecto en la diferenciación	Desconocido	Frecuente en familias con otras ID

1.2.3 **Otros síndromes con inmunodeficiencias bien definidos**

Pertenece a este grupo diversos síndromes en los cuales la inmunodeficiencia constituye un importante componente del mismo. Se detalla su clasificación en la **Tabla I-3**. Entre ellos se encuentra el **Síndrome de Wiskott Aldrich (WAS)** que es una enfermedad de herencia recesiva ligada al cromosoma X, el cual se manifiesta por la clásica tríada de eccema, infecciones recurrentes y alteraciones en la morfología o número de las plaquetas. El defecto molecular responsable corresponde a alteraciones en la proteína WASP (Wiskott Aldrich Syndrome Protein), proteína que interviene en la regulación del citoesqueleto afectando a diversas funciones linfocitarias y plaquetarias (Stewart et al. 2001).

Dentro de los defectos en la reparación del DNA está la **Ataxia-telangiectasia (A-T)** que es una enfermedad de transmisión autosómica recesiva caracterizada por presentar ataxia cerebelosa, telangiectasias oculo-cutáneas e infecciones recurrentes. Estas últimas afectan por lo general al árbol respiratorio en forma de otitis, bronquitis purulentas o neumonías. El gen denominado ATM (ataxia telangiectasia mutations) codifica para una proteína que interviene en diferentes eventos intracelulares que participan en el control del ciclo celular. El Síndrome de Nijmegen es similar a A-T, tiene inmunodeficiencia y sensibilidad a las radiaciones, así como mayor riesgo a padecer enfermedades malignas. Este desorden está asociado con pequeña estatura, microcefalia, retardo mental. El gen que se encuentra alterado es *NBS1* (p95 o fibrina) y forma parte del complejo de reparación de roturas del DNA (Wu et al. 2000).

Entre ellos también están defectos que generan una disfunción en las células T como es el **Síndrome de DiGeorge**, asociado con una alteración en el desarrollo de la tercera y cuarta bolsas faríngeas durante la embriogénesis. Las manifestaciones clínicas presentes este síndrome son aplasia tímica, hipocalcemia, hipoparatiroidismo, tetania, un desarrollo anormal de los grandes vasos y deformidad facial. Estos pacientes muestran deleciones o microdeleciones de la secuencia del ADN en la región 22q11.2. En modelos murinos se ha identificado dentro de esta región el gen *TBX1* que codifica para un factor de transcripción con un dominio "T-box" de unión a DNA. En algunos pacientes con este Síndrome se han identificado mutaciones puntuales en este gen, confirmando la importancia del gen humano *TBX1* en el Síndrome de DiGeorge (Yagi et al. 2003). El diagnóstico de esta alteración se realiza por medio de hibridación *in situ* con lectura fluorescente por microscopía óptica (FISH) utilizando sondas específicas (Sullivan 2001).

A este grupo también pertenecen displasias inmuno-óseas, el Síndrome de Hiper IgE y la Candidiasis mucocutánea crónica.

Tabla I-3. OTROS SINDROMES INMUNODEFICITARIOS BIEN DEFINIDOS

Nombre	Igs séricas y Anticuerpos	Células B circulantes	Células T circulantes	Defecto genético / Patogénesis	Herencia	rasgos asociados
1. Síndrome de Wiskott-Aldrich	IgM disminuida; Anticuerpos anti polisacáridos disminuidos; IgA e IgE incrementadas	Normal	Disminución progresiva	Mutaciones en el gen WASP; Defectos en el citoesqueleto que afectan a derivados de célula madre hematopoyéticas	Ligada al cromosoma X	Trombocitopenia; eczema, linfomas, enfermedad autoinmune,
2. Defectos en la reparación del DNA						
a) Ataxia-telangiectasia	A menudo disminución de IgA, IgE y subclases de IgG. Incremento de monómeros de IgM. Anticuerpos disminuidos	Normal	Disminuidas	Mutaciones en el gen A-T (ATM). Desorden en el ciclo celular que lleva a una inestabilidad cromosómica	Autosómica recesiva	Ataxia; Telangiectasia; incremento de la alpha fetoproteína; aumentada sensibilidad a los rayos X
b) Síndrome Ataxia-like	A menudo disminución de IgA, IgE y subclases de IgG. Incremento de monómeros de IgM. Anticuerpos disminuidos	Normal	Disminuidas	Mutaciones en Mre 11	Autosómica recesiva	Ataxia moderada, radiosensibilidad incrementada severamente
c) Síndrome de Nijmegen	A menudo disminución de IgA, IgE y subclases de IgG. Incremento de monómeros de IgM. Anticuerpos disminuidos	Normal	Disminuidas	Defecto en NBS1 (nibrina). Desorden en el ciclo celular y en la reparación del DNA	Autosómica recesiva	Microcefalia; linfomas. Sensibilidad a la radiación ionizante. Inestabilidad cromosómica
d) Síndrome Bloom	Reducidas	Normal	Normal	Mutaciones en Helicasa	Autosómica recesiva	Inestabilidad cromosómica, fallo medular, leucemia, linfoma, corta estatura, sensibilidad al sol, telangiectasias
3. Defectos tímicos. Síndrome de DiGeorge	Normales o disminuidas	Normal	Normales o disminuidas	Defecto en gen contiguo que afecta al 90% del desarrollo tímico	Defecto de novo o Autosómico recesivo	Hipoparatiroidismo, malformación conotruncal; facies anormales; Monosomía parcial de 22q11-pter
4. Displasias inmuno-oseas						
a) Hipoplasia pelo cartílago	Normales o disminuidas	Normal	Disminuidas o normales	Mutaciones en RMRP	Autosómica recesiva	Anemia, neutropenia, susceptibilidad a cancer, espermatogénesis impedida
b) Síndrome Schimke	Normal	Normal	Disminuidas	Mutaciones en SMARCAL1	Autosómica recesiva	Estatura corta, displasia espondilofsea, retardo intrauterino, nefropatía
5. Síndrome Hermansky-Pudlak tipo 2	Normal	Normal	Normal	Mutaciones en AP3B1	Autosómica recesiva	Albinismo oculo-cutáneo, neutropenia, actividad citotóxica defectuosa de células T y NK
6. Síndrome de Hiper-IgE	IgE elevada	Normal	Normal	Desconocidas	Autosómica recesiva	Candidiasis, asimetría facial, osteoporosis, escoliosis
7. Candidiasis mucocutánea crónica	Normal	Normal	Normal	Desconocidas	AD, AR y esporádica	Candidiasis mucocutánea crónica, hipersensibilidad a antígenos de candida disminuida

1.2.4 **Enfermedades de disregulación inmune**

Pertencen a este grupo síndromes en los cuales la inmunodeficiencia constituye un componente del mismo, como los defectos en los lisosomas en el Síndrome de Chediak-Higashi y el Síndrome de Griscelli (**Tabla I-4**). También se encuentra la clasificación de las diferentes causas genéticas del Síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS) y la enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X (XLP). Durante los últimos años, el análisis de poliendocrinopatía autoinmune y displasia ectodérmica (APECED) y de la inmunodisregulación-poliendocrinopatía-enteropatía ligada al X (IPEX), ha permitido la identificación del regulador autoinmune (AIRE) y de FOXP3, reguladores esenciales de la transcripción (Notarangelo et al. 2006).

Tabla I-4. ENFERMEDADES DE DISREGULACIÓN INMUNOLÓGICA (I)

Nombre	Igs séricas y Anticuerpos	Células B circulantes	Células T circulantes	Patogénesis	Herencia	rasgos asociados
1. Inmunodeficiencia con hipopigmentación						
Inmunodeficiencia con albinismo. Síndrome de Chediak Higashi	Normal	Normal	Normal	Defecto en <i>Lyst</i>	Autosómica recesiva	Albinismo; racción de fase aguda; Nks bajas. Lisosomas gigantes
Inmunodeficiencia con albinismo. Síndrome de Griscelli	Normal	Normal	Normal	Defecto en Miosina 5a, o RAB27A	Autosómica recesiva	Albinismo; racción de fase aguda; Nks bajas. Lisosomas gigantes
2. Síndromes de linfohistiocitosis hemofagocítica familiar						
Deficiencia en perforina	Normal	Normal	Normal	Defecto en <i>PRF1</i>	Autosómica recesiva	Inflamación severa, fiebre, disminución de actividades NK y citolítica
Deficiencia en Munc 13-D	Normal	Normal	Normal	Defecto en <i>MUNC13D</i>	Autosómica recesiva	Inflamación severa, fiebre, disminución de actividades NK y citolítica
Deficiencia en syntaxin 11	Normal	Normal	Normal	Defecto en <i>STX11</i>	Autosómica recesiva	Inflamación severa, fiebre, disminución de actividades NK y citolítica
3. Síndrome linfoproliferativo ligado al X						
	Normal o ligera hipogammaglobulinemia	Normal o reducidas	Normal	Defecto en SAP/SH2DRA	Ligada al cromosoma X	Manifestaciones clínicas e inmunológicas inducidas por infección de EBV; infección, hepatitis, anemia aplásica, linfomas
4. Síndromes con autoinmunidad						
a) Síndrome linfoproliferativo autoinmune						
Defectos en CD95 (Fas), tipo 1a	Normal o incrementadas	Normal	Normal, incremento de dobles negativas (CD4-CD8-)	Defectos en <i>TNFRSF6</i>	Autosómica dominante (infrecuentes casos de AR)	Apoptosis defectuosa, esplenomegalia/adenopatía, citopenias autoinmunes, incremento al riesgo de linfoma
Defectos en CD95L (Fas ligand), tipo 1b	Normal	Normal	Normal, incremento de dobles negativas (CD4-CD8-)	Defectos en el ligando de <i>TNFRSF6</i>	Autosómica dominante	Apoptosis defectuosa, esplenomegalia/adenopatía, citopenias autoinmunes, incremento al riesgo de linfoma

Continúa -->

Tabla I-4. ENFERMEDADES DE DISREGULACIÓN INMUNOLÓGICA (II)

Nombre	Igs séricas y Anticuerpos	Células B circulantes	Células T circulantes	Patogénesis	Herencia	rasgos asociados
Defectos en Caspasa 10, tipo 2a	Normal	Normal	Normal, incremento de dobles negativas (CD4-CD8-)	Defectos en <i>CASP10</i>	Autosómica dominante	Apoptosis defectuosa, esplenomegalia/adenopatía, citopenias autoinmunes, incremento al riesgo de linfoma
Defectos en Caspasa 8, tipo 2b	Normal o disminuidas	Normal	Normal, incremento de dobles negativas (CD4-CD8-)	Defectos en <i>CASP8</i>	Autosómica dominante	Apoptosis defectuosa, esplenomegalia/adenopatía, citopenias autoinmunes, incremento al riesgo de linfoma
b) Poliendocrinopatía autoinmune y displasia ectodérmica						
Poliendocrinopatía autoinmune y displasia ectodérmica	Normal	Normal	Normal, incremento de células CD4+	Mutación en <i>AIRE</i>	Autosómica recesiva	Enfermedad autoinmune de paratiroides y otros órganos, candidiasis crónica mucocutánea y otras anomalías
c) Disregulación inmunológica, poliendocrinopatía, enteropatía, Síndrome ligado al X						
Disregulación inmunológica, poliendocrinopatía, enteropatía, Síndrome ligado al X (IPEX)	Normal o incrementadas	Normal	Normal	Mutación en <i>FOXP3</i>	Ligada al cromosoma X	Diarrea autoinmune, diabetes con debut temprano, tiroiditis, anemia hemolítica, trombocitopenia y eccema

1.2.5 **Immunodeficiencias por defectos en el número, función de los fagocitos o ambos**

La inmunidad innata está mediada principalmente por los fagocitos y sistema del complemento, ambos constituyen la primera línea de defensa frente a organismos infecciosos y participan activamente en las fases efectoras de la inmunidad específica. Además de la neutropenia congénita existen defectos hereditarios que afectan la función de los neutrófilos. La función de los fagocitos depende de su movimiento en respuesta a estímulos quimiotácticos, de su capacidad de adhesión, de endocitosis, de su capacidad microbicida y de eliminación de partículas ingeridas. La movilidad depende de la integridad del citoesqueleto y del sistema contráctil. El proceso de endocitosis depende de la expresión de determinados receptores de membrana, así como de la fluidez de esta. Muchos de los defectos presentes en los fagocitos llevan casi invariablemente a infecciones agudas severas recurrentes, que en algunos casos pueden llegar a ser mortales para el paciente (Rosenzweig et al. 2004). En la **Tabla I-5** se muestra la clasificación de las inmunodeficiencias con defectos en la fagocitosis.

En la EGC existe un defecto de la capacidad de generar la muerte intracelular de los microorganismos fagocitados al no producirse intermediarios reactivos del oxígeno. Resultando en una mayor susceptibilidad a infecciones, con formación de granulomas compuestos por macrófagos activados. Su herencia puede ser autosómica recesiva o ligada al cromosoma X.

Más frecuentes son los defectos de moléculas de adhesión de los leucocitos (LAD-1). Son debidos a la biosíntesis anormal de la cadena β_2 (CD18) común para el receptor del iC3b, el receptor del C3dg denominado p150/95 y la molécula de adhesión de los fagocitos y de linfocitos T, LFA-1. Se hereda de forma autosómica recesiva y su expresión fenotípica es variable, pudiendo expresar desde el 1% de las moléculas de adhesión normales (casos severos) hasta el 10% (fenotipo moderado). Estos enfermos tienen con frecuencia infecciones en la piel, periodontitis y fistulas perianales o intestinales. El déficit de adhesión de leucocitos tipos 2 (LAD-2) se debe a la ausencia del sialil-Lewis X, el ligando de las selectinas. Este tipo de defectos habitualmente se tratan con TPH.

Tabla I-5. DEFECTOS CONGÉNITOS EN EL NÚMERO, FUNCIÓN DE LOS FAGOCITOS O AMBOS (I)

Nombre	Células afectadas	Defectos funcionales	Defectos genéticas	Herencia	rasgos asociados
1.-3. Neutropenias severas congénitas					
	Neutrófilos	Diferenciación mieloide	Elastasa 2	Autosómica dominante	Subgrupo con mielodisplasia
	Neutrófilos	Diferenciación mieloide	GFI1	Autosómica dominante	Linfopenia T/B
	Neutrófilos	Diferenciación mieloide	G-CSF	Autosómica dominante	Neutropenia refractaria a GCSF
4. Neutropenia severa congénita (Kostmann)	Neutrófilos	Diferenciación mieloide	Desconocido	Autosómica dominante	Subgrupo con mielodisplasia
5. Neutropenia cíclica	Principalmente neutrófilos	?	Elastasa 2	Autosómica dominante	Oscilaciones de otros leucocitos, reticulocitos y plaquetas
6. Neutropenia ligada al X	Neutrófilos; monocito/macrófagos	?	WASP	Ligada al cromosoma X	Monocitopenia
7. Defecto de adhesión leucocitaria 1	Neutrófilos; monocito/macrófagos; linfocitos y NKs	Quimiotaxis, adherencia, endocitosis	CD18 (LFA-1, Mac 1, p 150,95)	Autosómica recesiva	Tardía caída del cordón umbilical; úlceras en la piel, periodontitis, leucocitosis, citotoxicidad defectuosa de células T y NKs.
8. Defecto de adhesión leucocitaria 2	Principalmente neutrófilos y monocito/macrófagos	Quimiotaxis y rolling	transportador de GDP-fucosa	Autosómica recesiva	Cicatrización tardía, úlceras crónicas en la piel, periodontitis, leucocitosis, grupo sanguíneo bombay y retraso mental.
9. Defecto de adhesión leucocitaria 3	Neutrófilos; monocito/macrófagos; linfocitos y NKs	Adherencia	Defecto en Rap1-	Autosómica recesiva	Similares a las de LAD2 más tendencia a hemorragias
10. Defecto en la GTPasa Rac-2	Neutrófilos	Quimiotaxis, adherencia	GTPasa Rac2	Autosómica dominante	Cicatrización tardía, leucocitosis

Continúa -->

Tabla I-5. DEFECTOS CONGÉNITOS EN EL NÚMERO, FUNCIÓN DE LOS FAGOCITOS O AMBOS (II)

Nombre	Células afectadas	Defectos funcionales	Defectos genéticas	Herencia	rasgos asociados
11. Deficiencia en la B-actina	Neutrófilos; monocito/macrófagos	Movilidad	ACTB, actina citoplasmática	Autosómica dominante	Retardo mental y corta estatura
12. Periodontitis localizada juvenil	Neutrófilos	Quimiotaxis inducida por péptido formil	Receptor del péptido formil	Autosómica recesiva	Periodontitis
13. Síndrome de Papillon-Lefevre	Neutrófilos; monocito/macrófagos	Quimiotaxis	CTSC, cathepsina C	Autosómica recesiva	Periodontitis, hiperqueratosis palmoplantar
14. Defecto granulo específico	Neutrófilos	Qimiotaxis	CCAAT/enhancer binding protein e	Autosómico recesivo	Neutrófilos con núcleo bilobulado
15. Síndrome de Shwachman-Diamond	Neutrófilos	Quimiotaxis	Desconocido	Autosómico recesivo	Pancitopenia, insuficiencia pancreatica, condrodisplasia
16. Enfermedad granulomatosa crónica ligada al X	Neutrófilos; monocito/macrófagos	Falta de producción de metabolitos del superóxido	gp91 phox	Ligada al cromosoma X	Fenotipo McLeod
17. Enfermedad granulomatosa crónica autosómica	Neutrófilos; monocito/macrófagos	Falta de producción de metabolitos del superóxido	p22 phox; p47phox; p67phox.	Autosómica recesiva	
18. Defecto en G-6PD del neutrófilo	Neutrófilos; monocito/macrófagos	Killing	Glucosa-6-P-deshidrogenasa	Ligada al cromosoma X	Anemia hemolítica
19. Deficiencia en la cadena B de los receptores de IL-12 y IL-23.	Linfocitos y células NKs	Fallo en la secreción de IFN- γ	IL-12RB1	Autosómica recesiva	Susceptibilidad a micobacterias y salmonella
20. Deficiencia en la subunidad p40 de la IL-12	Monocito/macrófago	Fallo en la secreción de IFN- γ	subunidad p40	Autosómica recesiva	Susceptibilidad a micobacterias y salmonella
21. Deficiencia 1 en el receptor IFN-g	Monocito/macrófago y linfocitos	Fallo en la upregulación de la producción de interferon- γ	IFN- γ R1	Autosómica recesiva/Autosómica dominante;	Susceptibilidad a micobacterias y salmonella
22. Deficiencia 2 en el receptor IFN-g	Monocito/macrófago y linfocitos	Señalización de IFN- γ	IFN- γ R2	Autosómica recesiva	Susceptibilidad a micobacterias y salmonella
23. Defecto en STAT-1	Monocito/macrófago	Fallo en la upregulación de la producción de interferon $\alpha/\beta/\gamma$	STAT-1	Autosómica recesiva	Susceptibilidad a micobacterias y salmonella
		Señalización de IFN- γ	STAT-1	Autosómica dominante	Susceptibilidad a micobacterias y salmonella

1.2.6 Defectos en la inmunidad innata

Pertenecen a este grupo inmunodeficiencias monogénicas que afectan a componentes de la inmunidad innata, como la displasia ectodérmica anhidrótica, los pacientes con mutaciones en **NEMO** presentan infecciones bacterianas piógenas invasivas recurrentes (*S. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae*) y posteriormente infección por micobacterias. El defecto humoral que sufren estos pacientes está caracterizado por una producción defectuosa de anticuerpos específicos con o sin asociación con hipogammaglobulinemia (Orange et al. 2003). La deficiencia en **IRAK-4** afecta a la señalización intermedia de la vía de los Toll-like receptors (TLRs), los pacientes con esta deficiencia sufren infecciones por bacterias Gram positivas, disminución de la inflamación y de las proteínas de fase aguda. Una observación clínica sorprendente es la resistencia a infecciones virales (Picard et al. 2003).

A continuación se muestra la **Tabla I-6** donde se clasifican los defectos en la inmunidad innata.

Tabla I-6. DEFECTOS EN LA INMUNIDAD INNATA

Nombre	Células afectadas	Defecto funcionales	Rasgos asociados	Herencia	Defectos genéticos
Displasia ectodérmica anhidrótica con inmunodeficiencia	Linfocitos y monocitos	Vía de señalización NF-KB	Displasia ectodérmica anhidrótica con deficiencia específica de anticuerpos, infecciones por micobacterias y bact. piógenas	Recesiva ligada al cromosoma X	NEMO
Displasia ectodérmica anhidrótica con inmunodeficiencia	Linfocitos y monocitos	Vía de señalización NF-KB	Displasia ectodérmica anhidrótica con deficiencia en células T, infecciones varias	Autosómica dominante	IKBA
Deficiencia en la kinasa 4 asociada al receptor de IL-1 (IRAK4)	Linfocitos y monocitos	Vía de señalización TIR.IRAK	Infecciones por bacterias piógenas	Autosómica recesiva	IRAK4
WHIM (Hipogammaglobulinemia, verrugas, infecciones, síndrome mielokatesis)	Granulocitos y linfocitos	Respuesta incrementada de la quemoquina CXCR4 a su ligando CXCL12 (SDF-1)	Hipogammaglobulinemia, número reducido de células B, severa reducción de neutrófilos, verrugas e infección por HPV	Autosómica dominante	CXCR4
Epidermodisplasia verruciforme	Queratinocitos	?	Infección por papilomavirus (grupo B1) y cáncer de piel	Autosómica recesiva	EVER1, EVER2

INTRODUCCIÓN

1.2.7 *Enfermedades autoinflamatorias*

Las enfermedades autoinflamatorias son un nuevo grupo de entidades caracterizadas por episodios recurrentes de inflamación sistémica en ausencia de infecciones, neoplasia, y enfermedad autoinmune (autoanticuerpos o células T específicas de antígeno). Estas enfermedades están causadas por una disregulación inmune y comprenden enfermedades hereditarias como la fiebre mediterránea familiar, la Deficiencia en Mevalonato-cinasa, el Síndrome periódico asociado al receptor del TNF, el Síndrome periódico asociado a criopirina, el Síndrome de Blau, el Síndrome pioderma gangrenosum y acné, y la osteomielitis multifocal crónica recurrente.

La identificación de los genes y proteínas mutadas en las enfermedades autoinflamatorias ha permitido mejorar la comprensión de la regulación de la inflamación. En la **Tabla I-7**, se muestra la clasificación de las enfermedades autoinflamatorias.

Tabla I-7. ENFERMEDADES AUTOINFLAMATORIAS (I)

Nombre	Células afectadas	Defecto funcionales	Rasgos asociados	Herencia	Defectos genéticos
Fiebre mediterránea familiar	Granulocitos maduros, monocitos activados por citoquinas	Disminución de la producción de pirina; disminución de la apoptosis de macrófagos	Fiebre recurrente, serositis e inflamación por colchicina; predisposición a vasculitis y a IBD	Autosómica recesiva	MEFV
Síndrome periódico asociado al receptor de TNF	PMNs y monocitos	Mutaciones en el receptor TNF 55kd generando una disminución del receptor soluble de citoquinas para unir TNF	Fiebre recurrente, serositis, rash e inflamación ocular y de articulaciones	Autosómica dominante	TNFRSF1A
Síndrome de Hiper IgD		Deficiencia en la mevalonato quinasa que afecta a la síntesis de colesterol	Fiebre periódica y leucocitosis con altos niveles de IgD	Autosómica recesiva	MVK
Síndrome Muckle-Wells	PMNs y monocitos	Defecto en criopirina implicado en la apoptosis de leucocitos y en la señalización NF-kB y procesamiento de IL-1	Urticaria, SNHL, amiloidosis; respuesta al antagonista /IL-1R	Autosómica dominante	CIAS1 (también conocido como PYPAF1 o NALP3)

Continua -->

Tabla I-7. ENFERMEDADES AUTOINFLAMATORIAS (II)

Nombre	Células afectadas	Defecto funcionales	Rasgos asociados	Herencia	Defectos genéticos
Síndrome frío autoinflamatorio familiar	PMNs y monocitos	Defecto en criopirina implicado en la apoptosis de leucocitos y en la señalización NF-κB y procesamiento de IL-1	Urticaria sin prurito, artritis, constipado, fiebre y leucocitosis tras la exposición al resfriado; Sensible al agonista de IL-1R (Anakinra)	Autosómica dominante	CIAS1
Enfermedad inflamatoria multisistémica de debut neonatal (NOMID)	PMNs y monocitos	Defecto en criopirina implicado en la apoptosis de leucocitos y en la señalización NF-κB y procesamiento de IL-1	Rash neonatal, meningitis crónica, y artropatía con fiebre y respuesta inflamatoria al agonista de IL-1R (Anakinra)	Autosómica dominante	CIAS1
Síndrome con acné, piodrema gangrenosum, artritis estéril piogena	Tejidos hematopoyéticos, aumentado en células T activadas	Trastornos en la reorganización de la actina que compromete la señalización fisiológica durante la respuesta inflamatoria	Artritis destructiva, inflamación de la piel, rash, miositis	Autosómica dominante	PSTPIP1 (también conocida como C2BP1)
Síndrome Blau	Monocitos	Mutaciones en el sitio de unión de nucleótidos de CARD15,	Uveítis, sinovitis granulomatosa, camptodactilia, rash y neuropatías craneales; 30% tienen enfermedad de Crohn's	Autosómica dominante	NOD2 (también conocida como CARD15)

1.2.8 **Deficiencias del complemento**

Se han descrito defectos en prácticamente todos los componentes del sistema del complemento, aunque son poco frecuentes. En la **Tabla I-8** se detallan la herencia y las distintas características de cada uno de los déficits de proteínas del complemento.

La mayoría de los defectos en la vía del complemento tienen una herencia autosómica recesiva, pudiendo ser reconocidos los heterocigotos por tener la mitad de los niveles normales del componente afectado. No obstante, las deficiencias en el factor H, en el factor I y en MBL pueden ser tanto autosómicas dominantes como recesivas. El único defecto con herencia ligada al cromosoma X es déficit en properdina.

La **expresión clínica** de los defectos en el sistema del complemento es variable y depende del rol del componente afectado. Los individuos con estas deficiencias pueden tener un incremento de la susceptibilidad a infecciones, enfermedad reumatoide, angiodema o pueden ser asintomáticos. Los

INTRODUCCIÓN

pacientes con deficiencia en C3 tienen una marcada susceptibilidad a infecciones por bacterias que requieran opsonización como mecanismo de defensa del huésped. Los defectos en C1, C2 o C4 tienen además una incrementada susceptibilidad a infecciones por bacterias encapsuladas. La activación de los componentes finales, C5-C9, resulta en el ensamblaje del complejo de ataque a membrana y en la generación de actividad bactericida frente a bacterias gram negativas, así los pacientes con déficit en estos componentes tienen gran susceptibilidad a infecciones por *Neisseria* (Sjoholm et al. 2006)

Tabla I-8. DEFICIENCIAS DEL COMPLEMENTO

Deficiencia	Herencia	Síntomas
C1q	Autosómica recesiva	Síndrome lupus like, enfermedad reumatoide, infección
C1r	Autosómica recesiva	Síndrome lupus like, enfermedad reumatoide, infección
C4	Autosómica recesiva	Síndrome lupus like, enfermedad reumatoide, infección
C2	Autosómica recesiva	Síndrome lupus like, vasculitis, miositis, infecciones piógenas
C3	Autosómica recesiva	Infecciones recurrentes piógenas
C5	Autosómica recesiva	Infecciones por <i>Neisseria</i> , Lupus
C6	Autosómica recesiva	Infecciones por <i>Neisseria</i> , Lupus
C7	Autosómica recesiva	Infecciones por <i>Neisseria</i> , Lupus, vasulitis
C8 alfa	Autosómica recesiva	Infecciones por <i>Neisseria</i> , Lupus
C8 beta	Autosómica recesiva	Infecciones por <i>Neisseria</i> , Lupus
C9	Autosómica recesiva	Infecciones por <i>Neisseria</i>
C1 inhibidor	Autosómica dominante	Angioedema hereditario
Factor I	Autosómica recesiva	Infecciones recurrentes piógenas
Factor H	Autosómica recesiva	Infecciones recurrentes piógenas
Factor D	Autosómica recesiva	Infecciones por <i>Neisseria</i>
Properdina	Ligada al X	Infecciones por <i>Neisseria</i>
Deficiencia en MBP	Autosómica recesiva	Infecciones piógenas con poca penetrancia, principalmente asintomáticos
Deficiencia en MASP2	Autosómica recesiva	LES, infecciones piógenas

1.3 Inmunodeficiencias combinadas

1.3.1 Deficiencia en adenosín deaminasa (ADA)

La deficiencia en ADA es una inmunodeficiencia severa asociada con la depleción de los tres tipos celulares, células B, células T y células NK. El primer paso para esclarecer esta deficiencia se dio en 1972 al describirse una alteración del enzima ADA en los eritrocitos de pacientes que presentaban una deficiencia grave del sistema inmunológico (Giblett et al. 1972).

La **expresión clínica** más frecuente de esta inmunodeficiencia aparece después del nacimiento y se caracteriza por la presencia de infecciones recurrentes asociadas a linfopenia, fallo en el crecimiento, infecciones oportunistas por virus, hongos y bacterias y anormalidades esqueléticas, neurológicas e inflamatorias. Se asocia con vómitos, diarreas, candidiasis generalizada, SCID y muerte temprana en ausencia de tratamiento. En general el timo está ausente o es pequeño y displásico en estos pacientes. La deficiencia en ADA es infrecuente, con incidencia menor de $1:10^6$ y es responsable del 15% de todos los casos de SCID o en un tercio de estos con herencia autosómica recesiva (Hershfield 2003). Este tipo de SCID es provocado por mutaciones en el gen que codifica para ADA, enzima esencial para la función metabólica de variedad de tipos celulares, pero especialmente para los linfocitos T. La heterogeneidad tanto clínica como metabólica fue apreciada desde las primeras descripciones de este déficit. Los pacientes con una deficiencia total se diagnostican a la edad de 6 meses y raramente sobreviven al uno o dos años sin un trasplante de médula ósea o una terapia enzimática sustitutiva.

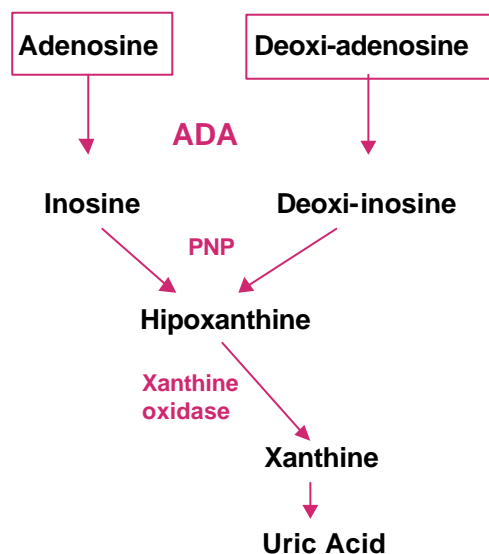


Figura I-2. **Reacción catalizada por el enzima adenosín deaminasa (ADA).** ADA reduce la concentración intracelular de adenosina y 2'-deoxiadenosina. En su defecto, la acumulación de adenosina y de 2'-deoxiadenosina tiene un efecto inmunosupresor sobre las células proliferativas inmunocompetentes.

INTRODUCCIÓN

1.3.1.1 **Función y mecanismos patogénicos de la deficiencia en ADA**

La adenosín deaminasa es una enzima de la vía de las purinas, la cual cataliza la conversión irreversible de adenosina (Ado) y 2'-deoxiadenosina (dAdo), a inosina y 2'-deoxiinosido, respectivamente, como se observa en la **Figura I-2**. La deaminación de Ado y dAdo tiene lugar durante el metabolismo normal de las purinas. La principal función de ADA es el catabolismo de dAdo que surge de la degradación del DNA, el cual es altamente tóxico para las células linfoides. Los pacientes SCID deficientes en ADA secretan dAdo (pero no Ado) en orina. La deficiencia de ADA da lugar a una acumulación de sus sustratos (metabolitos tóxicos), adenosina y 2'-deoxiadenosina que se elevan en plasma y se acumulan en las células de los pacientes afectados, lo cual provoca una profunda disminución en la maduración de precursores linfocitarios.

La proteína ADA se encuentra en el eritrocito como un monómero soluble. Aunque también esta asociada a otros tipos celulares como son timocitos medulares, células T activadas y células epiteliales de distintos tejidos, dando lugar a un ecto-enzima en complejos de más de 200kDa debido a la unión del monómero con la glicoproteína de membrana CD26/dipeptidil peptidasa IV. CD26 actúa como un coestimulador de la proliferación de los timocitos y activación mediada por el receptor de la célula T (TCR). En virtud de esta actividad ectopeptidasa ha sido implicada en la regulación de la actividad de ciertas citocinas y hormonas (De Meester et al. 1994).

Tanto los casos clínicos como los estudios *in vitro* han implicado dos **mecanismos patogénicos**, la inhibición de la replicación y reparación del DNA y la inhibición de la metilación. Los efectos pro-apoptóticos resultantes de la expansión del pool de nucleótidos (dATP) podría ser la primera causa de linfopenia debida a la deficiencia de ADA. Estos efectos incluyen la inhibición de la ribonucleótido reductasa, la cual puede bloquear la replicación del DNA y activar p53, así como la estabilización por dATP del complejo apoptosoma compuesto por el citocromo c citosólico, factor-1 activador de apoptosis y la procaspasa 9. La inhibición de reacciones de transmetilación puede también contribuir a inmunodeficiencia y daño hepático que se produce tanto en el modelo murino como en humanos (Blackburn et al. 2005).

1.3.1.2 **Organización molecular de ADA. Fenotipo y heterogeneidad genética**

En humanos el gen *ADA* (MIM*608958) se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 20 (32Kb) y da lugar a una proteína de 41kDa con 363 residuos aminoacídicos. Este gen fue clonado y secuenciado en 1983, confirmándose la hipótesis de que estos pacientes con el perfil clínico expuesto anteriormente tenían mutaciones en el gen que codifica para la ADA (Orkin et al. 1983). Está organizado en 12 exones que se expanden en 32,040 bp. Se han identificado más de setenta mutaciones en el gen *ADA* en 59 familias no emparentadas de las cuales han sido reportadas 67, entre ellas 47 sustituciones, 12 de splicing, 9 deleciones y 5 mutaciones sin sentido. Las sustituciones de aminoácidos se distribuyen a lo largo de toda la secuencia proteica. Algunas de las largas deleciones se han generado por recombinación con zonas de repetición Alu, aunque muchas

de ellas son pequeñas y seguramente debidas a errores de replicación. Muchas de las mutaciones sustitutorias recurrentes se han dado en codones que contienen el dinucleótido CpG. Hay evidencia de una correlación fenotipo-genotipo en las formas severas y medias de déficit de ADA. Las formas medias se deben a una disminución pero no a una ausencia de la función enzimática de ADA. Aunque es inusual, pueden darse casos de mosaicismo, complicando su análisis (Hirschhorn et al. 1994). A través de la base de datos de mutaciones en ADA se puede conocer la actualización de las mutaciones en este gen. ADAbase, Mutation Registry for Adenosine Deaminase Deficiency. Institute of Medical Technology, IMT Bioinformatics, University of Tampere, European Society for Immunodeficiencies.

Se han distinguido diferentes **niveles de gravedad clínica** y disfunción inmunológica en los pacientes con déficit de ADA. Los distintos fenotipos se han correlacionado con la actividad residual del enzima, que a partir de un 5% de actividad enzimática reduce la toxicidad metabólica permitiendo la supervivencia de células T funcionales (Hershfield 1998). La definición de los diferentes fenotipos es la siguiente:

1. SCID: profunda linfopenia con ausencia de la función inmune humoral y celular, dando lugar a infecciones oportunistas con diagnóstico durante el primer año de vida.
2. Comienzo retardado: deterioro clínico debido a una deficiencia inmune combinada, dándose el diagnóstico entre uno y diez años de vida.
3. Comienzo tardío: deterioro clínico e inmunológico que se manifiesta después de la primera década de vida.
4. Parcial: Individuos sanos con deficiencia en ADA, con función inmune normal.

La cantidad de dATP está elevada entre 300 y más de 1500 veces en los pacientes con SCID, entre 30 y 300 veces en los de comienzo retardado y tardío, y entre 0 y 30 veces en la deficiencia parcial.

1.3.1.3 **Tratamiento**

La **terapia enzimática** en este déficit está basada en el hecho de que los metabolitos presentes en plasma son degradados por el enzima ADA administrado exógenamente. El tratamiento bioquímico consiste polietilen-glicol más ADA bovina (PEG-ADA), donde el polietilen-glicol protege el enzima bovino de ataques proteolíticos o inmunológicos, reduciendo el impacto metabólico del defecto enzimático y restaurando significativamente la función inmune (Buckley et al. 1999).

El déficit de ADA fue la primera enfermedad humana en la que se ensayó la **terapia génica**, un proceso que consiste en transferir genes exógenos mediante un vector, generalmente un retrovirus, a las células somáticas de un individuo con el fin de corregir un defecto genético. El primer

INTRODUCCIÓN

ensayo clínico fue realizado en 1990 en dos niñas con deficiencia de ADA y consistió en estimular *in vitro* con anti-CD3 e IL-2 células mononucleares de sangre periférica, para luego infectarlas con un vector retroviral que contenía el gen normal de la ADA (Anderson et al. 1990). Estos linfocitos corregidos genéticamente fueron reinfundidos en las pacientes varias veces, durante un período de dos años, con la intención de corregir el máximo número de linfocitos T. Los análisis moleculares después de 4 años demostraron que los linfocitos de estas pacientes poseían el gen normal de la ADA. En 1992, se inició el segundo ensayo en dos pacientes con deficiencia de ADA, que consistió en la modificación genética no sólo de linfocitos sino también de células de médula ósea que fueron reinfundidas durante un período de 24 meses (Ferrari et al. 1992). Los análisis moleculares revelaron que los linfocitos y granulocitos poseían el gen normal, indicando que la corrección genética de las células de la médula ósea había sido transferida a la progenie.

En 1993, se inició el tercer ensayo clínico de terapia génica en el cual las células corregidas genéticamente fueron progenitores hematopoyéticos CD34+ provenientes de cordón umbilical de recién nacidos con deficiencia de ADA. El protocolo consistió en la modificación genética de las células CD34+ *in vitro* para luego ser reinfundidas de forma intravenosa. A los 18 meses, los estudios moleculares revelaron que tanto los linfocitos como los polimorfonucleares eran portadores del gen normal. Aunque los pacientes estudiados en estos ensayos nunca dejaron de recibir tratamiento con ADA, la terapia génica ha demostrado ser una buena estrategia terapéutica para corregir este desorden (Blaese 1993).

No obstante, el tratamiento más eficaz en estos pacientes es el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos de un donante emparentado.

1.4 Inmunodeficiencias de anticuerpos.

1.4.1 *Agammaglobulinemia ligada al X (XLA)*

La Agammaglobulinemia ligada al X (XLA) es el prototipo de deficiencia humoral y se caracteriza por un fallo en la maduración de los linfocitos B y en consecuencia una disminución de esta subpoblación linfocitaria, agammaglobulinemia e incapacidad de síntesis de anticuerpos *in vitro*. Tienen una incidencia de aproximadamente 1:200,000. En 1952, Bruton informó del caso de un varón de ocho años de edad con sepsis bacteriana recurrente y ausencia de la fracción globulina en la electroforesis proteica del suero (Bruton 1952). El paciente descrito por Bruton fue tratado mensualmente con dosis de gammaglobulina intramuscular observándose una marcada mejoría. En los años siguientes se observó que la agammaglobulinemia a menudo tenía un patrón hereditario ligado al cromosoma X, fue entonces cuando esta entidad se comenzó a conocer como agammaglobulinemia ligada al X o agammaglobulinemia de Bruton. Posteriormente en los años 70, con el descubrimiento de que las células B expresaban inmunoglobulinas en superficie, se observó que los pacientes con XLA carecían de células B circulantes. Se publicaron resultados en los cuales se indicaba que los pacientes con XLA tenían precursores de células B en médula ósea, pero que estas no se desarrollaban normalmente (Conley 1985).

Para conocer si el defecto en XLA era intrínseco al linaje de células B o debido a la ausencia de algún factor de crecimiento o diferenciación producido por las células T, mieloides o células estromales de médula ósea, se examinaron los patrones de inactivación del cromosoma X tanto en células B, células T, y neutrófilos de los portadores de la enfermedad (Tsuge et al. 1993). El resultado de estos experimentos fue que las células B pero no otras mostraban un patrón de inactivación no al azar, ya que las células B derivadas de precursores que tenían el cromosoma X normal, eran activas. En 1993 dos grupos describieron simultáneamente una tirosin cinasa citoplasmática de 659aa, denominada tirosin cinasa de Bruton (Btk) (MIM*300300), con rasgos similares a las de la familia src, como el gen responsable de XLA (Tsukada et al. 1993; Vetrie 1993).

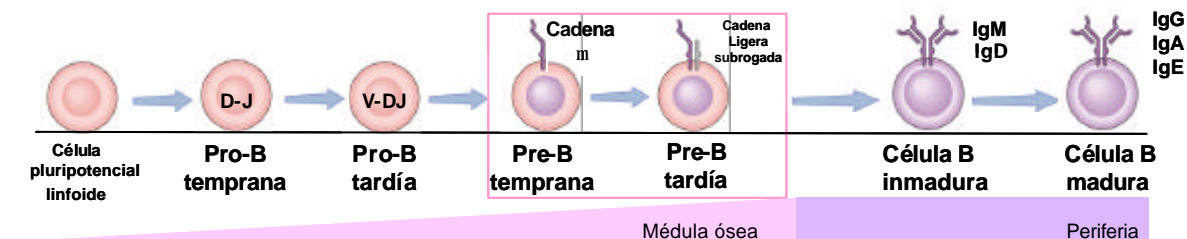


Figura I-3. Representación esquemática del desarrollo de los linfocitos B. El bloqueo en la diferenciación en los pacientes con XLA se da en los estadios pre-B temprano y tardío manifestándose en una virtual ausencia de linfocitos B y de células plasmáticas en periferia.

INTRODUCCIÓN

Btk se expresa en todos los estados de diferenciación de la célula B, excepto en células plasmáticas. Además se expresa en células mieloides y plaquetas, pero no en células T o células NK. La cinasa Btk está implicada en la señalización del receptor de la célula B dirigiendo directamente el desarrollo del linaje de las células B **Figura I-3**). El XLA se caracteriza por una interrupción en la diferenciación de la célula B tras la transición pre-B. El análisis de médula ósea en estos pacientes revela un bloqueo en los estíos pre-B temprano (C μ negativo) y pre-B tardío (C μ positivo). Este puede ser variable existiendo pacientes con un número normal de células pre-B, que son incapaces de proliferar (Islam et al. 2000).

1.4.1.1 **Hallazgos clínicos, de laboratorio y presentación en el XLA**

XLA se caracteriza por un incremento de la susceptibilidad a infecciones principalmente causadas por bacterias extracelulares y piógenas siendo las más comunes por *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Muchos pacientes están protegidos de la infección durante los primeros meses de vida por los anticuerpos transferidos de la madre.

Los pacientes que son tratados con dosis sustitutorias de inmunoglobulinas adecuadas raramente tienen infecciones dramáticas, pero pueden tener otitis persistente, sinusitis, conjuntivitis y resfriado. *Mycoplasma*, *Giardia Lambia* son otros patógenos oportunistas que pueden dar lugar a infecciones y retraso en el crecimiento en pacientes con XLA. El rol de las infecciones víricas en estos pacientes es complejo. Parece probable que una infección viral previa precipite una neutropenia que posteriormente de lugar a infecciones por *Pseudomonas* y *Staphilococcus*. Existen referencias de que los pacientes con XLA tienen una susceptibilidad incrementada a infecciones por enterovirus, incluyendo echovirus, coxsackie, y tanto polio salvaje como la asociada con la vacunación. Estos agentes pueden causar un síndrome similar a la dermatomiositis o encefalitis fatal crónica (Ochs et al. 1996). Existe la evidencia de que en algunos de estos pacientes se incrementa el riesgo a carcinoma gastrointestinal, aunque responden mejor a la terapia que los pacientes típicos sugiriendo que es una enfermedad un poco diferente.

Muchos de estos pacientes tienen células pre-B en su médula ósea, aunque prácticamente no hay células B maduras en periferia (<2%) y las células plasmáticas están ausentes en ganglios linfáticos y médula ósea. Como consecuencia, son incapaces de producir todos los isotipos de inmunoglobulinas, encontrándose concentraciones de IgM, IgA e IgG marcadamente reducidas. La IgG sérica es generalmente menor de 200 mg/dl y la concentración de IgA usualmente es menor de 20 mg/dl. Es recomendado en estos pacientes el análisis del espectro de anticuerpos y la investigación de anticuerpos antígeno específico.

El **diagnóstico diferencial** se realiza con otras causas de hipogammaglobulinemia como son la deficiencia de la cadena pesada Mu, la deficiencia de lambda 5 y la deficiencia de IgA. El diagnóstico definitivo se lleva a cabo cuando se trata de un varón con menos de 2% de linfocitos B CD19 y una de las siguientes características:

1. Mutación en el gen de la *BTK*.
2. Ausencia de ARNm de tirosin cinasa en neutrófilos o monocitos.
3. Ausencia de proteína tirosin cinasa en monocitos o plaquetas.
4. Familiares maternos como primos, tíos, sobrinos con menos de 2% de linfocitos B CD19.

Existe un rango en la edad de inicio entre los que son diagnosticados tempranamente tras hospitalización por infecciones dramáticas y los que son evaluados como inmunodeficiencia por encima de los cuatro meses de edad. La heterogeneidad clínica es considerable en los pacientes con XLA, aunque la mayoría son diagnosticados de inmunodeficiencia dentro de los 5 primeros años de edad. Es infrecuente el diagnóstico en adultos, aunque se han encontrado algún abuelo o nieto de pacientes con XLA que portan la mutación, estos individuos usualmente tienen una historia de sinusitis recurrentes o persistentes, y podrían haber tenido algún episodio de neumonía, y han llevado una vida normal en ausencia de reposición de inmunoglobulinas. En los **casos de XLA esporádico** la media de edad al diagnóstico es de 35 meses, con un rango entre los dos y los once años.

No obstante, en los **casos con historia familiar** el 20% de los pacientes son diagnosticados en el primer año de vida y el patrón de hallazgos es el siguiente:

- i) *Pioderma gangrenosum*, abscesos perirectales, celulitis o impétigo.
- ii) Sepsis por *Pseudomonas* o *Staphilococcus*.
- iii) Neutropenia.

Y el 50% se diagnostican entre los 13 y 40 meses de edad, con una historia de otitis recurrentes y/o sinusitis durante el diagnóstico, además de una alta incidencia de neumonía, artritis, meningitis e infecciones menos serias como diarrea y conjuntivitis. Aproximadamente el 20% de los pacientes tienen infección abrumadora, a menudo con neutropenia. Otro 10-15% tienen concentraciones de inmunoglobulinas séricas más altas o no son reconocidos como inmunodeficientes hasta los 5 años de vida (Chapel et al. 2003).

Las portadoras de la enfermedad no suelen mostrar signos de la enfermedad, no obstante, se han descrito raras excepciones como el caso de una mujer con todos los signos y síntomas de XLA, hija de un hombre con XLA. Caso en el que los estudios de inactivación del cromosoma X mostraron que el cromosoma derivado del padre, era el cromosoma X activo en todos los linajes celulares de la hija (Takada et al. 2004).

1.4.1.2 ***El gen Btk (Bruton tirosin cinasa) y diagnóstico molecular en XLA***

El gen de la Btk está constituido por 19 exones incluyendo una zona no traducida en 5' a lo largo de 37kd localizada en la región 21.3-22 del brazo largo del cromosoma X (Xq) (Ochs and Smith 1996). Las mutaciones en este gen impiden la maduración de las células B debido a la falta de señalización a través de Btk, la cual es crucial regulando el desarrollo y maduración de las células B. La proteína Btk consta de cinco dominios funcionales **Figura I-4**), un dominio amino-terminal de homología Pleckstrin (PH) (1-138aa) responsable de la localización de la proteína en membrana

INTRODUCCIÓN

mediante la unión a grupos fosfatidil-inositol de lípidos de membrana, una región de homología Tec (TH) (139-215aa) que une Zn^{2+} , la cual es esencial para su estabilidad, un dominio de homología Src3 (SH3) (216-280aa), un dominio de homología Src 2 (SH2) (281-377aa) y un dominio catalítico de homología Src 1 (SH1) (378-659aa), que se encuentra en la porción carboxi-terminal de la molécula.

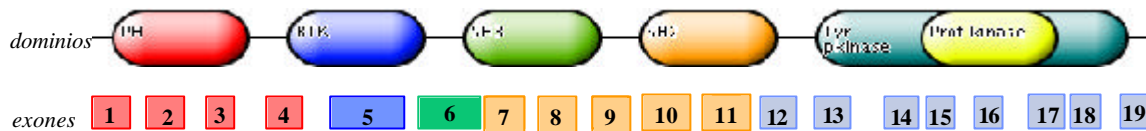


Figura I-4. **Representación esquemática de la proteína Btk y los exones que codifican cada dominio.** El gen BTK se encuentra localizado en la región cromosómica Xq282.1. La proteína está compuesta por los siguientes dominios PH (pleckstrin homology), BTK (TH) (Tec homology), SH3 (Scr3 homology), SH2 (Scr2 homology), y el dominio cinasa.

Esta **proteína** es miembro de una familia de tirosin cinasas entre las que se incluyen Tec, Itk/EMT/Tsk, Bmx y Txk/Rtk, relacionada pero diferente de la familia de las cinasas Src. (Tsukada et al. 1993). De los miembros de esta familia, Btk es la única asociada hasta la fecha con patología en humanos. La interacción a través de diferentes receptores presentes en la superficie celular como el receptor de la célula B (BCR), el receptor de alta afinidad de la IgE en mastocitos, el receptor del colágeno tipo VI en plaquetas, da lugar a la activación y la fosforilación de Btk. Btk está implicada en la transferencia de señales desde el receptor de la célula B vía fosfolipasa $C\gamma 2$ ($PLC\gamma 2$), y activación de la protein cinasa C (Hashimoto et al. 2000). La Btk se activa de manera escalonada por fosforilación, primero por cinasas de la familia Src y posteriormente Btk fosforilará a la $PLC\gamma 2$, esta última generará inositol trifosfato (IP3), el cual actúa como segundo mensajero uniéndose a receptores en el retículo endoplasmático, lo que dará lugar a una liberación de calcio (**Figura I-5**).

Han sido identificadas más de 400 mutaciones que están recogidas en la base de datos de mutaciones Btk-base (<http://bioinf.uta.fi/BTKbase> última actualización en mayo 2006), la cual se estableció en 1994 como registro de mutaciones en XLA. Las mutaciones que causan el XLA han sido descritas en todos los dominios de la proteína y se encuentran diseminadas a lo largo de todo el gen, incluso en regiones no codificantes. No obstante, se ha observado una frecuencia de mutaciones mayor de la esperada en la región SH1 (Fiorini et al. 2004). El análisis de las diferentes mutaciones ha revelado la existencia de una considerable heterogeneidad en el espectro clínico del XLA (Speletas et al. 2001). La mayoría de las mutaciones conocidas generan un cambio en la proteína, debido tanto a mutaciones por cambio de la pauta de lectura (frameshift mutations) como a mutaciones sin sentido (nonsense mutations), por las cuales el codón que especifica para un aminoácido es cambiado a un codón de terminación, dando lugar a una proteína truncada. Aunque las mutaciones se distribuyen regularmente a lo largo del gen de la Btk, los sitios puntuales más mutables como en muchos desordenes genéticos son los dinucleótidos CpG (Lindvall et al. 2005). Varias de las series publicadas coinciden en que son las sustituciones aminoacídicas las mutaciones

más frecuentes en XLA, con una frecuencia aproximada del 65%, seguido de pequeñas inserciones o deleciones (~25%) y grandes alteraciones del DNA genómico (~10%). Las mutaciones son altamente variables encontrando un 3% de los pacientes con mutaciones complejas.

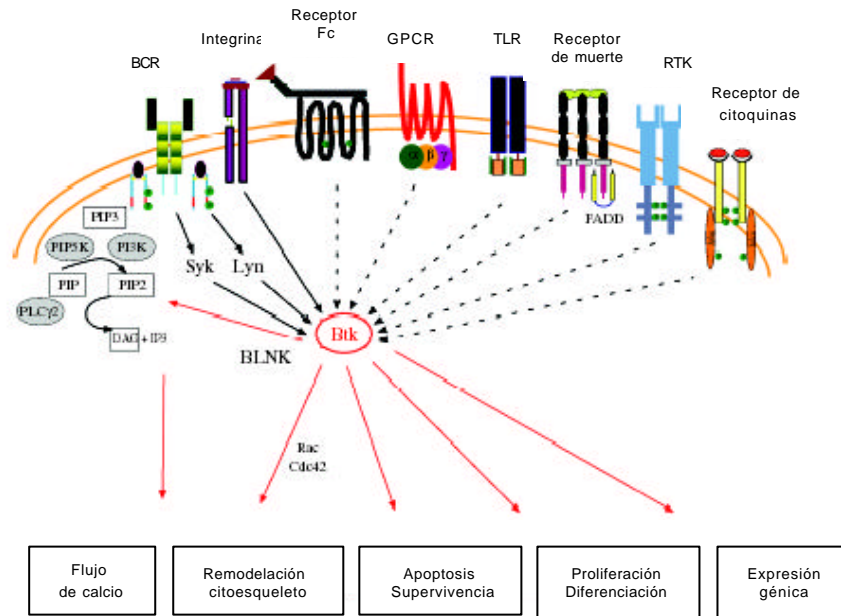


Figura I-5. **Modelo esquemático de la señalización de la tirosin cinasa de Bruton (Btk).** Debido a la multitud de moléculas de señalización que pueden interactuar con ella, defectos en esta proteína pueden generar efectos pleiotrópicos. Las flechas discontinuas indican vías de señalización no completamente resueltas. Adaptado de (Lindvall et al. 2005).

Relación fenotipo-genotipo. Es difícil establecer una relación entre la mutación específica en Btk y la gravedad de la enfermedad, aún cuando la presencia de otros factores genéticos, la edad de diagnóstico y el ambiente de exposición a la infección puede influir. No obstante, aunque en todos los casos de XLA existe un disminuido número de células B, podría considerarse este un indicador de gravedad. Incluso cuantificar los niveles de inmunoglobulinas en el momento del diagnóstico ha intentado relacionarse con la severidad sin mucho éxito. Pacientes con mutaciones severas en *BTK*, como son los que portan un codón de terminación prematuro, o defectos en los codón de comienzo de la secuencia, pueden tener una enfermedad más benigna, definida por un comienzo más retardado de la enfermedad o una mayor concentración de inmunoglobulinas séricas de lo que se podía pensar. Existen además factores que ayudan a proteger a estos pacientes como pueden ser variantes genéticas de proteínas intrínsecas al linaje B, que pueden ayudar a desviar el defecto en Btk, como es el caso de la proteína cinasa Tec que puede ser activada por las mismas señales que la Btk. La posibilidad de que cierto tipo de mutaciones den lugar a cuadros más benignos no ha sido descartado. Asociándose una enfermedad más leve en pacientes con mutaciones en las dos bases invariantes tanto al comienzo como al final de un intrón, así como en la posición -1 y +5 del lugar dador de la zona de corte y empalme (Valiaho et al. 2006).

INTRODUCCIÓN

1.4.1.3 *Terapia en el XLA*

El tratamiento de las infecciones es esencial en todas formas de IDP. El uso de antibióticos para combatir las infecciones bacterianas es uno de los pilares en el manejo de los pacientes con XLA, siendo muchas veces necesario un tratamiento prolongado. No obstante, el tratamiento sustitutivo con gammaglobulina es la principal terapia en XLA. La cual debería comenzar entre la semana 10 y la 12 en los casos diagnosticados durante el período prenatal o neonatal, y en los que se conocen por la historia familiar (Quartier et al. 1999).

Se ha estudiado la terapia génica como opción de tratamiento para el XLA utilizando diferentes modelos animales deficientes en Btk sin obtenerse resultados óptimos, esto junto con el hecho de que pacientes con SCID ligado al X tratados con terapia génica han desarrollado leucemia, ha dejado esta alternativa en desuso (Yu et al. 2004).

Otro tratamiento propuesto ha sido el trasplante de progenitores hematopoyéticos. En el único estudio realizado en humanos, tres pacientes fueron trasplantados de donantes emparentados HLA idénticos sin régimen preparativo ni terapia contra el rechazo, no obteniéndose el beneficio clínico observado en modelos murinos. En el mismo estudio otro grupo de pacientes fue tratado con terapia anti-rechazo previo al trasplante, en ninguno de los pacientes se demostró un incremento de las concentraciones de IgM o IgA en suero, ni la presencia de linfocitos B Btk positivos en circulación periférica tras el trasplante (Howard et al. 2003).

1.4.2 **Síndrome de Hiper-IgM**

Durante los últimos años, se han identificado en humanos serie de defectos que muestran deteriorado el proceso de cambio de clase de las inmunoglobulinas (CSR) con la consecuente incapacidad para producir inmunoglobulinas que no sean IgM o IgD. Estos defectos han sido colectivamente referidos como inmunodeficiencia con hiper IgM. Al menos cinco genes han sido implicados directa o indirectamente en la vía de señalización de las células B a través del CD40 como causa de HIGM si estos estuvieran mutados. Existen tanto formas primarias como adquiridas, las formas adquiridas pueden ser secundarias a la rubéola congénita, a neoplasias o al uso de fármacos (Kato et al. 2003).

El examen cuidadoso de la clínica y el fenotipo inmunológico asociado en los síndromes de hiper IgM (HIGM) ha mostrado que los defectos pueden extenderse más allá de las células B, resultando en una inmunodeficiencia combinada más que en un defecto puramente humoral. La deficiencia en inmunoglobulinas con IgM elevada está caracterizada por infecciones recurrentes asociadas con niveles bajos en suero de IgG e IgA, con niveles normales o incrementados de IgM y una función de la célula T normal.

1.4.2.1 **Generación del repertorio de anticuerpos**

La generación del repertorio de anticuerpos requiere dos pasos sucesivos. El primer paso es independiente de la interacción con el antígeno y de la célula T y tiene lugar en médula ósea. Allí, los linfocitos B inmaduros reordenan los segmentos génicos V (variabilidad), D (diversidad) y J (unión) de sus inmunoglobulinas gracias a lo cual se forma un segmento integrado funcional (VDJ) que está unido a la región constante μ ($C\mu$) (Figura I-6.). Tras este proceso se genera un primer repertorio de anticuerpos formado exclusivamente por inmunoglobulinas del isotipo IgM (Durandy et al. 2001).

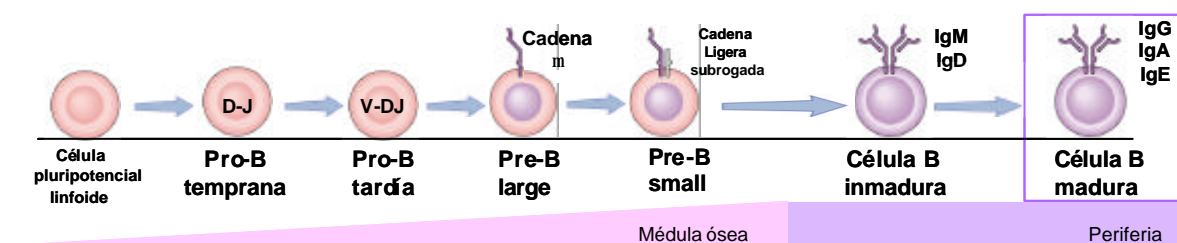


Figura I-6. **Esquema del desarrollo del linaje de células B marcado por el reordenamiento y expresión de los genes de las inmunoglobulinas.** Los pacientes con el Síndrome de Hiper IgM están caracterizados por la incapacidad de sintetizar inmunoglobulinas que no sean IgM, viéndose afectado el estadio de células B maduras.

INTRODUCCIÓN

El segundo paso es dependiente de la interacción con el antígeno y con la célula T y tiene lugar en los órganos linfoides secundarios. El antígeno es presentado por el linfocito B en el contexto de MHC de clase II al linfocito T CD4, que lo reconoce a través de su receptor de membrana TCR. El reconocimiento del antígeno junto con la interacción de moléculas coestimuladoras como B7 en la célula B y CD28 en la célula T CD4, provocan la activación de esta última que pasa a expresar CD40 ligando (CD40L) en su superficie. CD40L interacciona con CD40 que se expresa de forma constitutiva en la célula B. Esta interacción conduce a la proliferación clonal 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 tipo de inmunoglobulinas que se van a generar (Maizels 2005). Es en los centros germinales donde se dan de forma exclusiva 2 fenómenos genéticos que llevan a la generación del segundo repertorio de anticuerpos.

El primero de ellos es el **CSR** que tiene lugar a través de un proceso de recombinación entre dos regiones diferentes de cambio o "switch" (S), localizadas en la zona anterior de cada región C en el gen que codifica para las inmunoglobulinas. El cambio de la región $C\mu$ por una región constante de otra clase 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. En este proceso intervienen diferentes enzimas como la citidín deaminasa inducida por activación (AID) y la uracil N-glicosilasa (UNG) **Figura I-7**.

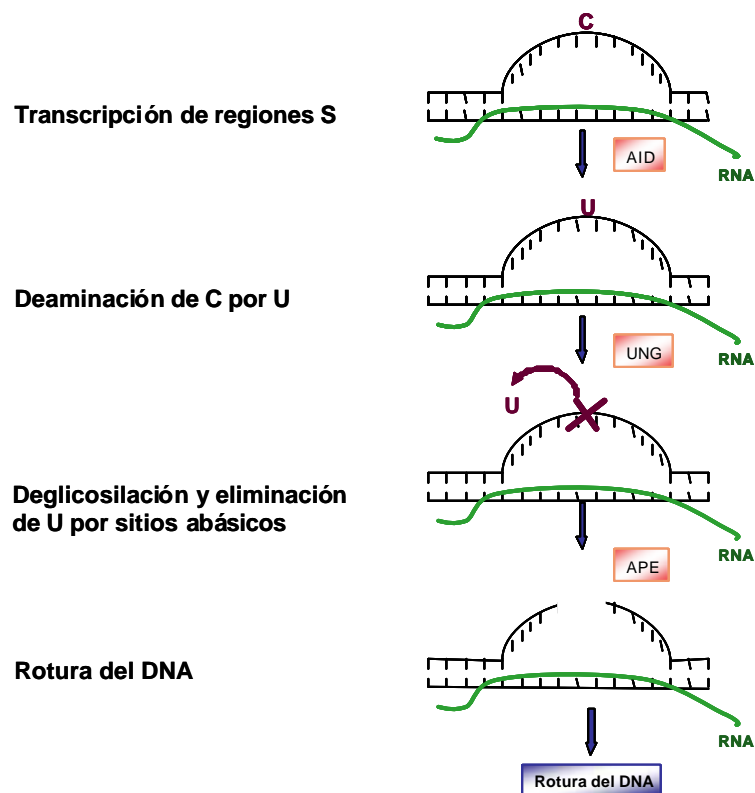


Figura I-7. **Representación esquemática de la citidín deaminasa inducida por activación (AID) como enzima editora de DNA.** Durante la transcripción, se generan R-loops por la formación de híbridos RNA-DNA, dejando expuesta la otra hebra de DNA como diana de AID. AID deamina residuos citosina en uracilo. Los residuos U integrados son deglicosilados y eliminados por la uracil-N-glicosilasa (UNG) dando lugar a lugares abásicos que serán diana de la endonucleasa apirimidínica (APE). Las muescas de DNA son entonces procesadas en roturas de doble hebra (DSB).

AID es una deaminasa que transforma los residuos dCitosina del DNA en dUracilo. Estos residuos dUracilo son eliminados por la enzima UNG, formándose cortes en el DNA. Estos cortes son los que provocan las roturas de doble hebra de DNA necesarios para que se den los procesos de recombinación. El segundo evento genético es la **SHM**, que consiste en generar mutaciones puntuales en las regiones V de las inmunoglobulinas para incrementar la afinidad de los anticuerpos. En este proceso también actúa AID aunque con la intervención de otros cofactores. Este paso precede a la selección positiva de las células B, si tienen un receptor con alta afinidad por el antígeno, y a la selección negativa, si tienen un receptor con una baja afinidad por el antígeno o una especificidad para un auto-antígeno. Todos los procesos de selección suceden dentro de los centros germinales a través de la interacción con las células dendríticas foliculares. Algunas de las células B activadas por el antígeno no pasan a secretar inmunoglobulinas, adquieren la capacidad de sobrevivir durante largos periodos de tiempo sin necesidad de estimulación antigénica. Estas células son las denominadas células de memoria y son capaces de generar respuestas rápidas cuando vuelve a aparecer el antígeno (Notarangelo et al. 2006).

1.4.2.2 **Clasificación de los Síndromes de Hiper IgM**

Las formas primarias de hiper IgM son consecuencia de diferentes defectos moleculares que llevan a un fallo en la generación del repertorio de anticuerpos. Los diferentes defectos genéticos que dan lugar a hiper IgM están esquematizados en la **Figura I-8**.

- La más común es la forma ligada al cromosoma X (**XHIM o HIGM-1**) que está causada por mutaciones en el gen que codifica para CD40L (CD154 o gp39) el cual se expresa en la superficie de las células T CD4 activadas (Allen et al. 1993). La mayoría de los pacientes con déficit en CD40L presenta infecciones sinopulmonares graves recurrentes, neumonía por *P. carinii*, diarrea crónica debida a infecciones por *Cryptosporium sp.* que pueden dar lugar a colangitis esclerosante, así como neutropenia intermitente o persistente.

- Las mutaciones en la molécula CD40, que se expresa en las células B, causan **HIGM-3**. Hasta ahora sólo han sido identificadas cuatro familias con deficiencia en CD40. En todos los casos el patrón de herencia es autosómico recesivo y se diagnostica en base a la pérdida de expresión de CD40 en la superficie de linfocitos B y monocitos. Los rasgos clínicos e inmunológicos de estos pacientes son idénticos a los que muestran los pacientes con HIGM1, con infecciones oportunistas por *P. carinii* y *Cryptosporium sp.* e infecciones recurrentes por bacterias, enfermedad del tracto biliar y una mortalidad incrementada. Los pacientes tienen bajos niveles en suero de IgG e IgA y niveles normales o incrementados de IgM. El número de células memoria está reducido y la hipermutación somática alterada. No obstante, a diferencia de los pacientes deficientes en CD40L, las células B de los deficientes en CD40 no son capaces de realizar el cambio de clase *in vitro* tras la activación con agonistas de CD40 y citoquinas (Ferrari et al. 2001).

INTRODUCCIÓN

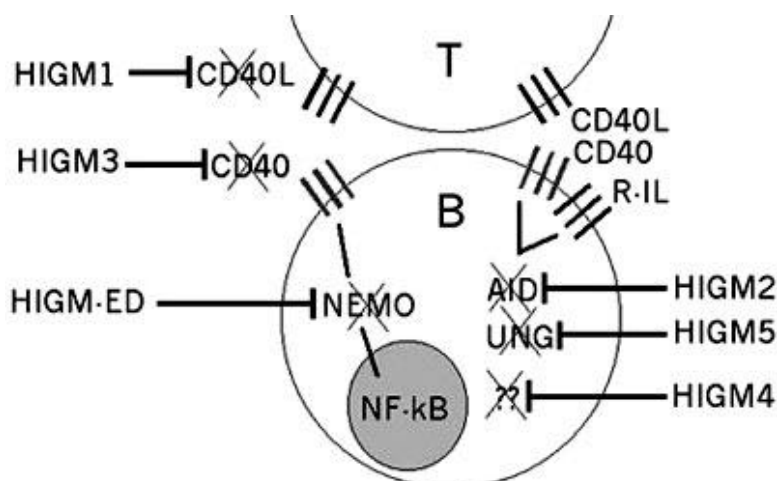


Figura I-8. **Representación esquemática de las bases moleculares en el Síndrome de hiper IgM.**

La interacción entre el CD40L presente en el linfocito T activado y el CD40 en presencia de citoquinas, es esencial para la proliferación del linfocito B, cambio de isotipo de cadena pesada de inmunoglobulinas, maduración de afinidad de la inmunoglobulina y formación de centros germinales. Defecto en los receptores de membrana (CD40L y CD40) o en la cascada de activación del NF- κ B (NEMO) o en las enzimas AID y UNG que se producen por la unión de los receptores CD40L-CD40 en presencia de citoquinas, afectan en forma similar la diferenciación terminal del linfocito B y produciendo el síndrome de hiper-IgM.

- El **HIGM-2** y el **HIGM-5** están causados por mutaciones en los genes que codifican para las enzimas AID y UNG respectivamente, y que están selectivamente expresadas en las células B de los centros germinales (Revy et al. 2000) (Kavli et al. 2005). El síndrome de hiper IgM con herencia autosómica recesiva más frecuente es el causado por mutaciones en el gen de AID que se expresa en células B activadas.

Los pacientes con **deficiencia en AID** a menudo tienen hiperplasia linfoide, menos infecciones oportunistas y generalmente mejor pronóstico. En la mayoría de los casos esta enfermedad se presenta en la infancia aunque es común un diagnóstico tardío. Estos pacientes sufren principalmente infecciones en vías respiratorias altas y bajas, infecciones gastrointestinales, del sistema nervioso central y artritis entre un 12% y un 27%. Un rasgo prominente de la enfermedad es la hiperplasia linfoide. El 20% de los pacientes tienen afectación autoinmune (anemia hemolítica, trombocitopenia y hepatitis). Estos pacientes tienen una deficiencia profunda en IgG e IgA mientras que los niveles de IgM son normales o están aumentados. La respuesta a anticuerpos está restringida al isotipo IgM, sin cambio de clase tras inmunizaciones repetidas. El número de células T y B es normal, no obstante las células B únicamente expresan IgM e IgD de superficie, y el número de linfocitos B memoria (CD27+) es normal.

Recientemente han sido publicados tres casos con **deficiencia en UNG** y herencia autosómica recesiva. UNG se expresa en células B y genera "lugares abásicos" dentro de las regiones variables de las inmunoglobulinas, un proceso requerido para una eficiente CSR y SHM. Estos pacientes tienen una historia de infecciones recurrentes y dos de ellos mostraban

linfadenopatía. El número de linfocitos B memoria es normal (Imai et al. 2003). El ratón knockout en UNG (UNG^{-/-}) es característicamente deficiente en CSR y SHM mostrando disminución de dG y transversión dC (Nilsen et al. 2000).

- La segunda forma de HIGM ligada al X está causada por mutaciones en el Nuclear factor κ B (NF- κ B) Essential Modulator gene **NEMO**), también conocido por IKK gamma. NEMO forma un complejo con IKK α e IKK β , dos fosfoquinasas. Después del crosslinking de CD40 la proteína inhibidora de NF- κ B (I- κ B) es fosforilada lo que da lugar a la liberación de NF- κ B permitiendo que se transfiera al citoplasma y después al núcleo. Los pacientes varones pueden presentar displasia ectodérmica anhidriótica e inmunodeficiencia, algunos presentan hipogammaglobulinemia con IgM elevada (Jain et al. 2001).

- Se desconoce cual es la causa del **HIGM-4**, aunque se supone que se trata de un defecto después de la actividad del enzima AID en la vía de señalización que lleva a la generación de anticuerpos. Muchos de los casos de hiper IgM causados por defectos intrínsecos a las células B no son debidos ni a defectos en AID ni en UNG.

En particular se han reconocido dos formas distintas en base a los hallazgos inmunológicos. En ambos el fenotipo clínico es similar a lo que se encuentra en la deficiencia en AID, con infecciones bacterianas sinopulmonares e intestinales recurrentes. La hiperplasia linfoide cuando está presente (aprox~ 50% de los casos) es mediana y no se asocia con centros germinales gigantes.

En la primera de estas dos formas, el defecto en CSR parece estar localizado por debajo de transcripción de la zona S pero anterior a la rotura del DNA. De manera llamativa, la SHM es normal tanto en frecuencia como en su patrón. El número de células B memoria es también normal. Desde el punto de vista clínico estos pacientes tienen un mejor pronóstico y no tienen predisposición a padecer autoinmunidad o tumores.

La segunda forma está caracterizada por un reducido número de linfocitos B y desde el punto de vista clínico estos pacientes son susceptibles de manifestaciones autoinmunes y posiblemente también tumores.

- Se han observado marcados defectos en CSR y en la formación de centros germinales en los modelos knockout de ICOS e ICOS ligando. Estos hallazgos junto con el descubrimiento de mutaciones homocigotas en **ICOS** en un adulto con fenotipo CVID hacen que esta pareja de receptor y ligando sean genes candidatos para el estudio en pacientes con fenotipo HIGM (Warnatz et al. 2006). Los fenotipos HIGM y CVID han sido también observados en subgrupos de pacientes varones con mutaciones en **Btk** o **SAP/SH2D1A**, genes responsables de XLA y XLP, respectivamente. Otros desordenes con inmunodeficiencia primaria presentan el fenotipo HIGM. Aproximadamente el 20% de los pacientes con hipogammaglobulinemia y deficiencia en MHC de clase II y un subgrupo de pacientes con A-T tienen elevadas la cifras de IgM en suero, aunque estas patologías pueden ser fácilmente reconocidas por los clínicos y confirmadas por test de laboratorio p.e. MHC II en superficie de células B o niveles elevados de α -fetoproteína en suero en el caso de AT. En la **Tabla I-9** se

INTRODUCCIÓN

muestra las frecuencias de defectos moleculares que dan lugar a un fenotipo de síndrome de hiper IgM descritos en una cohorte de 140 pacientes (Lee et al. 2005).

Tabla I-9. FRECUENCIA DE LOS DEFECTOS GENÉTICOS EN HIGM.

Genes	%	Número de pacientes		Número de familias
		Varones	Hembras	
CD40L	69,50%	98	0	77
AID	2,80%	3	1	4
CD40	0	0	0	0
NEMO	0,70%	1	0	1
ICOS	0	0	0	0
ICOSL	0	0	0	0
UNG2	0,70%	1	0	1
btk	2,10%	3	0	2
SAP	0	0	0	0
Desconocido	23,50%	24	9	30
Total	100%	130	10	115

Tabla I-9. **Frecuencias de los defectos moleculares en una cohorte de 140 pacientes con HIGM.** La deficiencia en CD40L es la más frecuente en los síndromes de hiper IgM (Lee et al. 2005).

1.4.2.3 **Tratamiento y pronóstico**

El tratamiento común para todos los pacientes con Síndrome de hiper IgM es la infusión regular de inmunoglobulinas endovenosas. Con ello se reduce la gravedad 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. Pero en ocasiones este tratamiento no es suficiente y se requiere el trasplante alogénico de médula ósea o de cordón umbilical de un donante compatible (Bordigoni et al. 1998).

El pronóstico a largo plazo de los pacientes con XHIM es peor que el de otras formas de hipogammaglobulinemias congénitas. Sólo un 20% de estos pacientes alcanzan la tercera década de vida y el 75% de estos tienen complicaciones hepatobiliares. La infección por *Pneumocystis carinii* tiene un impacto muy importante en la morbilidad y mortalidad durante los primeros 5 años de vida, mientras que las afectaciones hepáticas contribuyen a la mortalidad tardía.

1.5 Defectos en la función fagocítica

1.5.1 Enfermedad Granulomatosa crónica

La Enfermedad Granulomatosa Crónica es una alteración de la actividad microbicida de los fagocitos, originada por una disfunción del complejo enzimático nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH-oxidasa), esto hace que los fagocitos (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) de los individuos afectados sean incapaces de generar radicales del oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos) con actividad microbicida (Vignais 2002).

Esta enfermedad tiene una incidencia de uno entre 200.000. Desde el punto de vista clínico, los pacientes afectados presentan desde el primer año de vida infecciones recurrentes, graves por bacterias y hongos que compromete particularmente la piel, médula, ganglios linfáticos, pulmones, hígado y huesos. También es característica una exagerada respuesta infamatoria que cursa con formación de granulomas, manifestándose con dolor o cuadros obstructivos a nivel digestivo, biliar o urinario. El hecho de que el defecto se encuentre en la cadena respiratoria hace que los pacientes solo sean susceptibles a infecciones por organismos catalasa positivos, siendo los organismos infectantes más comunes *Aspergillus* y *Staphilococcus* (Winkelstein et al. 2000).

Los hallazgos de laboratorio más frecuentes son hipergammaglobulinemia, leucocitosis, anemia y velocidad de eritrosedimentación elevada. El diagnóstico de EGC se establece documentando la deficiencia en la capacidad oxidativa de los fagocitos. Existen varias pruebas de laboratorio disponibles para ello; el estudio clásico más comúnmente utilizado ha sido la prueba del nitroazul de tetrazolio (NBT). El número total de células T y de células CD4 y CD8 ha sido comparado entre los pacientes con EGC y donantes sanos, observándose que los pacientes con EGC tienen disminuido el número de linfocitos T, incrementándose esta diferencia con la edad (Heltzer et al. 2002). Se sabe que el estatus redox de las células T afecta a la proliferación y la oxidación de los factores de transcripción AP-1 y NFκ-B, lo cual podría intervenir en la proliferación y supervivencia de las células T (Lahdenpohja et al. 1998) (Hehner et al. 2000).

El 17% de pacientes con EGC cursan además con enfermedad inflamatoria intestinal, similar a la enfermedad de Crohn y un 3% cursan con Lupus eritematoso o discoide. Ciertos polimorfismos en lectina de unión a manosa (MBL) y en el receptor FcγRIIIa parecen modular en estos pacientes una susceptibilidad individual a padecer estas complicaciones inflamatorias específicas (Foster et al. 1998).

1.5.1.1 Defectos en la NADPH oxidasa y enfermedad granulomatosa crónica

La EGC está causada por alteraciones genéticas en alguno de los genes que codifican para las subunidades de la NADPH-oxidasa. La caracterización de las mutaciones de los pacientes con

INTRODUCCIÓN

EGC ha ayudado a dilucidar la estructura y función de los componentes de la NADPH-oxidasa. Este complejo consta de cuatro componentes, dos de ellos son de membrana (*p22-phox* y *gp91-phox*), el resto son proteínas citosólicas (*p47-phox*, *p40-phox* y *p67-phox*). Las primeras forman el citocromo tipo b (citocromo B558) de bajo potencial, que contiene dos centros redox de la oxidasa (hemo y flavina) y el lugar de unión NADPH. Para la activación del complejo las proteínas citosólicas (*p47-phox*, *p40-phox* y *p67-phox*) traslocan a membrana y se asocian con el citocromo, lo que permite la transferencia de electrones desde NADPH hacia el oxígeno molecular, como se puede observar en la **Figura I-9** (Gorlach et al. 1997). Los componentes citosólicos contienen dominios SH3 (src homology region 3), dominios que una regiones ricas en prolina, y son probablemente sitios de interacción entre los componentes de la NADPH oxidasa durante la activación.

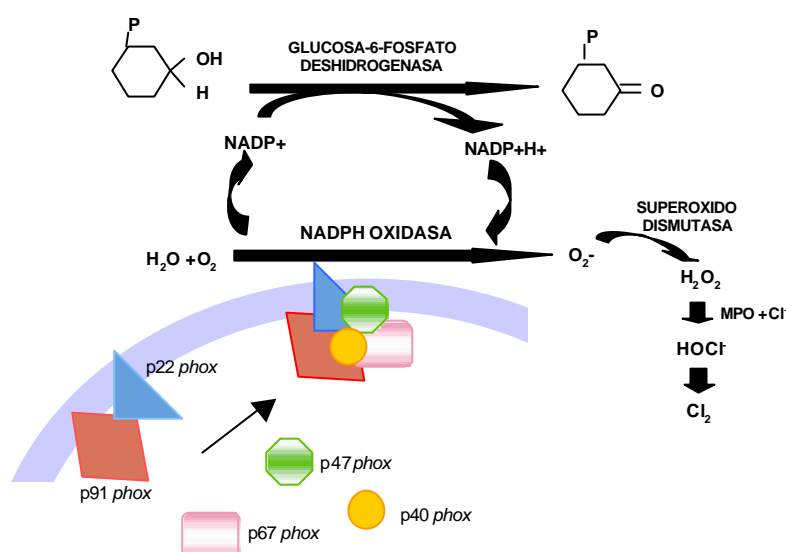


Figura I-9. **Modelo de activación del complejo NADPH oxidasa.** Las subunidades gp91phox y p22phox se ubican en la membrana celular formando el citocromo b558, mientras que otras, p47phox, p67phox y p40phox, lo hacen en el citoplasma. La activación del fagocito por diversos estímulos conduce a que los distintos componentes de la enzima se ensamblen dando funcionalidad a la misma con la consiguiente generación de metabolitos microbicidas.

En el sistema NADPH-oxidasa se transfieren electrones desde NADPH hacia el O₂ generando el anión superóxido (O₂⁻), por lo cual la alteración del sistema en una nula o muy baja actividad enzimática. Como consecuencia disminuye la capacidad microbicida derivada del superóxido, la cual es importante para la eliminación de potenciales patógenos. Además del papel microbicida, las especies reactivas del oxígeno pueden regular la función de factores de transcripción, la apoptosis y la producción de citocinas.

Los defectos en la cadena respiratoria han sido atribuidos a defectos en las células fagocíticas, los niveles proteicos de los cuatro componentes del complejo de la NADPH-oxidasa son mayores en las células mieloides, no obstante las células B también lo expresan y son capaces de

generar superóxido (Suzuki et al. 1999). Las células T y los fibroblastos son capaces de producir peróxido de hidrógeno, aunque el mecanismo no está suficientemente esclarecido (Meier et al. 1991)

Más de dos tercios de los casos de EGC tienen una herencia recesiva ligada al X que resulta de defectos en el gen *CYBB* (Nº Genbank X04001), el cual codifica para la subunidad gp91-*phox*. Se han descrito un gran espectro de mutaciones distribuidas en este gen que van desde inserciones, sustituciones dentro del exón, o en las uniones de empalme o dentro de la región reguladora por debajo de la región 5' (Heyworth et al. 2001). Por el contrario a este grupo de pacientes tan heterogéneos, la segunda forma más común de EGC es la pérdida funcional de la proteína p47-*phox*, que se da en un 25-30% del total de casos y en el 70% de los casos con herencia autosómica recesiva. Un defecto simple en el gen *NCF-1* (Nº Genbank M25665), como es la delección de GT (Δ GT) al comienzo del exón 2 genera un codón prematuro de terminación en el aminoácido 51 (Roesler et al. 2000). Por definición todos los pseudogenes contienen Δ GT al comienzo del exón 2, exactamente en la posición donde se encuentra la delección Δ GT en los pacientes con mutaciones en *NCF-1*. Esta delección es la diferencia clara entre el gen y los pseudogenes, los cuales son altamente homólogos (aprox. ~ 99% de identidad) y se encuentran físicamente muy cercanos al gen funcional, en la zona cromosómica 7q11.23. Este alto grado de homología entre *NCF-1* y sus pseudogenes (ψ *NCF-1*) complica el análisis molecular de las familias afectadas por la delección. (Heyworth et al. 2001).

En el resto de los pacientes con mutaciones autosómicas recesivas se encuentran afectadas las subunidades p67-*phox* y la p22-*phox* (Heyworth et al. 2003). Aun no se ha reportado ningún caso de EGC por un defecto genético en la quinta subunidad de la oxidasa p40-*phox*. Y sólo se ha identificado un paciente con defecto en el gen de Rac-2, una pequeña GTPasa requerida para la activación de NADPH oxidasa (Gu et al. 2001). En la **Tabla I-10** se recogen los diferentes defectos en las subunidades de la NADPH oxidasa, el porcentaje de incidencia de cada una de ella y el tipo de herencia.

Tabla I-10. FRECUENCIA DE LOS DEFECTOS GENÉTICOS EN EGC

(Heyworth et al. 2003).

<i>Proteína</i>	<i>Porcentaje de casos de EGC %</i>	<i>Forma de herencia</i>	<i>Grupo afecto</i>
<i>Citocromo subunidad grande gp91-phox</i>	75	Ligada al X	solo varones
<i>Citocromo subunidad pequeña p22-phox</i>	2	Autosómica recesiva	varones y hembras
<i>Proteína citosólica 47K</i>	20	Autosómica recesiva	varones y hembras
<i>Proteína citosólica 67k</i>	3	Autosómica recesiva	varones y hembras

INTRODUCCIÓN

1.5.1.2 *Tratamiento*

Un apoyo principal de la terapia en la ECG es el diagnóstico temprano de la infección, el uso puntual y agresivo de antibióticos apropiados. La búsqueda cuidadosa de la causa de la infección es importante para que la sensibilidad del microorganismo hacia los antibióticos pueda ser determinada. Los antibióticos intravenosos son generalmente necesarios para tratar infecciones serias en pacientes con ECG. Las transfusiones de granulocitos pueden ser de ayuda también para algunos pacientes cuando la terapia agresiva de antibióticos falla y la infección amenaza la vida (Segal et al. 2000).

Otro tratamiento de elección es el interferón gamma (IFN- γ), cuando reciben este tratamiento suelen tener menos infecciones y éstas, si ocurren, pueden ser menos serias (Mamishi et al. 2005). La calidad de muchos de estos pacientes ha mejorado de forma importante con el conocimiento de anormalidades genéticas, el temprano diagnóstico y la apreciación de la necesidad temprana de terapias de antibióticos agresivas en caso de infección. Además los últimos avances en el tratamiento han sido exitosos en la aplicación de la terapia génica y el TPH en los casos ligados al cromosoma X (Malech et al. 2007).

1.6 **Enfermedades de disregulación inmune**

1.6.1 **Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (ALPS)**

A partir de estudios totalmente divergentes, en roedores y en humanos, se descifraron las bases estructurales de un síndrome clínico muy similar al lupus eritematoso sistémico (LES). El Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (ALPS) fue descrito por primera vez en 1967 como una causa poco común de linfadenopatía en niños, generalmente acompañado de esplenomegalia, anemia hemolítica y trombocitopenia en los primeros dos años de vida. La presencia de hipergammaglobulinemia y autoanticuerpos contra eritrocitos y plaquetas hicieron que Canale y Smith postularan que este síndrome tenía una base inmunológica (Canale et al. 1967).

Los primeros hallazgos en ratones se remontan a 1976, con el descubrimiento de un ratón que presentaba una mutación espontánea en el cromosoma 19, y que daba origen a un síndrome caracterizado por la presencia de linfocitos T autorreactivos y autoanticuerpos (fenómenos de autoinmunidad) así como por un aumento en la sangre de linfocitos T maduros e inmaduros (linfoproliferación), razón por la cual estos ratones fueron denominados *lpr* (por lymphoproliferation) (Kellerer et al. 1976).

El esclarecimiento de los mecanismos moleculares del síndrome se inició con el descubrimiento de un anticuerpo que era capaz de inducir muerte celular programada o apoptosis al reaccionar contra una proteína de superficie, presente en la línea humana de fibroblastos FS-7, razón por la cual se denominó Fas (por **FS-7 cell line-associated surface antigen**) (Yonehara 1999). El gen humano que codifica para la proteína Fas (*TNFRSF6*) fue clonado y secuenciado, revelándose que se trataba de un receptor implicado en apoptosis, presente en la superficie de linfocitos T activados (Cheng et al. 1995). Su equivalente en ratones fue subsecuentemente identificado, clonado y localizado en el cromosoma 19, lo que permitió postular que el gen podría estar implicado en el síndrome linfoproliferativo de los ratones *lpr*. Posteriormente se demostró que los ratones *lpr* presentaban mutaciones en el gen que codifica para Fas, confirmando que un defecto en este gen es el responsable del síndrome linfoproliferativo. Estos hallazgos sugirieron que la regulación fisiológica de la apoptosis a través del eje Fas/Fas ligando (FasL) era esencial para eliminar linfocitos potencialmente autorreactivos y/o defectuosos durante su desarrollo en el timo y para eliminar el exceso de células después de que la respuesta inmune haya finalizado (Watanabe-Fukunaga et al. 1992) (Nagata et al. 1995).

Aunque el síndrome clínico ya había sido descrito en humanos por Canale y Smith, no fue hasta 1992 cuando Sneller y colaboradores encontraron dos pacientes con un elevado número de células T dobles negativas CD4-CD8- (DNTs) y se comenzó a denominar Síndrome linfoproliferativo autoinmune (Sneller et al. 1992). Lo que sugirió similitudes entre estos pacientes y los modelos

INTRODUCCIÓN

murinos de autoinmunidad *lpr/lpr* y *gld/gld*. En los cuales se observan mutaciones homocigotas en los genes Fas y FasL respectivamente, lo que fue crítico para el descubrimiento de la apoptosis en linfocitos (Davignon et al. 1985). Estos ratones modelo de LES, muestran linfoproliferación, elevado números de DNTs y nefritis autoinmune. Posteriormente, se demostró la presencia de mutaciones en el gen *TNFRSF6* en individuos que presentaban un desorden linfoproliferativo progresivo asociado con fenómenos de autoinmunidad y linfocitos T inmaduros (Fisher et al. 1995) (Rieux-Laucat et al. 1995).

El esclarecimiento de esta patología permitió a la vez descifrar un síndrome similar al de los ratones *lpr*, presente en los ratones *gld* (por generalized lymphoproliferative disease), cuyo defecto genético se encontraba en el cromosoma 1. El descubrimiento de las bases moleculares presente en los ratones *gld* permitió el hallazgo del ligando natural de Fas, el cual se localizó, al igual que el Fas, en la superficie de los linfocitos T activados. El gen que codifica para el FasL fue clonado en ratones y localizado en el cromosoma 1, lo que sugirió que un defecto genético en este gen era el causante del síndrome. De esta forma se logró descubrir que la enfermedad linfoproliferativa generalizada, presente en los ratones *gld*, era causada por mutaciones en el gen, *TNFSF6*, que codifica para FasL. En humanos, la presencia de este defecto genético fue descrita por primera vez en 1996 en un paciente que presentaba LES asociado a un fenómeno linfoproliferativo (Drappa et al. 1996). El conocimiento adquirido sobre el sistema Fas/FasL ha servido para descubrir que existen sitios inmunológicamente privilegiados tales como el ojo y las gónadas, con una alta expresión de FasL, evidenciando así un mecanismo natural para mantener estos sitios libres de linfocitos infiltrantes potencialmente peligrosos (Ferguson et al. 2006).

1.6.1.1 **Rasgos clínicos y diagnóstico**

En los pacientes con ALPS el comienzo de los síntomas es temprano, siendo la edad media de presentación los 24 meses de edad (Sneller et al. 1997), no obstante en algunos casos la **linfoproliferación** masiva es evidente al nacimiento indicando que el proceso comienza en el periodo prenatal. El número de linfocitos está incrementado, encontrándose aumentada una población inusual de células CD3 TCR $\alpha\beta$ CD4-CD8-, policlonal y puede encontrarse en un rango entre 1-60% de las células T. Las **manifestaciones autoinmunes** son el segundo acontecimiento más frecuente presentándose en un 70% de los pacientes, aunque la edad de comienzo varía considerablemente si se compara con el síndrome linfoproliferativo. Estas manifestaciones autoinmunes implican a los linajes hematológicos, dando lugar a anemia, trombocitopenia y neutropenia de origen autoinmune. No obstante, también se han observado otro tipo de manifestaciones como son glomerulonefritis, síndrome de Guillain-Barre, uveítis, artritis, hepatitis, diabetes; y manifestaciones autoinmunes que implican a la piel. Se han detectado además anticuerpos anti-cardiolipina, músculo liso, antígenos nucleares y factor reumatoide.

Dentro de las citopenias sanguíneas la que se observa más frecuentemente es la anemia hemolítica autoinmune en el 29-38% de los pacientes, seguida de la trombocitopenia autoinmune en

el 23-34% y de neutropenia autoinmune en el 19-27%. Estas citopenias son usualmente graves. Otros hallazgos muy frecuentes en estos pacientes son la hipergammaglobulinemia con niveles de IgM reducidos en suero. Algunos autores han basado el diagnóstico en los rasgos mostrados en la **Tabla I-11** (Bleesing et al. 2000).

Tabla I-11. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE ALPS

Rasgos requeridos
1.Linfoproliferación no maligna crónica
2.Apoptosis inducida <i>in vitro</i> vía Fas defectuosa
3.Un 1% o más de linfocitos TCR alpha/beta positivos DNT circulantes
Apoys
4.Enfermedad autoinmune
5.Historia familiar de ALPS
6.Características histológicas de ganglio linfático y bazo
7.Mutaciones en el gen de Fas, Fas ligando, caspasa 8 o 10

Adaptado de Bleesing, Straus y Fleisher.

El incremento de susceptibilidad a neoplasias, particularmente a neoplasias hematológicas, es el fenómeno más preocupante asociado con ALPS. Los datos actuales sugieren que el linfoma se desarrolla en un 10% de los pacientes con ALPS. Además las mutaciones en Fas representan un factor de riesgo significativo para el desarrollo de linfomas tipo Hodgkin y no Hodgkin, lo cual es consistente con la descripción de mutaciones somáticas en Fas tanto en leucemia como en linfoma en niños y adultos (Lopatin et al. 2001). Asimismo han sido reseñados casos de otras enfermedades malignas en ALPS, incluyendo carcinoma de hígado (en un paciente con hepatitis C), adenoma múltiple de tiroides y pulmón, junto con carcinoma múltiple de células basales en otro caso (Drappa et al. 1996).

La presencia de células DNT, la resistencia a la apoptosis *in vitro* en linfocitos activados, combinado con unos signos clínicos apropiados, linfocitosis periférica, autoanticuerpos circulantes e hipergammaglobulinemia policlonal es extremadamente sugestivo de ALPS.

El límite superior normal de células DNT (1%) ha sido cuestionado, con un umbral entre (2-6%) identificado por el grupo de Teachey en donantes sanos (Teachey et al. 2005). Estas células presentan una respuesta muy pobre a mitógenos, con una baja capacidad de producir factores de crecimiento y supervivencia como interleucina 2 (IL-2), pero que son capaces de segregar gran cantidad de Fas e interleucina 10 (IL-10) (Fuss et al. 1997; Lopatin et al. 2001), la sobreexpresión de esta última podría estar implicado en la proliferación de células B con mayor potencial autoinmune. Este patrón de citoquinas Th2 parece tener un papel en la activación de células B policlonales e hipergammaglobulinemia que contribuirían a una linfocitosis extendida de las células B en estos pacientes (Fuss et al. 1997).

INTRODUCCIÓN

Se ha postulado que estas células doble negativas podrían originarse de células simples positivas activadas que han recibido una señal inductora de muerte pero que muestran una incapacidad para morir, seguramente por un defecto en la señalización vía Fas (Renno et al. 1998). Las células DNT tienen un aumento de expresión de CD45RA, CD57 y perforina, lo que sugiere un origen fenotípico citotóxico, como si estos linfocitos hubieran perdido la expresión de CD8, de acuerdo con el similar origen de estas células encontradas en los ratones *lpr* y *gld* (Giese et al. 1995).

1.6.1.2 **Tipos de ALPS**

Los pacientes con ALPS muestran una amplia variedad en el grado de alteración de la apoptosis vía Fas, que se resumen en la **Tabla I-12**. Se han definido las siguientes formas de expresión de esta enfermedad:

ALPS 0- Ausencia de Fas

Es la deficiencia completa de Fas como consecuencia de mutaciones nulas homocigotas (Kasahara et al. 1998). Se han reportado tres casos con mutaciones homocigotas, los cuales presentan los típicos síntomas del clásico ALPS tipo Ia.

ALPS Ia- Mutaciones en Fas

Es consecuencia de mutaciones heterocigotas en Fas. El 60% se localizan dentro del dominio muerte (DD). Aproximadamente la mitad de las mutaciones resultan en productos truncados de la proteína y la otra mitad son moléculas con la secuencia modificada en una base (Rieux-Laucat et al. 1995).

ALPS Ib- Mutaciones heterocigotas en Fas ligando

Se ha reportado el caso de un paciente con una mutación heterocigota dominante en Fas ligando y linfoproliferación crónica (Wu et al. 1996). En este caso no se cumplen completamente los criterios de ALPS, ya que carece de linfocitos DNTs y de esplenomegalia.

ALPS Ic- Mutaciones homocigotas en FasL

Recientemente ha sido descrito por (Del-Rey et al. 2006) la presencia de una mutación homocigota en FasL en una paciente con rasgos clínicos e inmunológicos de ALPS, cuyos blastos T no inducen la muerte celular en líneas celulares como Jurkat y L1210.

Tabla I-12. FENOTIPO Y BASE GENÉTICA EN ALPS

ALPS	Genotipo	Comienzo del fenotipo/ severidad	Modelo murino
0	Mutaciones homocigotas en Fas	Prenatal/severa	<i>lpr/lpr, Fas-/-</i>
Ia	Mutaciones heterocigotas en Fas	Infancia/moderado-severa/ Autoinmunidad	<i>lpr^{cg}/lpr^{cg}</i>
Ib	Mutaciones heterocigotas en Fas ligando	Edad adulta / LES	<i>gld/gld</i>
IIa	Mutaciones en caspasa 10	Infancia/moderado-severa/ Autoinmunidad	desconocido
IIb	Mutaciones en caspasa 8	Infancia/moderado-severa/ Autoinmunidad	Casp 8 -/- (letal)
III	?	Infancia/moderado-severa/ Autoinmunidad	desconocido

ALPS IIa- Deficiencia en la caspasa 10

Un pequeño número de pacientes ha sido identificado con rasgos clínicos típicos de ALPS, secuencias normales en los genes Fas y FasL, pero con mutaciones en la caspasa 10. Jackson describió dos pacientes, uno de ellos con mutaciones heterocigotas en caspasa 10, heredadas de una madre asintomática portadora, y el otro con mutaciones homocigotas, con uno de los alelos heredado de un padre portador asintomático (Jackson et al. 1999). Ambos pacientes muestran linfoproliferación y complicaciones autoinmunes desde el primer año de vida, y tienen niveles de células DNT mayores incluso que en los pacientes clásicos. Estos pacientes muestran además defectos en la apoptosis en respuesta a estimulación vía TRAIL. El impacto inmunológico adicional de este defecto es una alteración en la apoptosis de las células dendríticas, dando una acumulación de células dendríticas en las áreas T de los ganglios linfoides, rasgo no presente en ALPS Ia.

ALPS IIb- Deficiencia en la caspasa 8

Se han descrito dos hermanos con mutaciones homocigotas en la caspasa 8, los cuales mostraban además de linfoproliferación, una inmunodeficiencia caracterizada por infecciones del virus herpes simple, infecciones sinopulmonares y respuestas alteradas frente a vacunas, pero sin rasgos de autoinmunidad. Estos pacientes muestran una apoptosis vía Fas defectuosa, así como una producción de IL-2 alterada en respuesta a la estimulación vía TCR, también muestran una expresión alterada de marcadores de activación, activación defectuosa de NK y una producción alterada de

INTRODUCCIÓN

anticuerpos. Estos pacientes son capaces de formar el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) pero este no será funcional ya que es incapaz de inducir la activación de la caspasa 3. Los portadores heterocigotos son asintomáticos. Este caso demuestra la importancia de la caspasa 8 en la activación de la señalización de células T naive además de su papel en la señalización de la apoptosis (Chun et al. 2002).

ALPS III –Defectos desconocidos

Incluso entre las primeras descripciones de ALPS se han identificado pacientes sin mutaciones identificables en la cascada de señalización de Fas (Sneller et al. 1997), pero con rasgos clínicos, histología e inmunofenotipo de la población de células DNT que los hacían indistinguibles de ALPS Ia. Este grupo de pacientes con signos clínicos e inmunológicos de ALPS como hipergammaglobulinemia, exceso de células T dobles negativas en sangre periférica muestran una capacidad normal de activar la vía de Fas *in vitro* y en los cuales no se han encontrado defectos moleculares. Aunque no se ha demostrado, es plausible que en estos pacientes esté afectada otra vía apoptótica de los linfocitos (Rieux-Laucat et al. 2003).

Los pacientes con ALPS tipo III pueden no cumplir los rasgos clásicos del síndrome, linfoproliferación, un número excesivo de DNTs, hipergammaglobulinemia y manifestaciones autoinmunes. Muchos casos de ALPS tipo III son esporádicos. Se encontraron pacientes con ALPS tipo III que mostraban mutaciones somáticas en Fas en células de linaje hematopoyético en ausencia de patología tumoral (Holzelova et al. 2004).

El grupo de Dianzani identificó un grupo de pacientes con un patrón clínico similar al de ALPS, con defecto en la apoptosis vía Fas, pero con niveles normales de células T dobles negativas y sin mutaciones en Fas o Fas ligando (Dianzani et al. 1997). Estos pacientes mostraban una apoptosis defectuosa inducida por ceramida pero normal en respuesta a metilprednisolona. Estos hallazgos sugieren un defecto por debajo de la formación del complejo DISC. A la enfermedad con falta de mutaciones en Fas y Fas ligando y sin la expansión de células doble negativas se le denominó **Dianzani's ALD (DALD)**. Existe una considerable heterogeneidad de defectos funcionales entre estos pacientes, y como en el ALPS tipo Ia, existe un componente hereditario con penetrancia variable, sugiriendo una implicación multigénica.

1.6.1.3 Apoptosis y homeostasis del linfocito

En el sistema inmune, la apoptosis es un rasgo esencial para la educación de los linfocitos en los órganos linfoides primarios a través de la selección negativa de las células potencialmente autoreactivas y la función efectora de las células citotóxicas que usarán distintos métodos para desencadenar la apoptosis en las células diana.

Fas tiene un importante papel durante la respuesta inmunológica, se expresa en bajos niveles en los linfocitos en reposo y su expresión aumenta tras la activación. Durante la **expansión clonal** que sigue al encuentro con el antígeno, Fas se expresa en altos niveles, pero no puede

desencadenar apoptosis, probablemente porque las células además expresan también altos niveles de Bcl-2 y FLIP regulando las primeras fases de la activación (O'Flaherty et al. 2000). Después de varios días (5-6 *in vitro*), FLIP y Bcl-2 disminuyen y las células comienzan a ser altamente sensibles a Fas ligando, el cual aumenta en la superficie de las células T activadas y en otras células en un ambiente de inflamación. De esta forma los linfocitos activados mueren, la respuesta inmune se extingue y los linfocitos expandidos serán parcialmente eliminados. Este proceso es controlado por IL-2, ya que los altos niveles de IL-2 modulan a la baja la expresión de FLIP (Haux et al. 1999).

El compromiso de la apoptosis viene determinado por el balance de señales pro- y anti-apoptóticas, las cuales son procesadas en un contexto concreto de maduración y de activación. En células T activadas la IL-2 parece ser un factor externo central que influye en este balance. El control que ejerce la IL-2 se llama "propioceptivo" o feedback control. En células en reposo o memoria hay bajos niveles de expresión de Fas y la necesidad de una señal de supervivencia IL-2, es superada por la upregulación de factores anti-apoptóticos.

Una vez activadas, las células proliferan (en respuesta a IL-2), la receptividad a señales pro-apoptóticas se incrementa con el número de ciclos que ellas sufren y son particularmente sensibles a la apoptosis en las fases G1/S. En este periodo, señales que hubieran activado a células en reposo, es probable que induzcan apoptosis en células ya activadas. Teniendo esta "estrecha ventana de supervivencia" para las células T activadas, la respuesta inmune puede ser controlada con una apoptosis pasiva, que elimine las células una vez el antígeno ha desaparecido y una apoptosis activa que elimine las células específicas contra antígenos crónicos y células T autoreactivas. La muerte celular programada es el mecanismo por el cual se lleva a cabo este balance y la apoptosis es la **descripción morfológica** de los subsiguientes cambios celulares. Una vez la célula decide entrar en apoptosis, el primer acontecimiento es la externalización de la fosfatidilserina en la membrana celular. Este hecho es secuencialmente seguido por el encogimiento de la célula y organelas, acidificación del citoplasma, condensación de la cromatina, fragmentación de la membrana plasmática y degradación intranucleosomal del DNA. Este proceso termina generando cuerpos apoptóticos. Las células fagocíticas tienen receptores para la fosfatidilserina, permitiendo que tanto células como cuerpos apoptóticos sean fagocitados (Dianzani et al. 2003).

Fas contiene tres dominios extracelulares ricos en cisteína (CRDs), CRD1 es el dominio que permite el ensamblaje por ligación, CRD2 y CRD3 son los lugares de mayor contacto con Fas ligando. Esta molécula forma homotrímeros en la membrana celular a los cuales se unirá Fas ligando. Fas ligando es una proteína trimérica de superficie tipo II, que pertenece a la familia del TNF y se libera en forma soluble en un proceso mediado por metaloproteasas.

La parte intracelular de Fas está formada por un dominio muerte (DD). Una vez se ha dado la interacción entre ambas moléculas, Fas recluta directamente la molécula adaptadora (Fas-associated death domain (FADD)). Este reclutamiento de Fas induce la formación de un complejo trimolecular llamado DISC, en el cual Fas y FADD interactúan a través de sus dominios DD. A los cuales se unen las caspasa 8 y 10 a través de un módulo llamado death-effector domain (DED). Este complejo poliproteico facilita el autoproteamiento de las caspasas 8 y 10 y la posterior activación de la cascada de las caspasas (**Figura I-10**).

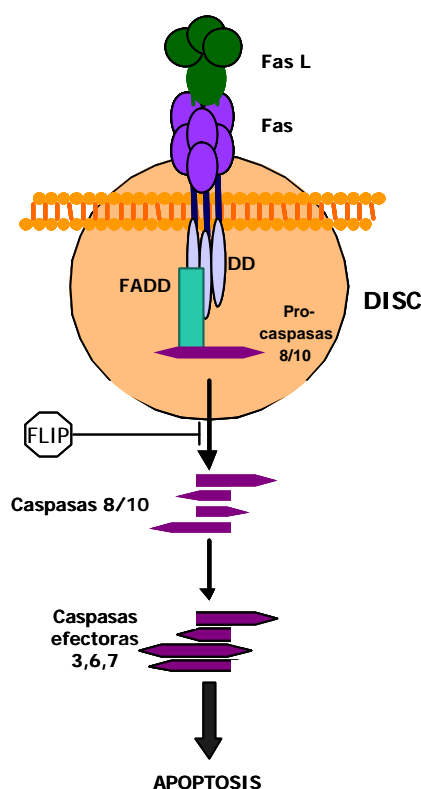


Figura I-10. **Complejo de señalización en la inducción de muerte celular programada.** La unión de Fas ligando a Fas resulta en un cambio conformacional en el dominio muerte de las moléculas de Fas, facilitando el reclutamiento de actina y la unión de FADD. FADD se unirá a las procaspasas 8 y 10. La formación del DISC facilitará el auto-procesamiento y activación de estas caspasas. Estas procesarán a su vez a las caspasas efectoras 3 y 7 resultando en la muerte celular por apoptosis.

La **cascada de las caspasas** es activada a través de dos vías interconectadas. La vía extrínseca que implica la activación directa de la cascada mediante la caspasa 8 y la vía intrínseca que implica la inducción de alteraciones mitocondriales causadas por la activación de la caspasa 9. Ambas vías convergen en la activación de caspasas efectoras, como son la caspasa 3, la 6 y la 7. La formación del DISC activará la parte auto-catalítica de la procaspasa 8 liberando la caspasa 8 como un heterotetrámero con dos subunidades pequeñas y dos grandes. La caspasa 8 activa romperá dos proteínas citosólicas incluyendo la procaspasa-3, la cual se activará y dirigirá el programa de muerte celular. También se ha reportado como la caspasa 10 puede activarse a través de DISC y catabolizar otros sustratos diferentes a los que lo son por la caspasa 8.

Al igual que otros receptores de superficie, la activación de Fas y la formación de DISC parecen depender de la organización del sistema celular membrana-citoesqueleto, así como de la polarización de la célula. La unión de Fas a actina se produce a través de Ezrin, proteína perteneciente a la familia ERM, lo cual es crucial para la señalización de Fas. Además la función de Fas parece también necesitar la unión a glicofosfolípidos y dominios de membrana ricos en colesterol llamados "rafts".

1.6.1.4 Estructura del gen *TNFRSF6*, mutaciones y penetrancia de la enfermedad

El gen *TNFRSF6* (MIM*134637) que codifica para Fas, consta de nueve exones que ocupan 26Kb en el cromosoma 10q24.1. Los exones 1-5 codifican la secuencia señal y tres dominios extracelulares ricos en cisteína responsables de la unión a Fas ligando. El exón 6 codifica el dominio transmembrana de Fas, y los exones 7, 8 y 9 codifican para la porción intracelular (**Figura I-11.**). El dominio muerte está localizado en el exón 9 y es una estructura de 80 aminoácidos conservada en genes relacionados con el receptor tipo 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1), incluyendo TNFR1, APT1, DR3, DR4 y DR5 (Singh et al. 1998). Este dominio es necesario y suficiente para transmitir la señal. El complejo funcional Fas es un receptor homotrimérico, el cual cuando interacciona con el homotrímico Fas ligando, transmite una señal de apoptosis vía dominio muerte. Esta vía es crucial en la homeostasis del linfocito, ya que elimina clones de células T autoreactivas (Brunner et al. 1995).

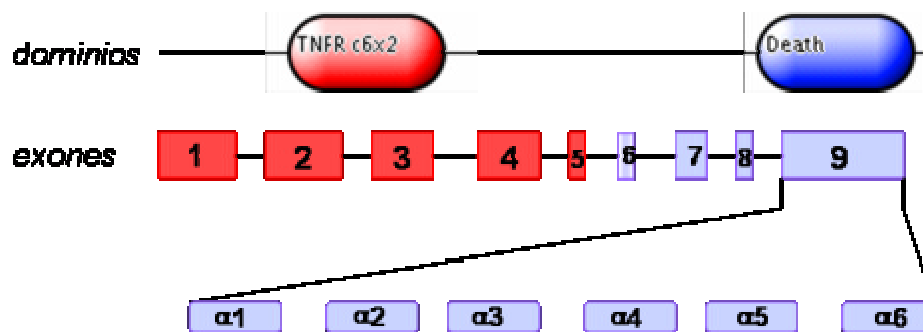


Figura I-11. **Dominios proteicos de Fas y estructura genómica del gen *TNFRSF6***, codificada por nueve exones, cinco de los cuales (1-5) codifican la región extracelular, el exón 6 la región transmembrana y los exones (7-9) la región intracitoplasmática. El dominio muerte está codificado por el exón 9, el cual está estructurado en 6 regiones.

1.6.1.4.1 Mutaciones más frecuentes y penetrancia

Las mutaciones en Fas tanto en ratones como en humanos tienen que ver con la apoptosis defectuosa del linfocito y autoinmunidad. Las mutaciones génicas pueden afectar al mRNA o a la expresión de la proteína, a su estabilidad o a su función. La distribución de mutaciones en el gen Fas se muestra en la **Figura I-12.**

Los datos de una de las series más largas de enfermos con ALPS muestra las siguientes frecuencias de mutaciones en Fas, de 70 individuos entre pacientes y parientes sanos pertenecientes a familias no relacionadas, 27 mostraban mutaciones, de ellos 16 (59%) se encontraban en el exón 9 (Jackson et al. 1999).

Como casi todas las mutaciones son heterocigotas, los modelos funcionales están basados en la co-expresión de la proteína mutada y la proteína salvaje dentro de una célula. Este tipo de

INTRODUCCIÓN

construcciones son incapaces de ligar FADD para activar el cascada apoptótica intracelular mostrada en la **Figura I-10**.

Recientemente ha sido publicado el análisis de mutaciones en la población de células dobles negativas en pacientes con rasgos clínicos de ALPS tipo III, encontrándose que algunos de estos pacientes portaban mutaciones somáticas dominantes en Fas (notablemente todas las mutaciones encontradas afectaban al dominio muerte) (Holzelova et al. 2004). Han sido descritas mutaciones en Fas en células de linaje hematopoyético en ausencia de cualquier condición de malignidad; siendo esta situación un ejemplo de enfermedad genéticamente adquirida no maligna en la cual se da una ventaja selectiva (resistencia a la muerte) a través de mutaciones en Fas.

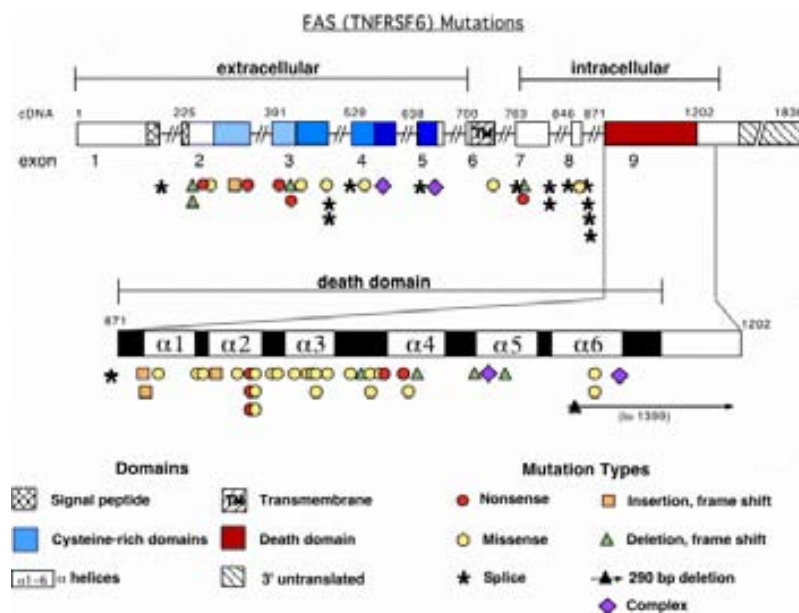


Figura I-12. **Representación de mutaciones gen *TNFRSF6*, que codifica para la proteína Fas.** Se presentan las mutaciones asociadas con ALPS, las variantes funcionales y los polimorfismos, esquema tomado de (Jackson et al. 1999).

Existe una gran **variabilidad en los rasgos clínicos** dentro de individuos de la misma familia con la misma mutación en Fas. Estudios recientes han analizado la penetrancia en relación con la localización de las mutaciones. Jackson et al estudiaron 60 familiares de enfermos con mutaciones en Fas, encontrando que un 18% de los familiares con mutaciones extracelulares mostraban uno o más rasgos de ALPS, frente al 88% de familiares con mutaciones intracelulares (Jackson et al. 1999). Los datos de Vaishnav et al mostraron que el 60% (6/10) de los familiares con mutaciones en la parte intracelular mostraban enfermedad, mientras que ninguno de los familiares con mutaciones extracelulares mostraba enfermedad 0% (0/5). También Rieux-Laucat mostró datos similares, con un 100% de penetrancia con mutaciones intracelulares y un 38% con mutaciones extracelulares (Rieux-Laucat et al. 1999; Vaishnav et al. 1999). Claramente este aumento de la penetrancia en familiares con mutaciones intracelulares parece estar estrechamente ligado al hecho de que la porción intracelular contiene el dominio muerte. No obstante, la existencia de familiares sanos con este tipo

de mutaciones sugiere la influencia de factores adicionales en el desarrollo del fenotipo ALPS. La señalización vía Fas implica a gran cantidad de proteínas, alteraciones en alguna de estas proteínas o en miembros relacionados con la vía o con la familia de Bcl-2 podrían combinarse con mutaciones en Fas, actuando dependiente o independientemente para contribuir al fenotipo de ALPS.

1.6.1.5 *Rasgos anatomopatológicos*

Lim et al exponen que el hallazgo patológico más notable y consistente en pacientes con ALPS es una expansión de la zona T paracortical de ganglio linfóide por células T doble negativas. La extensión de esta expansión es variable entre pacientes, sugiriendo que la hiperplasia paracortical se correlacionaría con el número de células T DN en sangre periférica. Cabe llamar la atención en que aunque las células T en el paracortex exhiben un fenotipo anormal, las células T dentro de los centros germinales muestran un fenotipo normal y son usualmente CD4 (Lim et al. 1998). En el bazo se puede encontrar una pulpa blanca moderadamente expandida con hiperplasia folicular y una prominente zona marginal.

Existe debate sobre el origen de las células DN, no obstante el peso de la evidencia sugiere que las células DNT son derivadas de células que previamente expresaron CD8 (Giese and Davidson 1995). Esta posibilidad ha sido apoyada por el hecho de que las poblaciones expandidas de linfocitos paracorticales expresan TIA-1 y perforina, marcadores asociados con células T citotóxicas. Estos hallazgos sugieren que sutiles trastornos inmunológicos además de los defectos en Fas deben ser los causantes de la expresión clínica de ALPS. Existen otras condiciones patológicas con linfadenopatía y trastornos inmunológicos, como el síndrome de Felty, LES y artritis reumatoide que se asocian con una apoptosis aberrante de las células B.

1.6.1.6 *Tratamiento*

Algunos de los tratamientos sintomáticos de elección en pacientes con ALPS son la esplenectomía, el tratamiento con inmunosupresores como la ciclofosfamida y los esteroides e incluso con drogas antimaláricas (pirimetamina y sulfadoxina) (van der Werff ten Bosch et al. 1998). Se describió el caso clínico de un paciente, con un defecto en el dominio muerte de la molécula Fas, con trombocitopenia resistente a la terapia convencional, que respondió a la combinación de rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20) y vincristina (Heelan et al. 2002).

Como tratamiento curativo el trasplante alogénico de médula ósea ha sido eficiente en algunos pacientes (Sleight et al. 1998). ALPS tipo 0 es curable con trasplante alogénico de médula ósea, indicando que las consecuencias de la deficiencia en Fas están restringidas a los linfocitos o al menos a células de origen hematopoyético (Benkerrou et al. 1997). El seguimiento longitudinal de varios pacientes con ALPS tipo Ia ha llevado a la conclusión de que existe una disminución significativa de la linfoproliferación en algunos de ellos con el tiempo, incluso en ausencia de tratamiento (Rieux-Laucat et al. 1999). En la mayoría de los casos el tratamiento tiene como objetivo

INTRODUCCIÓN

controlar las citopenias autoinmunes y la linfadenopatía. No obstante, no se ha descrito un tratamiento efectivo hasta el momento.

2 Células T

2.1 Estructura del receptor de la célula T (TCR)

El complejo TCR en la mayoría de las células T es un heterodímero formado por dos cadenas polipeptídicas transmembrana llamadas α y β , que se asocian no covalentemente con las cadenas CD3 $\gamma\delta\epsilon$, **Figura I-13** (Clevers et al. 1988). Ambas cadenas (α y β) presentan porciones extracelulares que contienen un dominio variable, N-terminal, y una región constante proximal a la membrana. Las cadenas α y β contienen una región "bisagra" corta, adyacente a la cara exterior de la membrana plasmática. Un residuo de cisteína en cada región bisagra contribuye a un enlace disulfuro que une las dos cadenas (Kuhns et al. 2006).

En ambas cadenas la porción transmembrana presenta residuos aminoacídicos hidrófobos. Una característica poco habitual de estas porciones es la presencia de residuos aminoacídicos cargados positivamente, entre ellos un residuo de lisina (cadena β), o un residuo de lisina y arginina (cadena α), que interaccionan con residuos cargados negativamente de la porción transmembrana de los polipéptidos CD3. Las cadenas α y β poseen colas citoplasmáticas C-terminales de 5 a 12 aa de longitud, las cuales son demasiado pequeñas como para mostrar una actividad enzimática intrínseca, por eso requieren otras moléculas asociadas físicamente al TCR para que funcionen como transductores de señales.

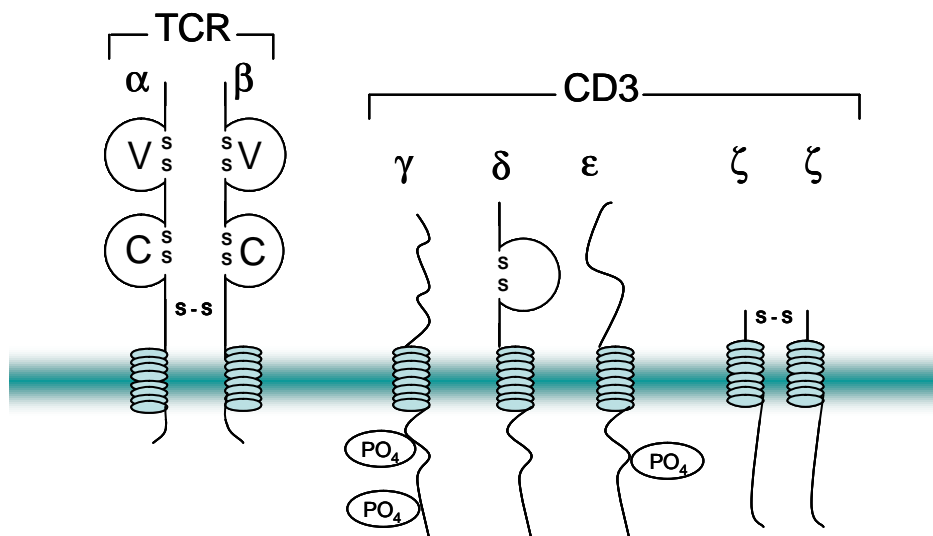


Figura I-13. **Estructura del receptor de las células T (TCR).** El complejo TCR consta del heterodímero $\alpha\beta$ asociado no covalentemente con las cadenas CD3 $\gamma\delta\epsilon$ y ζ que se asocia con los correceptores CD4 o CD8. Las cadenas α y β presentan porciones extracelulares que contienen un dominio variable, N-terminal, y una región constante proximal a la membrana.

INTRODUCCIÓN

Cada región constante del TCR tiene un dominio inmunoglobulina-like, un péptido de conexión denominado “connecting peptide motif” (CPM), un dominio transmembrana (TM), y un dominio citoplasmático. Las regiones V de las cadenas α y β del TCR poseen secuencias que son altamente variables entre los diferentes clones de células T, lo que refleja su papel en el reconocimiento del antígeno. Estas regiones altamente variables se denominan “regiones de alta diversidad” existen al menos tres y corresponden a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Por lo tanto, la superficie de unión al antígeno de un TCR consta de tres bucles horquilla hipervariables que aporta la cadena α y tres, la cadena β , dando un total de seis CDR.

Tanto las cadenas α como las β del TCR contribuyen a la especificidad en el reconocimiento de antígenos peptídicos unidos a moléculas del MHC, pero tanto su expresión como su función en la activación de estas células depende de otras cinco proteínas transmembrana que se asocian no covalentemente al heterodímero α - β , formando el llamado “Complejo TCR Funcional”. Tres de las proteínas de este complejo se denominan moléculas CD3 e incluyen a miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas de alta homología, llamados γ , δ y ϵ . Además, entre un 80 y un 90 % de los complejos contiene un homodímero unido por puentes disulfuro, cadena ζ , que no pertenece a la superfamilia.

Existen variedad de factores intrínsecos y extrínsecos que influyen en la expresión del repertorio del TCR en humanos. Entre los que se incluyen el sistema HLA, los polimorfismos de los genes del TCR, además de factores ambientales como infecciones y superantígenos. El repertorio del TCR es estable y policlonal en sujetos sanos. Aunque las poblaciones clonales tienen usualmente un sello de malignidad; se pueden encontrar poblaciones T clonales u oligoclonales dentro de condiciones no malignas incluyendo: las infecciones por VIH y EBV, la senectud, en autoinmunidad y en CVID, SCID, donde defectos en los genes RAG-1 y RAG-2 permiten sólo un número limitado de reordenamientos.

2.2 *Moléculas accesorias de las células T*

En el reconocimiento del antígeno, las moléculas CD4 y CD8 actúan como “correceptores”, facilitando la adhesión a la célula respectiva y participando en la transducción de señales tempranas al interior celular. Este reconocimiento es el estímulo para el inicio de la activación del linfocito T; constituye la primer señal, pero son necesarias dos señales extracelulares distintas para inducir la proliferación y diferenciación hacia células efectoras.

Esta segunda señal va a estar dada por las “moléculas coestimuladoras”, que son moléculas de superficie presentes en células presentadoras de antígeno (APC) y/o diana, y que interactúan con receptores específicos presentes en el linfocito T.

Los correceptores se describen a continuación:

- CD4 es una glucoproteína transmembrana, miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, que se unen al dominio β -2 del MHC-II con funciones de adhesión y señalización, se expresa en el 65 % de los linfocitos T circulantes. Es un monómero que además puede expresarse en monocitos y macrófagos; tiene cuatro dominios globulares extracelulares, incluyendo un dominio N-terminal, tipo V y tres que no son ni de tipo V ni C. Hay además una región transmembrana hidrofóbica y una cola citoplasmática de 38 residuos aminoácidos principalmente básicos.
- CD8 es una glucoproteína transmembrana que se une al dominio α -3 de las moléculas MHC-I, y es expresada en un 35 % de los linfocitos T circulantes; sus funciones son similares a las de CD4. Estructuralmente es un heterodímero unidos por puentes disulfuro compuestos por CD8- α y CD8- β , cada una posee un dominio globular extracelular, una región hidrofóbica transmembrana y una cola intracelular de 25 residuos aminoácidos básicos.

Funcionalmente, tanto CD4 como CD8 facilitan la adhesión entre células T y las APC o células diana. Además cumplen funciones de trasducción de señales a través de una proteína llamada Ick, con actividad de tirosín cinasa, que se asocia de forma no covalente a las colas citoplasmáticas de CD4 y CD8, Ick fosforila residuos tirosina en los ITAM de CD3 y ζ . Si bien los linfocitos T reaccionan con antígenos unidos al MHC, para una completa estimulación requieren moléculas coestimuladoras, junto a las señales inducidas por el antígeno. Una falta de coestimulación puede inducir un estado de falta de respuesta denominado “anergia”.

La expresión de las moléculas coestimuladoras se halla regulada por proteínas pro-inflamatorias y eso garantiza que los linfocitos sean activados en el momento y lugar adecuados. En condiciones fisiológicas también contribuyen a los fenómenos de tolerancia inmunológica. A continuación se detalla una descripción de las moléculas coestimuladoras:

- CD28 es una de las moléculas de superficie más importantes en la coestimulación para la activación del linfocito T. Se une a CD80 o B7-1 y CD86 o B7-2, expresadas en las APC; es un homodímero de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en el 80 % de las células T CD4 y en el 50 % de las CD8.
- Las B7-1 y B7-2 son glucoproteínas homólogas de cadena lateral sencilla, cada una con dos dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, una región transmembrana y una cola citoplasmática; además también pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas con iguales características y funciones que CD28.
- CD45 está formado por varias isoformas codificadas por un solo gen. Son proteínas intrínsecas con un dominio citoplasmático de 705 residuos aminoácidos, con actividad tirosín fosfatasa y que participa en la regulación de la respuesta.
- También hay integrinas implicadas en la interacción de adhesión de células T y otras células, como la LFA-1, que se asocia a la molécula de adhesión intercelular 1 o ICAM-1, que es una

INTRODUCCIÓN

glucoproteína transmembrana con cinco dominios extracelulares tipo inmunoglobulina. Otra molécula que media función de adhesión y estimulación es el CD2 o LFA-2, glucoproteína perteneciente a la superfamilia que se asocia con LFA-3 o CD52, presente en las células T.

2.3 *Maduración de la célula T*

2.3.1 *El timo en la maduración tímica*

Los linfocitos se originan a partir de células precursoras hematopoyéticas que salen inicialmente del hígado fetal, y posteriormente de médula ósea adulta para anidar en el timo. Progenitores de múltiples linajes entran en el timo pero solo los precursores de células T sobrevivirán. El ambiente tímico provee de estímulos requeridos para la proliferación y la maduración de estos precursores hacia células T maduras.

Esta idea se sospechó tras el estudio de inmunodeficiencias asociadas con el timo, tanto en humanos como en modelos murinos. Tal es el caso que si se timectomiza a un ratón neonatal, este animal será deficiente en células T maduras durante toda su vida. De la misma forma la ausencia congénita de timo que se da en el síndrome de DiGeorge está caracterizada por un número muy bajo de células T maduras circulantes y en tejidos linfoides periféricos con una severa deficiencia en la inmunidad mediada por células T.

En humanos el timo involuciona con la edad y es virtualmente indetectable tras la pubertad. No obstante, la maduración de las células T continúa a lo largo de toda la vida adulta, como se observa tras la reconstitución del sistema inmune en adultos. Aunque, las células T memoria se acumulan y la necesidad de generar nuevas células T disminuye en los individuos con la edad, el timo involucionado continua siendo el lugar adecuado para la maduración de células T. Los timocitos inmaduros, los cuales no expresan TCR, CD4, ni CD8, son detectados en el timo entre la séptima y la octava semana de gestación. Los timocitos migrarán desde los senos subcapsulares fuera de la región cortical del timo, a través de la corteza tímica y es allí donde comenzarán a expresar el TCR en superficie, para posteriormente ser restringidos por MHC de clase I o de clase II, pasando finalmente a médula tímica y salir del timo vía venas linfáticas.

La expresión del TCR es necesaria para una selección positiva y negativa, ya que ambos procesos dependen del reconocimiento específico de los MHC y antígenos propios en la superficie de células epiteliales tímicas, macrófagos y células dendríticas derivadas de médula ósea.

Dentro de la corteza, los timocitos interaccionan con las células epiteliales, que expresan tanto MHC de clase I y de clase II, como se indica en la **Figura I-14**. Estas junto con los macrófagos corticales y las células dendríticas expresan altos niveles de moléculas MHC de clase II; las células epiteliales medulares y las células dendríticas expresan tanto moléculas de MHC de clase I como clase II; y los macrófagos medulares expresan altos niveles de moléculas de clase I.

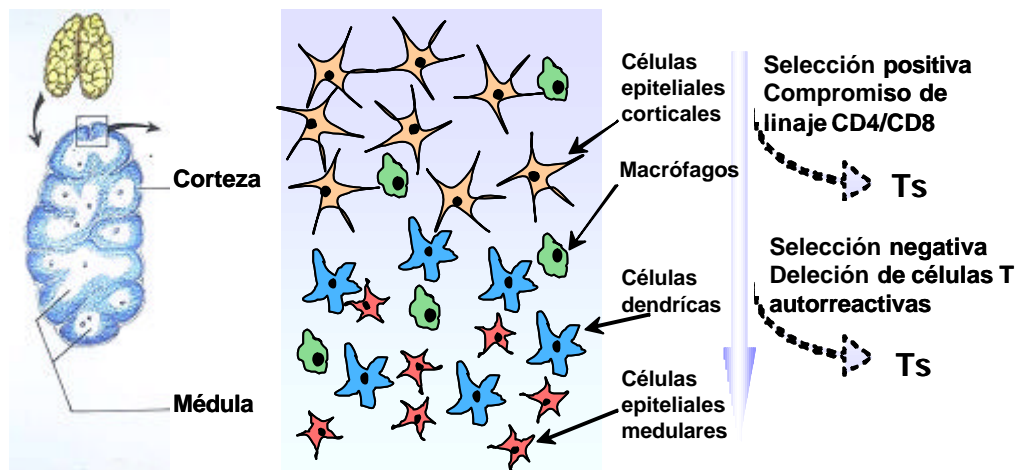


Figura I-14. **Estructura tímica.** La interacción de los timocitos con las distintas células presentes en el timo da lugar a procesos de selección que eliminarán los timocitos autorreactivos y seleccionarán células T con compromiso de linaje CD4 o CD8. Ts: célula T seleccionada.

La interacción de los timocitos maduros con las moléculas de MHC dentro del timo es esencial para la selección de un repertorio maduro de células T. Además, las células estromales tímicas incluidas las células epiteliales, secretan citoquinas, que estimulan la proliferación de células T inmaduras. La citoquina mejor definida como factor de crecimiento linfopoyético es la IL-7.

2.3.2 **Estados de maduración de la célula T**

****Desde dobles negativos hasta dobles positivos***

Los timocitos corticales más inmaduros que han llegado recientemente al timo desde la médula ósea, no expresan TCR, CD3, cadena ζ , CD4, ni CD8 y se les denomina timocitos dobles negativos (DN). Estas células DN constituyen aproximadamente entre un 1-5% del total de los timocitos y están subdivididos en varios estados de desarrollo de acuerdo con la expresión en superficie de las siguientes moléculas CD117 (c-Kit), CD44 (Pgp-1) y CD25 (cadena α del receptor de la IL-2). El desarrollo dentro de la población progresa desde CD117+44+25- (también llamados progenitores linfoides tímicos) hasta células CD117-44+25+ (llamadas células pro-T), luego pasan a CD117-44-25+ (llamadas células pre-T), y finalmente CD117-44-25- (Ellmeier et al. 1999).

El reordenamiento funcional y la subsiguiente expresión de la cadena β del TCR en el estado pre-T da lugar a la formación, junto con pT α , a un complejo pre-TCR funcional cuyas señales resultan en la proliferación y expansión de estos timocitos, (proceso denominado selección β). Diferentes defectos genéticos en ratones como el de RAG-1, RAG-2, TCR- β , pT α , CD3 ϵ , CD3 γ , p56^{lck}/p59^{fyn}, Syk/ZAP70, SLP-76, han mostrado la incapacidad de ensamblar el complejo de señalización pre-TCR

INTRODUCCIÓN

resultando en una parada en el desarrollo o un bloqueo al estado pre-T y una pérdida de expansión de las células en este compartimiento (**Figura I-15.**)

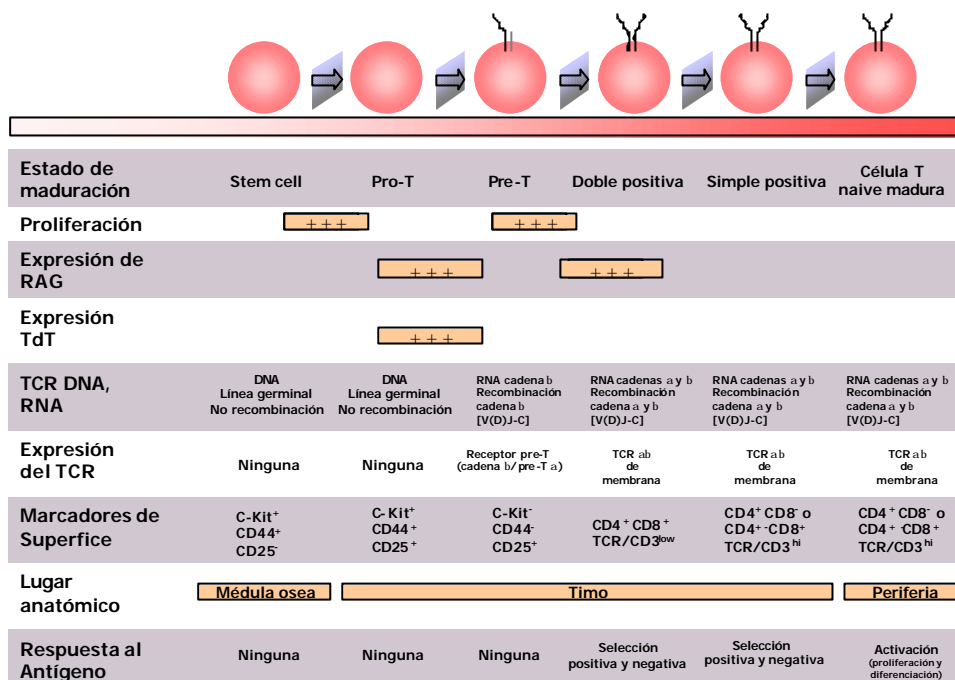


Figura I-15. **Esquema de maduración tímica.** Los precursores de las células T viajan desde médula ósea hacia el timo. MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; TdT, deosiribonucleotidil transferasa terminal.

Las señales transmitidas a través del complejo pre-TCR en timocitos DN no sólo causan proliferación y expansión, sino que también inducen al reordenamiento de la cadena α del TCR y la expresión de los correceptores CD4 y CD8; en ese momento se da la progresión al estado de dobles positivas (CD4+CD8+), que constituyen entre un 80-90% de los timocitos. El reordenamiento funcional de la cadena α del TCR y la disminución de la expresión de pT α da lugar a la expresión en superficie del receptor TCR $\alpha\beta$ maduro en los timocitos dobles positivos (DP).

****Desde doble positivos hasta linfocitos simples positivos***

El desarrollo de timocitos DP hacia células simples positivas (SP) depende de la expresión funcional del complejo TCR $\alpha\beta$ y de su productiva interacción con los complejos MHC/péptido expresados en las células del estroma tímico. La selección positiva y negativa asegura que sólo las células DP que expresan un complejo TCR sean capaces de reconocer complejos con MHC propio/péptido con una apropiada avidéz se desarrollen en timocitos SP maduros.

La **selección positiva** está mediada por la interacción del TCR con el antígeno propio presentado por las células tímicas epiteliales corticales. Se ha postulado la existencia de un umbral de afinidad para esta interacción que resulta en señales de supervivencia y diferenciación. Si la

avidez y afinidad de la interacción del TCR con el MHC/peptido propio se encuentra por debajo del umbral, los timocitos DP mueren por apoptosis. Este proceso asegura que solo se permita el desarrollo a los timocitos que expresan TCRs capaces de reconocer antígenos en el contexto propio MHC.

La **selección negativa** asegura que células T con TCRs capaces de interactuar con MHC propios que porten péptidos propios con alta avidez y afinidad serán eliminados por apoptosis, ya que supondrían una amenaza de autoinmunidad. La selección negativa en el timo puede estar mediada por diferentes tipos celulares, las más importantes son las células dendríticas y los macrófagos derivadas de médula ósea (Urban et al. 2004).

2.3.3 ***Modelos teóricos de selección positiva***

Las glicoproteínas CD4 y CD8 están implicadas en el reconocimiento y el desarrollo timocítico actuando como moléculas de adhesión que estabilizan el complejo TCR-MHC-antígeno por interacciones con las regiones no polimórficas de la moléculas MHC de clase I y clase II. Están coexpresadas en la superficie de timocitos inmaduros, participando como moléculas correceptoras en la selección positiva y negativa del repertorio de células T y en el compromiso de linaje que dará lugar a linfocitos T maduros. Si la maduración es completa, la expresión de CD4 y CD8 es mutuamente excluyente (Donda et al. 1996).

La interacción de TCR y los correceptores con los complejos MHC/péptidos propios es generalmente requerida para el desarrollo apropiado del paso de células DP hacia timocitos maduros SP. Por lo que se piensa que la expresión continua de un correceptor es esencial para mantener el requisito de avidez que permita una completa maduración de los timocitos SP, lo cual va acompañado de cambios en la expresión de varias moléculas de superficie, incluyendo el aumento de los niveles de TCR $\alpha\beta$, la expresión transitoria de CD69, y la disminución de la expresión de HSA (heat-stable antigen). Finalmente los timocitos seleccionados y maduros pasan al sistema inmune periférico, en el cual la expresión de CD4 y CD8 marca el fenotipo funcional de una célula T madura: las células CD4 helper que reconocen antígenos en el contexto de MHC de clase II y las células citotóxicas CD8, las cuales reconocen el antígeno en el contexto de MHC de clase I. No obstante, el mecanismo por el cual se dan las decisiones de linaje durante el desarrollo de la célula T sigue siendo objeto de estudio.

Aunque el TCR $\alpha\beta$ media ambas formas de selección tímica, la distinción entre las señales de la positiva y la negativa no son fáciles de definir. La selección positiva está mediada en parte por el dominio que conecta al péptido CPM de la cadena α del TCR. Se demostró que los timocitos que expresaban un TCR con CPM incompleto no eran capaces de seleccionarse positivamente de forma eficiente, pero si que podían seleccionarse negativamente, sugiriendo, que CPM facilita el tipo de señales específicas requeridas para la selección positiva (Backstrom et al. 1998).

Las dos principales escuelas de pensamiento sobre la selección positiva del repertorio de la célula T, ven este proceso tanto como un requerimiento aleatorio o como un proceso dirigido.

INTRODUCCIÓN

El **modelo estocástico** predice que la expresión de CD4 o CD8 en los timocitos doble positivos disminuye de una manera aleatoria y que solo las células con una correcta combinación de TCRs y correceptores (que es clase II restringida por el TCR y CD4 o clase I restringida por TCR y CD8) será diferenciada. Si los TCRs no pueden interactuar con los elementos apropiados restringidos por el MHC, la diferenciación final no se llevará a cabo. La interacción de los receptores CD4 o CD8 con el MHC no es suficiente para inducir la diferenciación en ausencia de una correcta combinación TCR-MHC; es decir solo se diferenciarán las células que expresan un apropiado TCR restringido por MHC.

El **modelo instructivo**, en cambio, predice que la expresión de CD4 o CD8 no disminuye de una manera aleatoria, si no que las células doble positivas con TCR restringido por MHC de clase I disminuirían la expresión de CD4 y las células con TCR restringido por MHC de clase II disminuirían la expresión de CD8. Este proceso se inicia con la interacción del TCR con un apropiado MHC, resultando en la diferenciación de timocitos que expresan tanto el TCR y el correceptor apropiado que une al MHC. La expresión constitutiva no rescataría a timocitos con diferencias en TCR y receptor. Se ha hecho un intento para distinguir entre los dos modelos por expresión constitutiva de CD4 y CD8 e intentando rescatar el desarrollo de timocitos con diferencias en TCR y correceptores. No obstante muchos de estos experimentos requieren la superexpresión del correceptor para rescatar eficientemente y en muchos casos la población no madura (Leung et al. 2001).

A parte de los modelos instructivo y estocástico para justificar el compromiso de linaje de CD4 y CD8, estudios más recientes sugieren un mecanismo conceptualmente diferente y más complejo para la elección de linaje e indican un requerimiento asimétrico de interacciones TCR-MHC para el compromiso hacia CD4 o CD8, este modelo recibe el nombre de **señalización cinética** "kinetic signaling". Este modelo postula que la elección de linaje CD4/CD8 no está determinada por diferencias en las propiedades de señalización de las proteínas correceptoras CD4 y CD8, sino más bien por diferencias en la duración de la señal del TCR debido a la cinética de expresión de los genes CD4 y CD8 durante la selección positiva, como se indica en la **Figura I-16**. Según este modelo, todos los timocitos DP seleccionados positivamente inicialmente interrumpen la transcripción del gen CD8 convirtiéndose en células intermedias CD4+CD8-; la elección de linaje es entonces determinada por la continuidad de la señalización a través del TCR.

Si la señal del TCR persiste resulta en la diferenciación de las células intermedias CD4+CD8- a células T CD4+ maduras, mientras que si se da una interrupción se da un cambio de correceptor y una diferenciación de CD4+CD8- a células T CD8+ maduras. Según Sarafova los eventos de señalización intratímica que dictan la elección de linaje CD4/CD8 se deben en último término a cambios en la transcripción de los genes de los correceptores.

Los genes de CD4 y CD8 emplean diferentes estrategias en su regulación transcripcional. La especificidad para el gen CD4 se logra por un elemento silenciador que activamente inhibe la transcripción de CD4 en el desarrollo de las CD8; mientras que la especificidad para el gen CD8 es lograda por diferentes elementos enhancer que promueven activamente la transcripción del gen CD8 en diferentes estados del desarrollo de las células T CD8 (Sarafova et al. 2005).

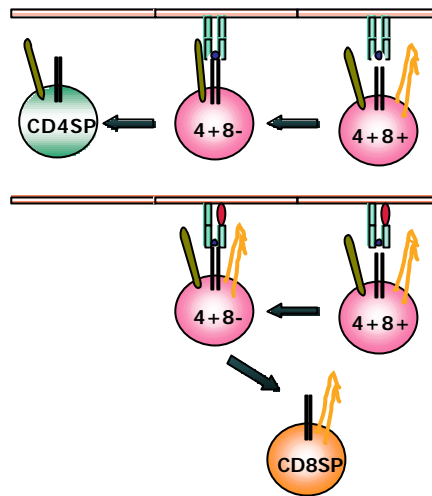


Figura I-16. **Esquema del compromiso de los timocitos CD4+CD8+ a células CD4 o CD8 según el modelo de señalización cinética.** En el cual la elección de linaje viene determinada por diferencias en la duración de la señal del TCR debido a la cinética de expresión de los genes CD4 y CD8 durante la selección positiva.

2.3.4 **Silenciador del CD4**

La expresión del gen CD4 está regulada principalmente a nivel transcripcional y controlada por una secuencia reguladora compuesta por un promotor, dos potenciadores o “enhancers” y un silenciadora. La especificidad de linaje de expresión del gen CD4 reside en este último, que es regulado de diferente manera a través de la maduración de la célula T y del compromiso de linaje por varios factores de transcripción (Ellmeier et al. 1999).

En el estado de silenciamiento de un gen, el DNA o las proteínas tienen que ser modificadas para unirse a las estructuras de cromatina reprimidas seguido de la replicación del DNA. Modificaciones epigenéticas bien documentadas como son la metilación del DNA y la deacetilación de histonas han sido descartadas como responsables de reprimir la transcripción del CD4 (Zou et al. 2001).

Taniuchi y colaboradores basándose en sus resultados proponen que la secuencia silenciadora del CD4 adopta diferentes funciones en el curso del desarrollo de las células T; siendo un represor activo en timocitos DN y un silenciador génico epigenético en linfocitos T maduros. El silenciador del gen CD4 está localizado en el primer intrón del gen CD4 y funciona restringiendo la expresión de dicho gen en subpoblaciones apropiadas de timocitos y de células T (Taniuchi et al. 2002). La secuencia del silenciador comprende 434bp, cuyo fragmento central es esencial para la función de silenciamiento de CD4 y se localiza entre los nucleótidos 165-265. Se conocen varios sitios de unión de factores de transcripción como HES-1, Runx3, SAF (silencer associated factor) y c-Myb. Mutaciones en estos sitios resultan en diferentes grados de desrepresión del CD4 en linfocitos T periféricos.

INTRODUCCIÓN

2.4 Células doble positivas (DP)

El fenotipo DP es característico de las células corticales del timo, sin embargo también se encuentra un pequeño porcentaje de células T DP en periferia. La existencia de linfocitos doble positivos extra-tímicos en humanos fue descrita por primera vez por Blue en 1985, encontrándose que la proporción de linfocitos T que coexpresan CD4 y CD8 en sangre periférica en individuos sanos no supera el 3% de los linfocitos T (Blue et al. 1985).

Las células T DP que se encuentran en sangre periférica son heterogéneas en la expresión de las moléculas CD4 y CD8. En base a los datos de citometría, se han dividido en tres grupos, células que expresan altos niveles de CD4 ($CD4^{hi}$) y CD8 α , células que expresan CD8 $\alpha\beta$ y bajos niveles de CD4 ($CD4^{lo}$) y finalmente células que expresan altos niveles de CD4 y de CD8 $\alpha\beta$ (Parel et al. 2004). Los estudios *in vitro* han proporcionado elementos que permiten comprender el origen de algunas de estas células. La expresión estable de CD8 α que se da tras cultivar células CD4 purificadas en presencia de IL4, parece dotar a la célula de una capacidad citolítica (Nascimbeni et al. 2004). Los estudios que han investigado el origen *in vivo* de estas células a través del análisis del TCR concluyen que las células DP $CD4^{hi}CD8\alpha\alpha$ representan una subpoblación de células T CD4 efectoras completamente diferenciadas. No existen estudios que demuestren el origen *in vivo* de células CD8 $\alpha\beta$ que expresan $CD4^{lo}$; no obstante, cuando células CD8 $\alpha\beta$ son activadas vía TCR llegan a ser capaces de expresar bajos niveles de CD4. Sobre esta adquisición, las células CD8 $\alpha\beta$ son susceptibles de la infección por VIH, e incluso a responder a IL-16 (Kitchen et al. 2002).

Sobre el tercer grupo de células, las que expresan $CD4^{hi}CD8^{hi}\alpha\beta$, se ha determinado su frecuencia y fenotipo *ex vivo* considerando marcadores de memoria, de activación, de homing, de diferenciación y maduración sin encontrarse diferencias entre estas células y las simples positivas. Aunque las células DP están presentes en muy baja frecuencia en sangre periférica de donantes sanos, existen expansiones con el fenotipo $CD4^{hi}CD8^{hi}\alpha\beta$. La presentación clínica de sujetos con este tipo de expansiones va desde individuos normales a pacientes con neoplasias, infecciones y patología autoinmune (Parel and Chizzolini 2004). A continuación detallamos estas situaciones:

*Existe la evidencia de un incremento en la frecuencia de células T DP durante infecciones víricas. Tanto en infecciones por VIH como en la infección por el EBV el porcentaje de células DP puede incrementarse hasta un 20% de los linfocitos circulantes (Weiss et al. 1998). También se ha observado que células CD8 pueden readquirir la expresión de CD4 después de infección con el virus herpes humano 6 (HHV-6) (Lusso et al. 1991). En estos casos las células pueden mostrar marcadores de activación como HLA-DR.

* El fenotipo T DP ($CD3+CD4+CD8+$) tiene cierta frecuencia dentro de las leucemias crónicas de células T. Las leucemias linfoides T crónicas se definen como leucemias de células T pos-tímicas por el grupo French-American-British (FAB) y se subclasifican en cuatro entidades: leucemia linfocítica granular (LGLL), leucemia/linfoma adulto de la célula T (ATLL), leucemia T prolinfocítica (T-PLL) y Síndrome de Sezary. En el estudio realizado por Mizuki, los pacientes con T-PLL muestran el fenotipo

CD4+CD8 $\alpha\beta$ + en el 21% de los casos, diferente de LGLL y ATLL que muestran el fenotipo CD4+CD8 $\alpha\alpha$ + (Mizuki et al. 1998). Así, el fenotipo CD4+CD8 $\alpha\beta$ + es infrecuente excepto en T-PLL, que es relativamente común. El estado de diferenciación en el que se encuentran estas células no está bien definido, aunque existen dos hipótesis, 1) que fueran células tímicas DP, siendo la única entre las leucemias crónicas T, y 2) que fueran células periféricas T activadas.

La T-PLL es una leucemia linfoide muy agresiva caracterizada por una profunda linfocitosis (mayor de $100 \times 10^9/L$), hepatoesplenomegalia y linfadenopatía en su presentación, con rápida progresión y corta supervivencia (típicamente menos de un año). A menudo se acompaña de infiltración linfoide en piel y médula ósea en grado variable (30-90%) (Zuckermann 1999). En la serie más amplia publicada hasta el momento de pacientes con T-PLL (Matutes et al. 1991), se ha visto que las anormalidades cromosómicas más consistentes son las que implican al cromosoma 14 con puntos de rotura en q11 y q32, en el 76% de los casos. Estas anormalidades suelen ser inversiones que implican a otros cromosomas. La trisomía 8 implicando iso 8q se da en la mitad de los casos y a menudo está asociada con reordenamientos del cromosoma 14 o 7. La morfología de los linfocitos leucémicos suele mostrar núcleos de contorno marcadamente irregular. No obstante, no hay rasgos morfológicos, ni cariotípicos asociados con mejor pronóstico; el único factor potencialmente asociado es el inmunofenotipo inmaduro (CD45RA+,RO-); Ya que es raro encontrar el fenotipo memoria (CD45RA-,RO+) en la enfermedad indolente (Garand et al. 1998).

Anormalidades clonales que implican al cromosoma 14 se han visto en ataxia-telangiectasia sin leucemia. Sugiriendo que los cambios cariotípicos podrían ser eventos pre-leucémicos y que un segundo evento sería requerido para el desarrollo de un proceso neoplásico declarado (Chun et al. 2002).

*A parte de las neoplasias hematológicas, el incremento de células DP ha sido referido en patología benigna como en la púrpura idiopática trombocitopénica, Síndrome de Behçet, miastenia gravis e incluso en algún adulto sin patología (Kay et al. 1990).

Las expansiones DP descritas por Tonutti y colaboradores son heterogéneas pero llama la atención rasgos fenotípicos comunes como son la menor expresión de CD7 y la alta densidad de expresión de CD45RO (Sala et al. 1993). De otro lado, evidencias genotípicas indican la presencia de monoclonalidad en individuos pertenecientes a cualquiera de los subgrupos lo que ha hecho especular que aunque estas expansiones sean heterogéneas, podrían representar expansiones pre-neoplásicas o no-neoplásicas de células DP normales con un fenotipo "congelado" de algunos eventos aun desconocidos (Tonutti et al. 1994). La presencia de altos niveles de expresión de CD8 en estas células, sumado al hecho de que presenten ambas isoformas del CD8, junto con la presencia de CD4 podría sugerir una capacidad funcional de interactuar tanto con moléculas MHC de clase I y clase II, aumentando su competencia inmunológica. No obstante, el significado clínico de un aumento de células DP está lejos de ser esclarecido.

OBJETIVOS

Dentro de la práctica en inmunología clínica, el reconocimiento de parámetros inmunológicos alterados permite identificar defectos que afectan al sistema inmunológico. Muchas de las deficiencias descritas a lo largo del último medio siglo han revelado vías moleculares de importancia en la biología del sistema inmunológico. En este trabajo se pretende analizar las características fenotípicas, genéticas y moleculares en pacientes con rasgos indicativos de Inmunodeficiencia Primaria o alteraciones en los componentes del sistema inmunológico.

Objetivos específicos:

- 1- Caracterización molecular de Inmunodeficiencias Primarias.
- 2- Estandarización de técnicas que permitan clasificar las patologías estudiadas dentro de las IDP y discriminar entre diferentes inmunodeficiencias.
- 3- Caracterización fenotípica y funcional en un grupo de pacientes con sospecha de Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (ALPS).
- 4- Determinación del origen y las características de la población de células T doble positiva CD4+CD8+, en un paciente con patología respiratoria.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras y líneas celulares

En el presente estudio se incluyen muestras de pacientes procedentes de las unidades de Pediatría, Pneumología y Medicina interna del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, y de la unidad de medicina interna del Hospital de Vall d'Hebrón de Barcelona. Las muestras de donantes sanos procedían del servicio de extracciones del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Las muestras de sangre total fueron obtenidas por punción venosa periférica. Se recogieron en tubos cónicos de 5 ml con EDTA o heparina. En todos los casos la sangre periférica fue procesada en las dos horas siguientes a su extracción.

En algunos de los estudios se ha trabajado con la línea celular Jurkat, línea de linfocitos T CD4.

2. Determinación de inmunoglobulinas.

2.1. *Dosificación de inmunoglobulinas*

La dosificación de las inmunoglobulinas IgM, IgA e IgG y la determinación de factor reumatoide y las proteínas del complemento C3 y C4 se llevó a cabo por la técnica de nefelometría con el equipo *IMMAGE (Coulter)*. Los valores de los distintos isotipos de inmunoglobulinas se dan en mg/dl. Los rangos normales de concentración de las inmunoglobulinas según la edad del individuo aparecen en la Tabla M 1, página 90.

2.2. *Determinación de subclases de IgG e IgA*

La determinación de subclases de IgG e IgA se realizaron por inmunodifusión radial con el kit (*Kit Athe Binding site@*), según el siguiente procedimiento:

1. Atemperar las placas 15 minutos antes de su utilización
2. Se realizan las diluciones de los sueros problema y controles
 - Ig G1 e Ig G2 a una dilución 1/10 (25µl suero / 225µl albúmina bovina (BSA) al 7% presente en el Kit). Ig G3 e Ig G4 sin diluir
3. Administrar 5 µl de los calibradores. (antes realizar un vortex) y 5 µl del suero problema.
4. Colocar la tapa de la placa e incubar en las siguientes condiciones:
 - A t.a. (22 °C) en cámara húmeda. Tiempo mínimo: 72 horas.
5. Medición del diámetro del anillo y calcular la concentración

2.3. *Inmunofijación*

Se realizaron inmunofijaciones mediante el kit *HYDRAS IF* con plantilla dinámica de SEBIA. Se siguieron las instrucciones del fabricante:

1. Se diluyen las muestras en dos tubos independientes, por una parte 50µl de diluyente más 10µl de muestra y por otra 200µl de diluyente más 100µl de muestra.
2. Se dispensan 10µl de muestra diluida por pocillo, una vez se han aplicado las muestras se deja que difundan en el aplicador durante 5 min.
3. Se colocan 200µl de H₂O en la zona de migración de HYDRASYS, y se colocan las esponjas tamponadas en su ubicación normal.
4. Posteriormente se dispensan los antisueros con la plantilla dinámica.
5. Se incuba con los antisueros 5 min. a 20°C, posteriormente se extrae la plantilla y blotting con papel de filtro grueso. Una vez se ha acabado el secado del gel, se transfiere al módulo de tinción.
6. Se visualizarán las proteínas teñidas con el colorante violeta ácido.

3. Determinación de autoanticuerpos

3.1. *Determinación de anticuerpos anti-nucleares (ANAs) por inmunofluorescencia indirecta sobre tejidos de rata*

3.1.1. Preparación de los tejidos

1. Se sacrifica una rata por dislocación cervical.
2. Se extraen hígado, riñones, estómago y timo y se depositan en una superficie limpia, humedecida con tampón fosfato salino (PBS).
PBS (pH 7.4): 0.5M Fosfato sódico
150 m NaCl
3. Se trocean los tejidos en porciones de 2 a 4 mm de tamaño y se montan piezas disponiendo un trozo de cada uno de los diferentes tejidos en una plantilla del criostato sobre una gota de resina *Tissue-TekOCT 4583*(Sakura Finetechnical Co.)
4. Congelar rápidamente los tejidos sumergiéndolos en N₂ líquido durante 2 min.
5. Las piezas se guardan congeladas a -40°C y en el momento de utilizarlas se trasladan al criostato.
6. Se hacen cortes de 5µm de grosor y se montan en portas, estos cortes se pueden congelar a -20°C hasta el momento de ser utilizados.

3.1.2. Inmunofluorescencia indirecta sobre tejidos de rata.

1. Se fijan los cortes por inmersión de los portas en paraformaldehido-lisina-periodato (PLP) durante 10 min. a 4°C seguido de un lavado con PBS durante 10min. a temperatura ambiente (t.a.).

PLP (pH 7.4):	0.5% Paraformaldehido
	10 mM Periodato sódico
	75 mM Lisina-HCl
	37 mM Fosfato sódico
2. Sin dejar secar en ningún momento los cortes se incuban con 50µl de cada uno de los sueros en estudio diluidos 1/40 y diluciones dobles progresivas en PBS. La incubación se realiza en cámara húmeda durante 20 min. a t.a..
3. Se retiran los sueros problema y se lavan las preparaciones con PBS durante 20 min., realizando tres cambios de la solución de lavado.
4. Se incuban con 50µl de una solución 1/40 en PBS de anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína contra inmunoglobulinas humanas (anti-human DAKO) durante 20 min. a t.a.
5. Se retiran las Igs y se lavan igual que en el paso anterior.
6. Se secan los portas y se deposita sobre cada corte una gota de glicerina tamponada a pH 7.2 (*bioMérieux*) poniendo después el cubreobjetos.
7. Los patrones de reactividad se analizarán con un microscopio de fluorescencia (*Carl Zeiss, Thornwood, NY*).

4. Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medida de emisión de fluorescencia y dispersión de luz, inducidas por la iluminación apropiada de las células, a medida que son arrastradas de una en una por un flujo portador frente a un sistema de detección. La citometría de flujo aprovecha el desarrollo de un amplio número de moléculas fluorescentes, que se unen específicamente a moléculas celulares, se acumulan selectivamente en compartimentos celulares o que modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas.

Mediante la citometría de flujo se definen las características físicas y químicas de las células que se clasifican en parámetros extrínsecos (antígenos de superficie) o intrínsecos (tamaño, morfología celular y rugosidad citoplasmática). Los parámetros Forward Scatter (FS) y Side Scatter (SS) permiten diferenciar las células por su tamaño y por su rugosidad respectivamente. De esta forma, la citometría de flujo permite detectar y cuantificar estructuras y funciones de células individuales o partículas biológicas aisladas, a elevada velocidad y siguiendo una aproximación multiparamétrica. Estas características la convierten en una técnica especialmente valiosa para caracterizar poblaciones celulares heterogéneas con amplia aplicación en estudios inmunológicos.

4.1. Panel de anticuerpos utilizados

4.1.1. Anticuerpos monoclonales utilizados en el diagnóstico

Las características de los anticuerpos monoclonales empleados en el estudio se detallan en la Tabla M.2. donde se especifican el fluorocromo y la casa comercial.

<i>MoAbs</i>	<i>Fluorocromo (marca)</i>	<i>MoAbs</i>	<i>Fluorocromo (marca)</i>
CD2	RD1/FITC (COULTER)	CD71	FITC (IMMTOOLS)
CD3	PE (DAKO)	CD95	PE (BD)
CD3	APC (DAKO)	CD103	FITC (IMMTOOLS)
CD3	PerCP (BD)	CD45/CD4/CD8/CD3	FITC/RD1/ECD/PC5 (COULTER)
CD3	PC5 (COULTER)	CD45/CD56/CD19/CD3	FITC/RD1/ECD/PC5 (COULTER)
CD4	FITC (DAKO)	anti-BTK	no conjuado (B-D)
CD4	PerCP (BD)	TCR $\alpha\beta$	PE (IMMTECH)
CD4	APC (DAKO)	TCR $\gamma\delta$	FITC (IMMTECH)
CD5	PE (IMMTOOLS)	IgM	PE (DAKO)
CD7	FITC (IMMTOOLS)	IgD	FITC (PHARMINGEN)
CD8 β	PE (IMMTECH)	HLA-DR	PE (IMMTECH)
CD8	PE (DAKO)	ICOS	PE (B-D)
CD8	PerCP (BD)	ICOS ligando	PE (BIOLEGEND)
CD8	FITC (COULTER)	CTLA-4	PE (BD Pharmingen)
CD11a	FITC (IMMTOOLS)	IL-7r	PE(R&D)
CD14	FITC (COULTER)	CXCR3	APC (BD)
CD18	PE (IMMTOOLS)	CXCR4	APC (BD)
CD21	FITC (IMMUNOTECH)	CXCR5	APC (R&D)
CD23		CCR3	PE (R&D)
CD25	RD1 (IMMTECH)	CCR4	PE (BD)
CD27	FITC (BD)	CCR5	FITC (BD)
CD28	FITC (IMMTECH)	CCR6	FITC (R&D)
CD40lig	PE (IMMTECH)	CCR9	FITC (R&D)
CD40lig	PE (B-D)	CCR7	IgM (BD)
CD44	FITC (IMMTOOLS)	Ms Anti Human IgM	FITC (BD)
CD45RA	FITC (BD)	ConA	Alexa-FLUOR 488 (INVITROGEN)
CD45RO	FITC (DAKO)	PHA	Alexa-FLUOR 488 (INVITROGEN)
CD45RO	PE (PHARMINGEN)	PERFORINA	PE (eBIOCIENCE)
CD62L	FITC (BD)	IgG1/IgG2a	PE/FITC (IMMTOOLS)
CD69	PE (IMMTOOLS)	IgG1/IgG2b	FITC/PE (IMMTOOLS)

Tabla M.2. **Anticuerpos monoclonales utilizados en citometría de flujo.** FITC, fluoresceína. PE o RD1, ficoeritrina. ECD, ficoeritrina-Texas-red. PC5, Ficoeritrina-Cianina 5.1. APC, Allofocianina, PerCP, proteína clorofila-Peridinina.

Para la tinción de receptores de quimiocinas se utilizaron las siguientes combinaciones de anticuerpos,

CXCR3	CXCR4	CCR4	CxCR5	CCR3
CD4-FITC	CD4-FITC	CD4-FITC	CD4-FITC	CD4-FITC
CD3-PE	CD3-PE	CCR4-PE	CxCR5-PE	CCR3-PE
CD8-PerCP	CD8-PerCP	CD8-PerCP	CD8-PerCP	CD8-PerCP
CXCR3-APC	CXCR4-APC	CD3-APC	CD3-APC	CD3-APC

CCR5	CCR6	CD27	CCR9	CD62L
CCR5/FITC	CCR6/FITC	CD27-FITC	CD4-FITC	CD62L-FITC
CD8-PE	CD8-PE	CD8-PE	CCR9-PE	CD8-PE
CD4-PerCP	CD4-PerCP	CD4-PerCP	CD8-PerCP	CD4-PerCP
CD3-APC	CD3-APC	CD3-APC	CD3-APC	CD3-APC

IL-7R-alpha	CD45RA	CD45RO	CCR7
CD4-FITC	CD45RA-FITC	CD45RO-FITC	CCR7 (BD) IG M Mouse
IL/7R-PE	CD8-PE	CD8-PE	Rat Anti Mouse Ig M-FITC(SBA)
CD8-PerCP	CD3-PerCP	CD3-PerCP	CD8-PE
CD3-APC	CD4-APC	CD4-APC	CD4-PerCP
			CD3-APC

Tabla M.3. **Combinaciones utilizadas para estudiar los receptores de quimiocinas.**

4.2. Separación de células mononucleares de sangre periférica

Para el análisis citométrico se utilizó sangre entera y suspensiones de células mononucleares.

1. Se procede a la separación de células polimorfonucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de un gradiente de densidad. Para ello hemos utilizado *Lymphoprep Ficoll-Hypaque* (Nicomed, Pharma As, Oslo, Norway).
2. Diluimos la sangre en PBS (dilución 1:2 en PBS) y añadimos, dejando resbalar la muestra por la pared del tubo inclinado, de forma que la sangre quede sobre la superficie del *Lymphoprep*, sin mezclarse con él.
3. Centrifugamos la muestra durante 20 min. a 800g a t. a.
4. Observamos los diferentes estratos en orden ascendente: en el fondo del tubo se depositan los hematíes y granulocitos; por encima, se encuentra una capa que contiene las plaquetas. Se observa un anillo más o menos denso, de células mononucleares a recuperar; por encima, se encuentra el plasma diluido. Recogemos las células mononucleares que quedarán separadas en la interfase mientras que los eritrocitos y los neutrófilos se ubicarán en el fondo del tubo.
5. La interfase se recupera por aspiración y se transfiere a otro tubo donde se lavará 2 veces con PBS frío durante 10 min. y se centrifugará a 800g a 4 °C. Antes del último lavado se toma una alícuota de la suspensión celular y se realiza el conteo de células

MATERIAL Y MÉTODOS

en cámara de *Neubauer* (*Hycor biomedical inc.*) mediante exclusión con azul de tripán: *Trypan Blue solution* (0,4%) (*Sigma, St. Louis, MO*)

6. Tras la centrifugación descartamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet celular con medio de cultivo a la concentración deseada.

4.3. Preparación de las muestras

Para el marcaje de células de sangre periférica utilizaremos una tinción directa procediendo de la siguiente manera:

4.3.1. Tinción directa (IFD)

1. En tubos de polipropileno de 12 x 75 mm, se dispensan 50 a 100 μ l de suspensión celular correspondiente (sangre periférica o PBMCs) previamente ajustada a una concentración de 1×10^6 cel/ml. Si se trata de PBMCs se lavan previamente con PBS + 1% Fetal Calf Serum (FCS) (*Bio Whittaker, Vervies Belgium*) + 0.05% Azida sódica.
2. Se añaden 5-10 μ l de cada anticuerpo monoclonal conjugado o del correspondiente control isotipo y se incuba durante 15 min. a t. a. en oscuridad.
3. Se pasan las muestras por el *TQ-prep* (*Coulter*) que es un aparato que permite de forma automática, lisar los hematíes, estabilizar el pH y fijar las células. El aparato *TQ-prep* (*Coulter*) dispensa las siguientes soluciones:

Solución A: Ácido fórmico (lisa hematíes).

Solución B: Carbonato sódico, cloruro sódico y sulfato sódico (estabiliza el pH y la osmolaridad).

Solución C: Paraformaldehído (fija las células).

4. Analizar las poblaciones celulares marcadas, seleccionando previamente la población linfocitaria en un histograma de dos dimensiones lineal mediante los parámetros FS y SS.

4.3.2. Tinción indirecta (IFI)

1. Se lavan las células con PBS + 1% FCS + 0.05% Azida sódica.
2. Se le añade el anticuerpo diluido en suero de conejo inactivado a una dilución 1/10.
3. Se incuban 45-30 min. en hielo.
4. Se lavan dos veces PBS + 1% FCS + 0.05% Azida sódica, y se les añade el anticuerpo secundario también diluido.

5. Se incuban 45-30 min. en hielo y se vuelven a lavar.
6. Se resuspenden en 1ml de PBS para analizarlas por el citómetro de flujo *Epics XL-ML* (Coulter, Miami, Florida).

4.3.3. Tinción intracelular

La tinción intracelular para la detección de la protein cinasa de Bruton (Btk) mediante citometría se realizó con el kit de tinción intracelular *Intrastain (K2311DAKO, Dinamarca)* siguiéndose el protocolo:

1. Utilizar 10^6 células y diluir en PBS hasta un volumen total de 200 μ l.
2. Marcar con 2 μ l de CD3-PC5 y otros 2 μ l de CD14-FITC durante 20 min. en oscuridad.
3. Lavar con PBS a 800g durante 5 min. a 4°C.
4. Resuspender el pellet en 100 μ l y dividir cada tubo en dos (50 μ l por tubo).
5. Añadir 100 μ l de DAKO *IntraStain Reagent A* (4% paraformaldehído en PBS) Vortex. Incubar 15 min. a t. a. en oscuridad.
6. Lavar con PBS a 800g. durante 5 min. a 4°C.
7. Decantar dejando 50 μ l aproximadamente.
8. Añadir 100 μ l de DAKO *IntraStain Reagent B*. Incubar a t.a. durante 15 min.
9. Lavar con tampón de lavado (WB) (PBS + 1% FCS + 0,1% azida) a 800g 7 min.
10. Añadir 100 μ l de la dilución 1/50 del anticuerpo anti- α -actina en WB+10% de SCI (dilución final 1/100). Incubar 30-45 min. en hielo.
11. Lavar con WB a 800g 5 min. (3x).
12. Incubar con 100 μ l de la dilución 1/100 del anticuerpo anti-mouse IgG1 RAH-PE en WB+10% de SCI durante 30-45 min. en hielo (dilución final 1/200).
13. Lavar con WB a 800g 5 min. (3x).
14. Analizar la expresión las muestras por el citómetro.

La tinción intracelular para la detección de perforina se realizó con el kit de tinción intracelular *Intrastain (K2311DAKO, Dinamarca)* siguiendo el protocolo:

1. Pipetear 100 μ l de sangre de la muestra y de un control.
2. Añadir 3 μ l de anti-CD3-PC5 y 5 μ l de anti-CD8-FITC e incubar 15min. en oscuridad a t.a.
3. Dividir cada tubo en dos (50 μ l aprox.) y añadir 100 μ l del reactivo *IntraStain Reagent A*, vortear e incubar 15min. a t.a.
4. Lavar con 2ml de PBS (600g. 5 min. a 4°C)
5. Descartar sobrenadante y añadir 100 μ l del reactivo *IntraStain Reagent B* y 2 μ l de anti-perforina-PE en uno de los tubos y 5 μ l del control isotipo IgG2b-PE en el tubo control. Vortear e incubar 15 min. a t.a.

MATERIAL Y MÉTODOS

6. Lavar con 2ml de PBS (600g. 5 min. a 4°C). Descartar sobrenadante, añadir *ISOTON^o* *II diluent Coulter^o* y analizar en el citómetro de flujo.

4.3.4. Estudio del Repertorio TCR por citometría

El Kit *IOtest[®] Beta Mark (Beckman Coulter)* es una herramienta de análisis multiparamétrico diseñado para la determinación cuantitativa del repertorio TCR V β en linfocitos T humanos por citometría de flujo. Aprovechando las especificidades V β se agrupan combinaciones mutuamente excluyentes siendo posible la determinación de tres tipos diferentes de V β en el mismo tubo combinando tres anticuerpos monoclonales con dos fluorocromos. El primer anticuerpo está conjugado con FITC, el segundo está conjugado con PE y el tercero es una mezcla cuidadosamente balanceada de la mezcla de FITC y PE. El kit está compuesto por 8 viales que contienen las mezclas de anticuerpos para las correspondientes especificidades V β del TCR, cubriendo el 70% del repertorio. Se realizó según instrucciones del fabricante.

5. Estudios de función linfocitaria

5.1. Condiciones de cultivo estándar

Una vez separadas las células mononucleares de sangre periférica según el apartado 4.2. se resuspenden en medio *RPMI 1640 (Bio Whittaker, Norway)* suplementado con un 10% de FCS, penicilina a una concentración 100 U/ml, y estreptomycin a 100 μ g/ml (*Bio Whittaker, Vervies Belgium*), y glutamina (*Gibco BRL, Rockville MD, USA*) a una concentración de entre 2-4x10⁶ cfs/ml. Las células se cultivaron en frascos de cultivo (*TPP, Trasadingen, Switzerland*) en las siguientes condiciones: 37°C de temperatura y 5% de CO₂ y una humedad relativa saturante del 90%.

5.2. Estimulación con fitohematoglutina (PHA) e interleucina 2 (IL-2)

Los mitógenos son agentes capaces de activar muchos clones de linfocitos, con independencia de sus especificidades antigénicas, PHA lo hace con los linfocitos T. Una vez separadas las células de cada paciente se resuspenden en el medio de cultivo con PHA-M (50ug/ml) (*L8902 Sigma, St. Louis, MO*) y IL-2 recombinante humana (*Biosource International, Camarillo, CA*). El cultivo se mantiene durante una semana añadiendo IL-2 a los cuatro días del inicio.

5.3. Estimulación con phorbol 12- myristate-13-acetate (PMA) e ionóforo

Los ionóforos aumentan la concentración del calcio iónico en el citoplasma produciendo una activación de las células T, que permite a las pocas horas evaluar los signos precoces de activación como es la expresión de CD69 y de CD40 ligando.

1. Una vez separadas las células se ajustan a una concentración de 5×10^5 cels/ml.
2. Seguidamente se añade 1ml de suspensión celular por pocillo al cual se incorpora PMA e ionomicina (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO*) de 10ng/mL y 1µg/mL, respectivamente.
3. Se incuban en cámara de CO₂ durante 4 horas a 37°C con 5% de CO₂.
4. Una vez pasado este tiempo se recogen las células de los pocillos y se marcan con anti-CD3-PC5 y CD40ligando-PE, posteriormente se analizan por citometría.

5.4. Proliferación celular

La prueba de proliferación de linfocitos inducida por mitógenos *in vitro* se utiliza para evaluar la inmunidad celular. El método tradicional para la prueba de linfoproliferación utiliza linfocitos purificados por gradiente de centrifugación como fuente de células para el cultivo y la captación de timidina tritiada como método de medición de la proliferación. Se fundamenta en que las células en proceso proliferativo inducido por el mitógeno, incorporan la timidina marcada radioactivamente con tritio [³H] como base para la síntesis del nuevo ADN; por lo tanto estima el número de células que están proliferando. La incorporación a la cadena de DNA de una timidina-[³H] bloquea el proceso de síntesis de manera que las células replican el DNA pero no se siguen dividiendo. La incorporación de timidina-[³H] será proporcional a la síntesis total de DNA. El nivel de proliferación se evalúa en función del nivel de radioactividad alcanzado por las células en cultivo

Se utiliza como muestra sangre periférica heparinizada y estéril de cada paciente y de un control (sujeto sano). Se aíslan los linfocitos por gradiente de ficoll (sección 4.2.), se lavan tres veces con PBS y resuspenden en dos mililitros de medio de cultivo con 20% de suero AB.

Se ajustan a la concentración de 10^6 linfocitos/ml. Se utilizan los siguientes medios de cultivo:

Solución A: 50ml de medio RPMI-1640
1 ml glutamina
20 µl de penicilina
25 µl de estreptomina

Solución B: 40ml de solución A
10ml de suero humano AB previamente testado y descomplementado a 57°C durante 30 min.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las diluciones de los distintos estímulos de activación:

- PHA (fitohemaglutinina) (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO*)
- PWM (Pokeweed) (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO*)
- SEA (Enterotoxina A del *Stafilococo aureus*) (*Sigma, St. Louis, MO*)
- SEB (Enterotoxina B del *Stafilococo aureus*) (*Sigma, St. Louis, MO*)
- Anticuerpo anti-CD3 (*OKT3; ATCC*)

Procedimiento:

1. Se utiliza una placa de 96 pocillos de fondo plano, se aplica 50µl de cada estímulo y 100µl de suspensión de linfocitos ajustados en cada pocillo.
2. Se incuban en cámara de CO₂ durante 48 horas a 37°C con 5% de CO₂.
3. Se añaden 10µl de timidina-[³H] a una dilución final de 1µCi 25mCi/mmol por pocillo (*Amershan International*) y se incuban en estufa con 5% CO₂ durante 18 horas.
4. Filtrar los cultivos utilizando el aparato de filtración (*SKATRONAS*). Medir la cantidad de radiación beta emitida por cada filtro (*FilterMat. Skatron*), añadiendo 1ml de líquido de centelleo (*Tri-Carb 2100TR Packard*).
5. Los resultados se expresan en cuentas por minuto (c.p.m.)

5.5. Cuantificación de la actividad respiratoria oxidativa en monocitos y granulocitos. *Bursttest-NBT* para diagnóstico de enfermedad granulomatosa crónica

Este test permite determinar cuantitativamente la respiración oxidativa en leucocitos. La evaluación de la actividad respiratoria oxidativa se lleva a cabo por la exposición de los leucocitos a distintos estímulos como son el ligando de la protein cinasa forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y un preparado de bacterias opsonizadas *E. coli* sin marcar como estimulantes de gran actividad. Las células estimuladas capaces de producir metabolitos derivados de la oxidación (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso) convertirán el sustrato fluorogénico dihidrorodamina-123 en rodamina-123. La evaluación de esta actividad biológica se realiza mediante citometría de flujo, el análisis determina el porcentaje de células que han producido radicales oxígeno. Una actividad respiratoria ausente o reducida puede estar asociada a enfermedades genéticas como la granulomatosa crónica.

Prueba funcional que se realiza con sangre heparinizada.

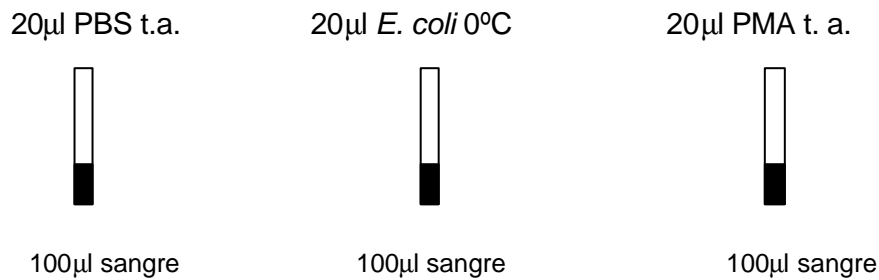
Reactivos:

- 1- Solución de lavado PBS
- 2- Solución lisis en H₂O 10X (2µl por muestra)
- 3- Sustrato, prepararlo 30 min. antes de usar.

- 4- Solución tinción DNA
- 5 PMA (dilución 1/200 en PBS)
- 6 *E. coli* a 0°C

Procedimiento:

- 1- Poner 100µl de sangre en cada tubo. Incubar la muestra para el estímulo *E. coli* 10 min. en baño de hielo.
- 2- Utilizamos tres tubos:



- 3- Incubar 10 min. a 37°C
- 4- Añadir 20µl de sustrato y vortex.
- 5- Incubar 10 min. a 37°C.
- 6- Se añade 2 ml de solución de lisis por tubo y se incuban 20 min. a t. a.
- 7- Se centrifugan los tubos 5 min. a 800g. a 4°C.
- 8- Decantar y lavar con PBS
- 9- Añadir 200µl de solución de tinción de DNA.
- 10- Incubar 10 min. a 0°C protegido de la luz.
- 11- Antes de pasar por el citómetro añadir un volumen de tampón *ISOTON[®] II diluent Coulter[®]*.

6. Estudio de muerte celular programada. Apoptosis

Se analiza la viabilidad celular mediante la citometría de flujo tras la inducción de apoptosis para lo cual se generan blastos de las PBMCs, posteriormente se les induce la apoptosis y se realiza la tinción con anexina-V-FITC (*Bender MedSystems (Vienna, Austria)*), una molécula capaz de unirse a las células que han entrado en apoptosis. La inducción de apoptosis se llevó a cabo con el anticuerpo anti-Fas (*clon CH11, Upstate solutions, NY*) y con diferentes concentraciones de Prednisona (PDN) de (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO*).

6.1. Inducción de apoptosis

El día 1 se separa mediante gradiente de Ficoll las PBMCs de pacientes y donantes sanos, todo el proceso se realiza en condiciones de esterilidad. Se realiza un primer lavado con suero

MATERIAL Y MÉTODOS

fisiológico (SF) a 800g durante 5 min. a 4°C. El segundo lavado se realiza en medio de cultivo RPMI-1640 en las mismas condiciones que el primero.

Las células se resuspenden en medio de cultivo RPMI-1640 más un 10% de suero AB y PHA-M [2mgr/ml] y se mantienen en estufa durante 72 horas a 37°C con 5% de CO₂.

El día cuatro se recogen las células del cultivo, se lavan con medio de cultivo RPMI y posteriormente se resuspenden en medio RPMI-1640 más un 10% de suero AB con IL-2 [1000U/μl], repitiéndose este lavado los días seis y ocho.

El día nueve se lavan las células y se ajustan a la concentración de (4x10⁵ cls/ml). En el caso de apoptosis vía Fas se añade 1μl del anticuerpo CH11. En el caso de apoptosis tras el tratamiento de PDN se añaden diferentes concentraciones de dicho corticoide, concentración final (4-20μg/ml). En ambos casos se dejan en cultivo durante 20h, tras las cuales se tiñen con anexina-V para determinar la apoptosis.

6.2. Tinción con anexina-V

1. Se recoge una alícuota de 200μl del cultivo celular de las muestras a analizar que se encuentran a una concentración de 2-4 x10⁶ células/ml y se lavan dos veces con PBS a t. a.
2. Se le añade 2μl de la anexina-V y 150μl del tampón de anexina 1X. La unión de la anexina-V a la fosfatidilserina traslocada a la cara externa de la membrana celular en las células apoptóticas precisa de la presencia en el medio de iones calcio.
3. Se agita suavemente la suspensión celular, se incuba durante 15 min. a t.a.
4. Una vez transcurrido este tiempo se añaden 150μl más de tampón anexina 1X y 5μl de yoduro de propidio (IP) (*Bender MedSystems (Vienna, Austria)*), la muestra ya está lista para ser analizada en el citómetro de flujo *Epics XL-MCL* (Coulter).

6.3. Viabilidad. Tinción Turk

1. Una vez lavadas las células del apartado anterior se recoge una alícuota de 50μl y se realiza una dilución 1/2 con el colorante azul tripán. La viabilidad y el contaje se determinan por exclusión al azul tripán en cámara de *Neubauer* siendo las células teñidas de azul las muertas y las no teñidas las vivas.

7. Estudio de proteínas

7.1. Obtención de los extractos celulares

Las células obtenidas tras la separación como se indica en el apartado 4.2. se centrifugan a 4°C 9500g. Para un botón celular de 10^6 células utilizaremos 10µl de buffer de lisis (1% de Triton-X100, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mmol/L NaCl, 5mmol/L EDTA, 2mmol/PMSF, junto con la combinación de inhibidores de proteasas *Complete Mini-EDTA-free (Roche, Mannheim, Germany)*). Tras 40 min. en hielo, se centrifuga 10 min. a 15000g. El sobrenadante se recoge y se mezcla con un volumen de Dodecil sulfato sódico (SDS) y se hierve durante 3 min.

7.2. Cuantificación de la proteína

Para cuantificar la carga proteica de los extractos obtenidos a partir de células de sangre periférica se siguió el método de Lowry (Lowry, 1951)

7.3. Análisis por inmunoblot de la proteína Btk

1. Las muestras se fraccionan por tamaño en un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (*Protran. Bioscience, Germany*).
2. Posteriormente se bloquea la membrana con una solución de PBS; pH7.4 al 5% de leche desnatada durante una hora.
3. Se incuba con el anticuerpo primario anti-Btk (*Mouse IgG2a anti-human clone 53. BD Biosciences*) a una dilución 1/250 durante una hora, y con el anticuerpo control anti-beta-actina 1µg/ml (*Monoclonal Antib-Actin Clone AC-15 (Sigma, St. Louis, MO)*).
4. Se realizan lavados con PBS-Tween 0.05% 4 veces durante 10min.
5. Se descarta el líquido de lavado y se incuba con el anticuerpo secundario (*goat anti-mouse IgGs. Pierce*) a una dilución 1/20.000 durante una hora.
6. Se descarta el anticuerpo secundario y lava durante media hora con PBS-Tween 0.05%.
7. Se revela con *ECL detección system (Amersham international, UK)*. La técnica se basa en la detección de la quimioluminiscencia producida por la reacción de oxidación del luminol por la peroxidasa de rábano, conjugada al anticuerpo, en presencia de H_2O_2 y compuestos químicos potenciadores como los fenoles. La reacción emite luz a un máximo de 428nm de longitud de onda. Se trata de mezclar volúmenes iguales de los dos reactivos y depositar un volumen que permita cubrir la membrana. Se deja reaccionar durante un minuto.

MATERIAL Y MÉTODOS

8. Pasado este tiempo se elimina el exceso de reactivo y se coloca en contacto con una película autoradiográfica (AGFA, CURIX RP2), para obtener la imagen de la inmunodetección.

8. Estudios genéticos

8.1. Extracción de DNA

El método de extracción de DNA se realizó con el *kit Mammalian Genomic DNA Extraction Kit de Camgen*, el cual se basa en una modificación del procedimiento "Salting out".

1. Resuspender el pellet de células en 300µl de solución GEN I (Buffer de lisis).
2. Añadir 200µl de GEN II (Buffer de lisis nuclear con 10% SDS) y vortear.
3. Añadir 150µl de GEN III (Proteinasa K) y vortear.
4. Incubar 10 min. a temperatura ambiente.
5. Centrifugar durante 5 min. aproximadamente a 15700g.
6. Recoger el sobrenadante, añadir 450µl de isopropanol y mezclarlo.
7. Centrifugar 5 min. a 4°C a 15700g y descartar el sobrenadante.
8. Lavar el pellet de DNA con etanol al 70% frío y volver a centrifugar 5 min. a 4°C a 15700g.
9. Descartar el etanol restante y dejar secar al aire.
10. Resuspender con 120µl de agua.
11. Incubar toda la noche a 37°C o unas horas a 55°C.

También se ha utilizado el método de extracción de DNA *kit Mammalian Genomic DNA Extraction Kit de Qiagen*.

1. A 200µl de sangre total, buffy coat o linfocitos en 200µl de PBS, añadimos 20µl de proteinasa K en el centro del tubo.
2. Añadir 200µl de buffer AL (vortex, 15 seg.)
3. Incubar a 56°C durante 10 min. en bloque seco.
4. Centrifugar a 15700g 1 min. a t.a. y añadir 200µl de etanol (96-100%) al sobrenadante (vortex, 15 seg.).
5. Aplicar cuidadosamente toda la mezcla sobre la columna (*Qiamp spin column*).
6. Centrifugar a 5900g 1 min. y descartar lo que queda en el tubo.
7. Añadir 500µl de buffer AW1 sobre la misma columna que estará en un tubo limpio, y centrifugar a 5900g 1 min.
8. Añadir 500µl de buffer AW2 y centrifugar 3 min. a 15700g.

9. Descartar lo que se filtra de la columna y añadir 200µl de H₂O previamente calentada a 56°C. Incubar una hora.

En ambos casos a continuación mediremos la concentración de DNA de la muestra en µg/ml y el ratio OD₂₆₀/OD₂₈₀ en el espectrofotómetro *GeneQuant pro* (Amershan Bioscience). La cantidad de DNA obtenido se determina midiendo la densidad óptica (D.O.) a λ 260 nm de una dilución conocida de DNA. Se considera que 1 ml de solución con un valor de D.O.₂₆₀ = 1 es equivalente a 50 µg de DNA de doble cadena (o bien a 40 µg de DNA de cadena sencilla). Se mide también la D.O. a λ 280 nm, ya que la relación D.O.₂₆₀ /D.O.₂₈₀ es un criterio de pureza de los ácidos nucleicos, de manera que valores inferiores a 1.8 indican contaminación proteica.

8.2. Extracción de RNA

8.2.1. Método Ultraspec.

Se empleó el Kit de extracción de RNA, *Ultraspec RNA isolation system* (Biotecx) basado en la utilización de una solución de guanidina y urea que actúan como agentes desnaturalizantes (Chomczynski et al. 1987). Consiste en homogeneizar las células o el tejido celular del cual se quiere obtener el RNA en la solución Ultraspec. El homogeneizado se separa en dos fases después de añadirle cloroformo. El RNA total se encuentra exclusivamente en la fase acuosa, mientras que el DNA y las proteínas son extraídos en la fase orgánica y en la interfase. El RNA total se precipita de la fase acuosa mediante isopropanol, se lavan con alcohol, y se solubiliza con H₂O tratada con DEPC (H₂O DEPC). Se siguió el protocolo descrito en el kit:

1. Atemperar la solución Ultraspec.
2. Homogeneizar las células utilizando una pipeta, en un eppendorf utilizando 1 ml de la solución Ultraspec RNA para 5-10 x 10⁶ células e incubar 5 min. en hielo.
3. Añadir 200µl de cloroformo y agitar vigorosamente durante 15 segundos.
4. Incubar 5 min. en hielo para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos.
5. Centrifugar 15 min. a 4 °C a 12000g.
6. Recoger la fase acuosa que contiene el RNA y pasarla a un tubo eppendorf.
7. Añadir el mismo volumen de isopropanol que fase acuosa recogida.
8. Dejar incubar toda la noche a -20°C para permitir la precipitación del RNA.
9. Centrifugar durante 10 min. a 12000g 4 °C.
10. Eliminar el sobrenadante y lavar dos veces utilizando 1 ml de etanol 75%, centrifugar a 7500g durante 5 min. a 4° C. En el último lavado intentar eliminar el máximo posible de etanol.

MATERIAL Y MÉTODOS

11. Dejar secar el sedimento de RNA hasta la completa evaporación de alcohol.
 12. Resuspender el sedimento de RNA con 50µl de agua DEPC y cuantificar el RNA purificado a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro.
- Para calcular la cantidad de RNA que obtenemos utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/ml} = \text{Absorbancia a 260 nm.} \times 40 \times \text{factor de dilución}$$

8.2.2. Kit de Extracción "Total RNA Isolation".

Además se utilizó el kit de extracción de RNA "*Total RNA Isolation*" de *Macherey-Nagel*. Uno de los más importantes aspectos en la extracción de RNA es prevenir la degradación del RNA durante el procedimiento. Este Kit nos permite eliminar estos riesgos por la gran cantidad de iones caotrópicos, por la inhibición de RNAsas y la presencia de Dnasa que eliminan el DNA contaminante. Se realizó según el siguiente procedimiento:

1. Se parte de una suspensión celular de 5×10^6 que se centrifuga.
 2. Se añaden 350 µl de Buffer RA1 y 3.5µl de β-mercaptoetanol al pellet celular y se vortea vigorosamente.
 3. Para reducir la viscosidad el lisado se filtra en las columnas *NucleoSpinÒ Filter units*. Se deposita el contenido del tubo anterior en la columna y se centrifuga durante 1 min. a 11000g.
 4. Descartar la columna *NucleoSpinÒ Filter unit*, y añadir al 350µl de etanol 70% al lisado homogeneizado y mezclar mediante vortex.
 5. Colocar una columna *NucleoSpinÒ RNA II* en un tubo de dos ml y añadir el lisado. Centrifugar 30 seg. a 8000g. Pasar la columna a un tubo limpio.
 6. Añadir 350µl de MDB (Buffer desalador de membrana) y centrifugarlo 1 min. a 11000g para secar la membrana.
 7. Digerir el DNA. Para ello se prepara la mezcla de reacción de la DNAsa en un tubo nuevo, añadiendo 10µl de DNAsa I reconstituida a 90µl de Buffer de reacción de DNAsa. Añadir 95µl de mezcla de reacción de la DNAsa en el centro de la membrana de sílica de la columna e incubarlo a t.a. durante 15 min.
 8. A continuación se realizan tres lavados, el primero consiste en añadir 200µl de buffer RA2 en la columna y centrifugarlo 30 segundos a 8000g. Pasar la columna a un tubo nuevo. Para el segundo lavado se añaden 600µl de buffer RA3 a la columna y se centrifuga 30 seg. a 8000g. Pasar la columna a un tubo nuevo y realizar el último lavado añadiendo 250µl de buffer RA3 en la columna y centrifugar 2 min. a 11000g.
 9. Eluir el RNA en 60µl de H₂O (libre de RNAsa) y centrifugar 1 min. a 11000g.
- Todo el proceso se realiza a t.a.

8.3. Amplificación de secuencias

La temperatura de hibridación se calculó según la siguiente fórmula:

Temperatura de hibridación = Temperatura de fusión – 5°C. Siendo la temperatura de fusión la siguiente: Temperatura de fusión = 2 x (A+T) + 4 x (G+C) [A,T,G,C: bases de la secuencia]

Las condiciones generales de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron las siguientes:

Buffer 10x	5µl
dNTPs 10x	5µl
MgCl ₂ 50 mM	2.5µl
Oligonucleótido –F	4µl
Oligonucleótido –R	4µl
H ₂ O	27µl
DNA	2.5µl
Taq-polimerasa	0.4µl

A continuación se muestra la tabla con los diferentes oligonucleótidos utilizados para la amplificación de secuencias genómicas de DNA.

Nombre	Primer
BTK-ex4-FW	5'-TGCATCAACCAATAACCATTTTT-3'
BTK-ex4-RE	5'-TTACAGGGGCCTTTCAAGATTTG-3'
CGD-I1-FWD	5'-TGC AAT CCA GGA CAA CCG CAA-3'
CGD-I2R-RE	5'-TGG AAC TCG TAG ATC TCG-3'
CGD-I2RB-R	5'-CTT CCC AAA GGG TGG AGC T-3'
IgG1-JF	5'-AACTCACACATGCCACCGT-3'
IgG1-JR	5'-GCCCCGGAAGTATGTACAGG-3'
IgG2-JF	5'-GCAAATGTTGTGTCGAGTGC-3'
IgG2-JR	5'-GCCTGGGAAGTATGTACACG-3'
AID-F	5'-ACCTCGTTTTGAAGCCAT-3'
AID-R	5'-CTGTTTTTTATCCACTGTC-3'
CD95-Ex9-F	5'-AAA TAA ACA TGG TTT TCA CTA ATG GG-3'
CD95-Ex9-R	5'-ACA AAT ATG TTG GCT CTT CAG CGC-3'
CD95-Ex2-F	5'-CAATTTTGGGTGGGTTACTACTGGT-3'
CD95-Ex2-R	5'-TTCTCATTTTCAAGGTGCATGTCA-3'
FAS-EX7-FW	5'-GCA TTC TAC AAG GCT GAG A-3'
FAS-EX7-RE	5'-CTG CAG TGA GCC ATG ATT-3'
FAS-EX8-FW	5'-ACT TCT TTC TGA ATT AAG GA-3'
FAS-EX8-RE	5'-GCA GGT AGA ATT GTA TGA GA-3'
TCA-F	5'-ACGCCTTCAACAACAGCATTAT-3'
TCA-R	5'-AGGGAGCAGGCTGTCTTA-3'
CD4-S-F	5'-TTGCAAGGCTCTGAGTTTGA-3'
CD4-S-R	5'-GGAGAGAGAGACCTGGAGCA-3'

Tabla M.4. Oligonucleótidos utilizados para amplificación y secuenciación.

8.4. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA utilizamos el kit *Super Script III First Strand Syntesis for RT-PCR* de Invitrogen. A partir de un primer reverse específico 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. Se realizó el siguiente procedimiento:

RNA	2µl	
H ₂ O	6µl	5 min. a 65°C
Oligonucleótido R	1µl	
dNTPs	1µl	

Volumen final	10µl	

Mantener un minuto en hielo y preparar la siguiente mezcla:

Buffer RT	2µl	
MgCl ₂	4µl	50 min. a 50°C
DTT	2µl	5 min. a 85°C
RNAsaOUT	1µl	
Super Script III RT	1µl	

Volumen final	10µl	

Tras la reacción se añade 1µl RNAsa-H 37°C 20 min.

8.4.1. Amplificación de cDNA

Se amplificó el cDNA utilizando el kit *CERTAMP*, (*Biotools*), que además de ser específico para amplificaciones largas, contiene una combinación de enzimas polimerasa proof-reading y no proof-reading que permiten mejorar el rendimiento de la reacción.

Se siguió el siguiente esquema de amplificación:

CERTAMP Enzyme Mix	1 µL
CERTAMP Buffer 10X	2,5 µL
MgCl ₂ 50 mM	1 µL
dNTPs 50 mM	2,5 µL
Oligonucleótidos 5 µM	3 µL
cDNA	variable
H ₂ O	hasta 25 µL

Nombre	Primer
CD40LcDNA-FWD	5'-GCC AGA AGA TAC CAT TTC AAC-3'
CD40LcDNA-REV	5'-CCG CTG TGC TGT ATT ATG AA-3'
cDNA FAS-F	5'-GGG AAG CGG TTT ACG AGT GA-3
cDNA FAS-R	5'-TGG GGT TAG CCT GTG GAT AGA C-3'
cDNA FASL-F	5'-TGACTCACCAGCTGCCATGCAG-3'
cDNA FASL-R	5'-GGAAAGAATCCCAAAGTGCTTCTC-3'

Tabla M.5. Oligonucleótidos utilizados para amplificación de cDNA

8.5. *Detección del DNA amplificado*

Para determinar si el DNA fue amplificado por la PCR, lo visualizaremos en un gel seguido de electroforesis. El DNA está cargado negativamente debido a sus grupos fosfato y migrará en un campo eléctrico hacia el polo positivo. El lugar de migración vendrá determinado por el tamaño del fragmento de DNA, moviéndose los fragmentos pequeños más rápido que los grandes. Para conocer el tamaño de los fragmentos utilizaremos el marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder (GibcoBRL)*.

Preparación de un gel de agarosa al 1.5%:

- Disolvemos 3g de agarosa (*Seakem LE Agarosa de Iberlabo*) en 200ml de Buffer TBE 1X. (TBE10X: 108g Tris Base, 55g de ácido bórico, 20mL de 0,5M EDTA, hasta un litro de H₂O destilada).
- Lo calentamos en un microondas hasta su ebullición
- Añadimos 8µl de Bromuro de Etidio (EtBr) (0,05µg/ml) y lo mezclamos.
- Se vierte en el soporte previamente montado, dejándolo solidificar.

Electroforesis:

- Llenar el tanque de electroforesis con Buffer TBE 1X.
- Después de sumergir el gel dentro del Buffer TBE 1X y quitar los peines, cargar en cada pocillo la cantidad indicada de producto amplificado, paralelamente a un marcador de peso molecular.
- Condiciones de electroforesis: 200 voltios, 15 min.
- Sacar el gel del buffer y tomar una foto en un trans-iluminador ultravioleta ($\lambda = 302$ nm.).

8.6. *Enzimas de restricción.*

Utilizamos enzima de restricción Ssp-B1 para poner de manifiesto la mutación en el gen NCF1 (delección homocigota del dinucleótico GT en exón 2). A continuación se detallan las condiciones de digestión:

DNA	1µg
Buffer B 10X	2,5µL
H2O destilada	hasta 25µL
Enzimas SspBI, Taq1	1 unidad

8.7. *Secuenciación de un producto de PCR*

Se purificaron productos de PCR por método *EXOSAP-IT de Amersham Biosciences*, el cual se basa en la actividad exonucleasa que convierte las cadenas sencillas (los primers) en nucleótidos sueltos y en la actividad fosfatasa alcalina que elimina los grupos fosfato de los nucleótidos sueltos impidiendo una incorporación posterior.

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

Una vez que los productos de PCR han sido purificados se lleva a cabo la reacción de secuencia en la que se incorporan nucleótidos marcados con diferentes fluorocromos. La lectura es 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-v2 (Amersham Biosciences)*. Se siguió el siguiente procedimiento:

- 5 Mezclar en un tubo de PCR, para cada muestra:

Big Dye v-2	8 µL
Oligonucleótido	0,5 µL
Buffer 5X	4 µL
H ₂ O	3,5 µL
Producto PCR purificado	3,5 µL

6 Introducir los tubos en el termociclador y aplicar el siguiente programa:

96°C	10 seg.
96°C	10 seg.
50°C	10 seg.
60°C	2 min. Volver al paso 2, 34 veces.

Posteriormente eliminar los restos de primer y de nucleótidos sueltos. Para lo cual utilizamos dos sistemas diferentes: la purificación en columna por exclusión molecular y la precipitación con acetato/etanol.

Para la purificación de productos de PCR en columna se llevó a cabo con las columnas *AutoSeq G-50 (Amersham Biosciences)*, las cuales retienen las moléculas de pequeño tamaño en la resina *sepharose* y eliminan oligonucleótidos que no se hayan incorporado (\leq 32-mers).

Procedimiento:

1. Se vortea la columna para homogeneizarla en el tampón TE (10mL de Tris-HCL (pH 8.0), 400 μ L de EDTA 0.25M en 990mL de H₂O destilada).
2. Centrifugarlas 1 min. a 2300g.
3. Pasar las columnas a eppendorfs rotulados y aplicar la muestra en el centro de la resina.
4. Centrifugar 1 min. a 2300g para que las moléculas más grandes pasen por fuera de la resina y las más pequeñas queden retenidas en ella.
5. Liofilizar las muestras y guardarlas congeladas y en oscuridad.

Para la purificación por precipitación con acetato/etanol se siguió el protocolo convencional:

- 1 Añadir al producto de secuenciación 1 μ L de NaOAc 3M y 1 μ L de EDTA 125mM.
- 2 Centrifugar 10 seg. a máxima velocidad.
- 3 Añadir 25 μ L de etanol al 100% frío. Vortear.
- 4 Centrifugar 30 min. a 10000 r.p.m. en frío.
- 5 Descartar el sobrenadante.
- 6 Añadir 500 μ L de etanol al 80%. Guardar a -20°C hasta justo antes de secuenciarlas.
- 7 Llegado ese momento, centrifugar 10 min. a máxima velocidad en frío.
- 8 Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
- 9 Guardar las muestras en el congelador

Se utilizó el secuenciador ABI PRISM®3100 (*Applied Biosystems, CA*), previamente las muestras fueron procesadas del siguiente modo:

- 10 Añadir 15 μ L de formamida a cada muestra y vortear.
- 11 Incubar durante 2-3 min. en un baño seco a 95°C.
- 12 Cargar las muestras en una placa de 96 pocillos.

8.8. Estudio de círculos de reordenamiento del TCR (TRECS)

Para cuantificar la concentración de TRECS por célula en PBMCs, utilizamos un ensayo de PCR a tiempo real que se realizó en un termociclador espectrofluorométrico (*ABI PRISM 7000; Applied Biosystems, CA*).

Las condiciones fueron las siguientes:

2 min.	50°C	
10 min.	95°C	
15 seg.	95°C	50 ciclos
1 min.	60°C	

Las secuencias de oligonucleótidos de PCR utilizadas son las siguientes,

Forward 5'–CACATCCCTTTCAACCATGCT– 3'

Reverse 5'–GCCAGCTGCAGGGTTTAGG–3'

También se utilizaron los siguientes oligonucleótidos conjugados 5'–ACACCT TGGTTTTGTAAAGGTGCCCACT–3' conjugado con el fluoróforo FAM (6-carboxyfluoresceína) en el extremo 5' y con TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamina) en el extremo 3'. Como se describe en (McFarland et al. 2000). Cada reacción contiene 50µl de la siguiente mezcla:

25 µl Taqman Universal PCR Master Mix (<i>PE Applied Biosystems, CA</i>)
250 nM por cada TREC primer
160 nM TREC primer
5 µl de muestra de DNA

Se realizaron diluciones seriadas de 38500 a 10 copias de un plásmido de DNA que contenía un fragmento de TREC en *pGEM T Easy Vector (Promega)*, y se midieron en cuadruplicado para cuantificar los TRECs en cada muestra. Los resultados se expresan como copias de TRECs/ millón de células.

8.9. Estudio de la clonalidad del TCR.

Las expansiones monoclonales de poblaciones linfoides pueden ponerse de manifiesto por la presencia de genes simples funcionales del TCR o de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, comparado con el patrón heterogéneo de los diferentes reordenamientos encontrados en poblaciones de células. Las poblaciones clonales T son identificadas por el análisis de los genes de los loci TCR γ y TCR β .

Los reordenamientos clonales son detectados por un sistema fluorescente multiplex con el los kits *BIOMED2- IdentiClone™ TCR β* y *TCR γ Clonality Assay (InVivo Scribe Technologies –California,*

USA). Posteriormente los productos de PCR fueron analizados usando el secuenciador *ABI 310TM DNA sequencer*.

El estudio de las diferentes familias de genes $V\beta$ fue realizado en el Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.) por el grupo del Dr. Souillou, el procedimiento se realizó según (Guillet et al. 2002).

9. Estudio citogenético mediante cariotipo espectral (SKY)

El análisis citogenético mediante cariotipo multicolor espectral (SKY) ha sido realizado por el grupo de citogenético molecular del Dr. Cigudosa del Centro nacional de investigaciones oncológicas (CNIO). El procedimiento se realizó según (Cigudosa et al. 2003).

10. Análisis estadístico

Los resultados del análisis de proliferación celular y apoptosis se muestran como la media +/- desviación estándar de tres experimentos distintos realizados para cada una de las muestras estudiadas. Para todos los estudios de comparación entre variable cuantitativas ha sido aplicado el test de la *t* de *student*. En todos los casos, se ha considerado como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. Los datos estadísticos han sido analizados usando el software SPSS for windows Release 10.0 (*SPSS Inc., Chicago, IL*).

Tabla M.1. Valores de referencia de poblaciones linfocitarias e inmunoglobulinas según la edad.

Subpoblación de linfocitos*	Grupos de edad									
	1 año-2 meses	2-5 meses	5-9 meses	9-15 meses	15-24 meses	2-5 años	5-10 años	10-16 años		
Necesario										
Linfocitos Linfocitos	4,30	5,70	5,90	5,50	5,50	5,30	5,00	5,00	5,00	5,30
CD19+5	12% (0,8)	15% (1,0)	24% (1,3)	21% (1,2)	25% (1,4)	28% (1,3)	24% (0,8)	19% (0,5)	16% (0,3)	
CD3+T	62% (2,8)	72% (4,6)	83% (3,8)	66% (3,8)	80% (3,4)	84% (3,5)	84% (2,3)	89% (1,2)	87% (1,5)	
CD3+CC	41% (1,9)	66% (3,8)	45% (2,5)	46% (2,8)	44% (2,3)	41% (2,2)	41% (1,3)	35% (1,0)	32% (0,8)	
CD3+CC	24% (1,1)	16% (1,0)	17% (1,0)	16% (1,1)	16% (1,1)	20% (1,2)	24% (0,8)	25% (0,8)	23% (0,4)	
CD4/CD8	1,8	3,5	2,7	2,5	2,4	1,9	1,6	1,2	1,7	
CD3+HL	3% (0,08)	5% (0,3)	3% (0,2)	3% (0,3)	4% (0,2)	6% (0,3)	6% (0,2)	7% (0,2)	4% (0,16)	
CD3+CD3+CD16+CD55+HL	20% (1,9)	39% (0,5)	6% (0,3)	5% (0,3)	7% (0,4)	8% (0,4)	10% (0,4)	12% (0,3)	15% (0,3)	
Inmunoglobulinas										
IgG (mg/dl)	600-1670	219-610	228-685	252-616	303-1070	423-1164	477-1004	540-1600	670-1670	
IgA (mg/dl)	0-5	20-65	27-72	27-72	37-169	36-222	60-251	66-665	86-644	
IgM (mg/dl)	0-15	11-51	25-60	12-124	23-113	32-131	23-112	20-112	23-135	

* Porcentaje y número absoluto de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica (n=108). Ajustado de Comau-Dittner et al 1997 (Buckley et al)

RESULTADOS

1. Enfermedad granulomatosa crónica

1.1. Descripción del caso clínico

Describimos el caso de una mujer caucásica que debutó con infecciones de repetición por microorganismos catalasa positivo durante el periodo neonatal. Hija de padres no consanguíneos pero con el mismo origen geográfico, la cual tiene una hermana sana.

A lo largo de la infancia sufrió repetidamente aftas orales. Con 6 años presentó una adenopatía submandibular izquierda, linfadenitis que evolucionó a granuloma con abscesos cutáneos no supurados por *Serratia liquefaciens* los cuales se desbridaron y fueron tratados con antibióticos. A los 11 años presentó nódulos cutáneos exudativos con cultivo positivo para *S. liquefaciens* que producen cicatrices cutáneas. Entre los 11 y 17 años sufrió foliculitis, adenitis e infecciones respiratorias que se trataron con antibióticos orales (amoxicilina y clavulánico), aislándose finalmente *Staphilococcus* coagulasa negativo como organismo responsable. A los 18 años presenta tos persistente con Mantoux positivo. A los 23 años presentó una tuberculosis pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* que fue tratada con triple terapia tuberculostática. En la actualidad la paciente se encuentra asintomática. Por el tipo de infecciones de repetición y la edad de debut de las mismas se sospechó el diagnóstico de enfermedad granulomatosa crónica.

1.2. Parámetros inmunológicos

Se estudiaron las poblaciones linfocitarias de la paciente y su familia mediante citometría de flujo, las cuales se detallan en la **Tabla 1.1**. Cabe llamar la atención en la disminución del número absoluto de células T CD4 positivas en la paciente, observación ya descrita en pacientes con EGC (Heltzer, Jawad 2002).

	PACIENTE		PADRE		MADRE		HERMANA	
LEUCOCITOS /mm³	7700	%	6300	%	6710	%	6620	%
Neutrófilos	5210	67,2	3160	31,6	3008	46	3270	50
Eosinófilos	70	0,9	70	1,1	270	4	120	1,8
Basófilos	10	0,1	30	0,5	10	0,1	30	0,5
Monocitos	530	6,8	570	9	640	9,5	630	9,5
Linfocitos	1940	25	2470	39,2	2710	40,4	2570	38,8
T	1455	75	1606	65	2168	80	2056	80
CD4	698	36	1112	45	1301	48	1208	47
CD8	718	37	445	18	813	30	771	30
B	330	17	395	16	298	11	154	6
NK	39	2	173	7	54	2	***	<1

Tabla 1.1. **Recuento leucocitario y linfocitario.** Tabla en la que se muestra en números absolutos y porcentaje las poblaciones celulares de sangre periférica de todos los componentes de la familia afectada de EGC. Valores de referencia en la Tabla M1.

RESULTADOS

El análisis de parámetros inmunológicos mostró la dosificación de inmunoglobulinas y una capacidad funcional del sistema del complemento dentro de los límites normales. No se observaron auto-anticuerpos mediante inmunofluorescencia indirecta.

1.3. Resultado de la prueba funcional (NBT)

Aunque el diagnóstico de la EGC se sospecha usualmente primero por la presencia de infecciones de importancia, el diagnóstico definitivo se efectúa analizando la función metabólica y la capacidad bactericida de las células fagocíticas del paciente.

Realizamos una modificación del método clásico de diagnóstico de EGC, el test del nitrozul de tetrazolio (NBT) para determinar cuantitativamente la actividad respiratoria de los leucocitos de la paciente, y su familia y con ello conocer los posibles defectos en el enzima NADPH-oxidasa responsable de la formación de productos oxidantes. En este caso se utiliza dihidro-rodamina que al ser reducida por la acción de la NADPH-oxidasa de los neutrófilos, tras ser expuesta a diferentes estímulos, se convierte en una sustancia fluorescente, fácilmente detectable mediante citometría de flujo. Las células de la paciente, de sus padres y de su hermana fueron estimuladas con *E. coli* opsonizado y con ésteres de forbol (PMA). Se seleccionaron los granulocitos en el histograma de morfología y tamaño (FS:SS) y posteriormente se cuantificó la producción de anión superóxido mediante la cantidad de fluorescencia emitida por las células en cada una de las muestras.

La capacidad oxidativa de NBT en granulocitos estimulados con PMA y con *E. coli* se encontró severamente disminuida en la paciente (Figura 1.1.), ya que se observa la falta de producción de superóxido por parte de sus fagocitos.

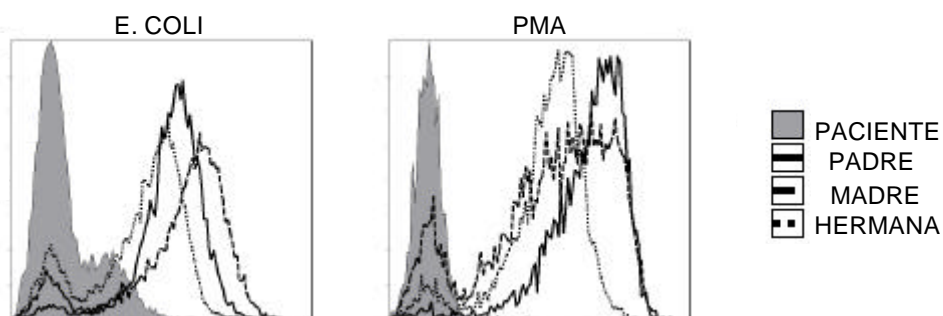


Figura 1.1. **Cuantificación de la actividad NAPH-oxidasa por citometría de flujo.** La reducción de NBT en granulocitos estimulados con PMA y *E. coli* se encontró ausente en la paciente y fue normal en los padres y la hermana.

Los fagocitos de los padres y la hermana de la paciente mostraron una capacidad bactericida del 90% frente a la estimulación con *E. coli* y a PMA. La respuesta frente a *E. coli* y PMA de las

células del padre y de la madre muestran una media de intensidad de fluorescencia mayor que las de la hija sana.

1.4. Estudio genético

Una vez diagnosticada la enfermedad mediante la prueba funcional NBT abordamos el estudio genético de la paciente y su familia. Al tratarse de una mujer se descartaron las mutaciones en la subunidad gp91-*phox*, por estar su herencia ligada al cromosoma X, y sólo afectar a varones.

Aproximadamente el 70% de los casos con herencia autosómica recesiva resultan de mutaciones en el gen *NCF1*, que codifica para la subunidad p47-*phox* de la NADPH-oxidasa. El defecto genético más comúnmente descrito en este gen es la deleción del dinucleótido GT, dentro de la repetición GTGT al comienzo del exón 2, la cual origina un desplazamiento en la pauta de lectura que finalmente genera un codon stop en el aminoácido número 51.

Como se ha descrito en la introducción, este gen (*NCF1*) posee dos copias altamente homólogas (ψ *NCF1*). Los pseudogenes son genes no funcionales, originados por la duplicación de un gen, cuya copia se vuelve no funcional por las mutaciones sufridas en su secuencia. El gen p47-*phox* y sus pseudogenes han sido localizados en la misma banda cromosómica que corresponde a 7q11. La homología entre sus secuencias es del 97.5%, siendo una de las diferencias con el gen la deleción del dinucleótido GT al comienzo del exón 2.

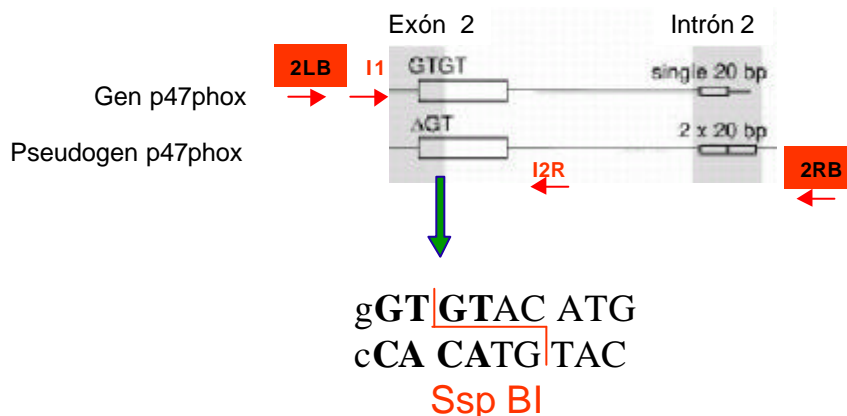


Figura 1.2. Esquema del gen *NCF1* y su pseudogen, detalle de la deleción del dinucleótido GTGT. En recuadro rojo localización del primers de amplificación para secuencia, y en letras rojas primers de amplificación para el fragmento que posteriormente se digiere con el enzima Ssp-BI. La digestión se produce solo en presencia de algún alelo salvaje (GTGT).

Para el estudio genético se utilizó DNA genómico de la paciente y su familia, así como de DS. Amplificamos el exón 2 del gen *NCF1* usando los oligonucleótidos 2LB y 2RB los cuales amplifican tanto el gen como el pseudogen presente tanto en la paciente como en los controles (Figura 1.2.). Al

RESULTADOS

secuenciar los productos con los primers I1 y I2R observamos la imposibilidad de distinguir el gen de los pseudogenes en las muestras que sospechábamos heterocigotas, no así en la paciente que era clara por ser homocigota, por portar la delección en todas las copias del gen. Los donantes sanos y los portadores de la delección presentan dos secuencias diferentes, la que corresponde a los pseudogenes (--GT) y la que corresponde al gen (GTGT), las cuales se superponen a partir del dinucleótido (GTGT). En cambio, en ambos alelos de la paciente encontramos la delección (--GT), por lo que la secuencia es homocigota, como se muestra en la **Figura 1.3**. Por lo cual, para el reconocimiento preciso de la presencia de la alteración genética sería necesario separar el gen p47-*phox* del pseudogen y estudiar estas secuencias de manera individual, lo cual permitiría la detección de portadores de dicho defecto.

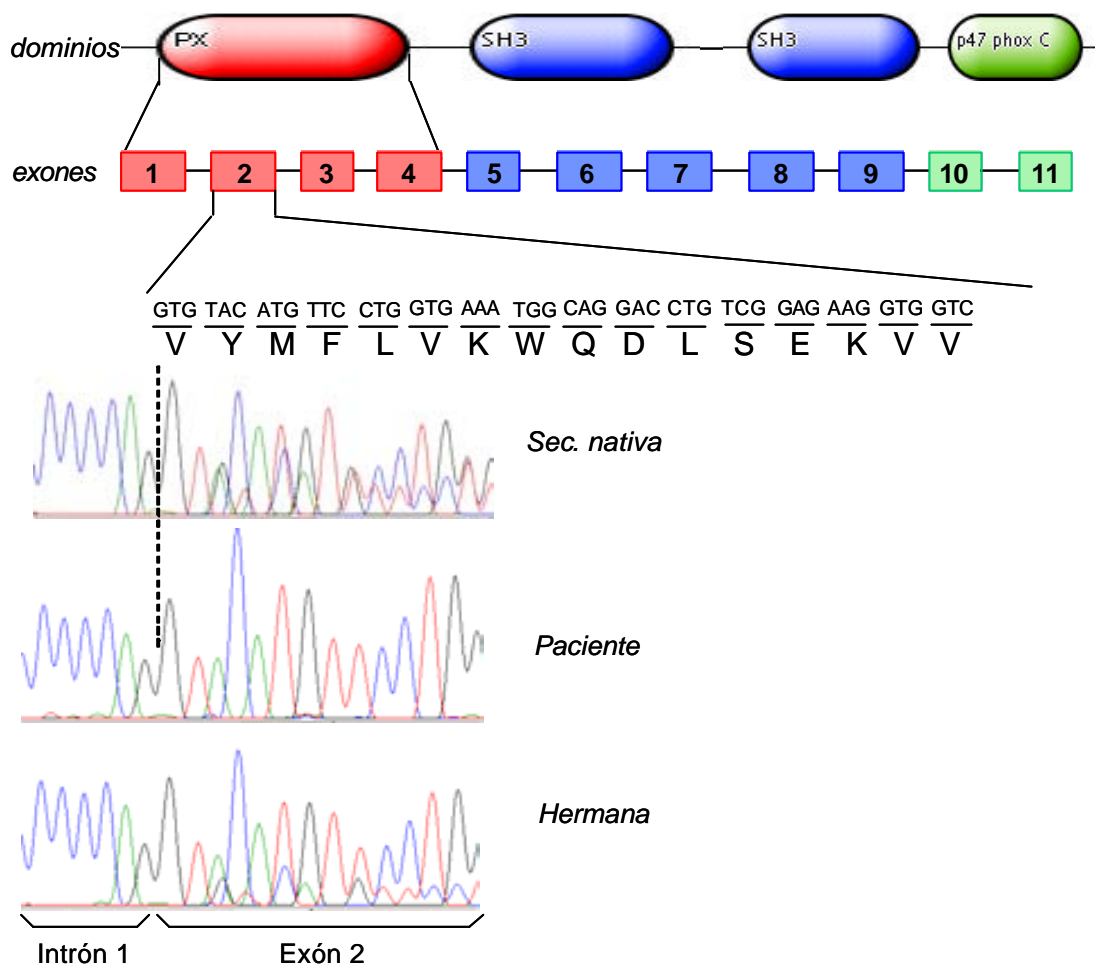


Figura 1.3. **Análisis de la secuencia del gen *NCF1***. Esquema de los dominios de la proteína p47-*phox* y de los exones que codifican cada uno de ellos. Detalle de la secuencia del exón 2 de la subunidad p47-*phox* de la NADPH-oxidasa de la paciente, de un donante sano y de la hermana. Tanto en la secuencia del donante sano como en la de la hermana a partir del primer dinucleótido GT se superponen la secuencia del gen y del pseudogen. En la paciente se observa la delección (GT), lo que genera una secuencia idéntica a la del pseudogen, mientras que en el donante sano se aprecia una doble secuencia en este mismo exón, lo cual se debe a la presencia del pseudogen (GT) superpuesto al gen normal.

Aprovechamos la capacidad que tiene la enzima de restricción *Ssp*-BI para digerir en la diana T/GTACA y así poder distinguir entre las muestras que tenían la delección GT y las que tienen la secuencia normal. Amplificamos con los oligonucleótidos I1 e I2R, obteniendo dos productos, un producto de 218bp correspondiente al exón 2 del gen y otro de 216bp correspondiente a la misma secuencia pero del pseudogen.

La falta del dinucleótido GTGT impide el corte del enzima de restricción *Ssp*-BI por lo que en la paciente solo se observa una banda de 216bp. En cambio, en el resto de muestras de la familia y de donantes sanos, tras la digestión con el enzima de restricción *Ssp*-BI se obtienen dos fragmentos, uno de 138bp, otro de 80bp y el correspondiente a la banda sin digerir de aproximadamente 216bp. De esta forma demostramos que la paciente posee esta delección al comienzo del exón 2 del gen *NCF1*. Las diferentes intensidades de la banda sin digerir no nos permiten distinguir entre heterocigotos y donantes sanos, como se observa en la **Figura 1.4**.

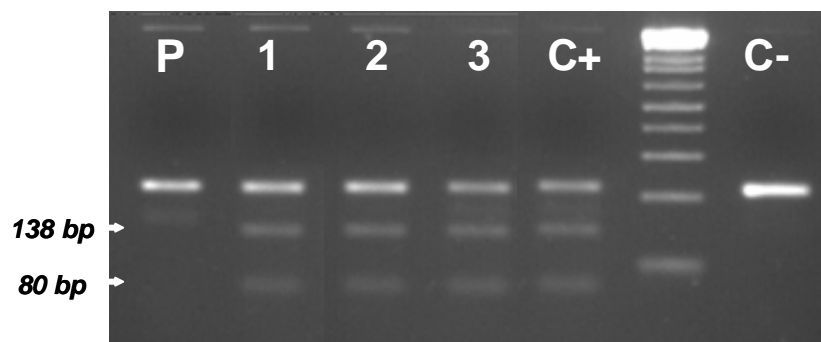


Figura 1.4. Digestión del producto de PCR correspondiente al exón 2 del gen *NCF1* con el enzima de restricción *SSP*-B1. En las muestras que tiene la secuencia nativa la digestión genera dos productos uno de 138bp y otro de 80bp. El pseudogen no se digiere por lo que en todas las muestras existe la presencia de una banda superior de 216bp. P. paciente, 1. madre, 2. padre, 3. hermana, C+ control positivo, C- producto sin digerir.

2. Agammaglobulinemia ligada al X (XLA)

2.1. Caso clínico

Varón caucásico primer hijo de una familia sin antecedentes, que ingresó a los 8 meses de edad con un cuadro de neumonía, durante el curso de la cual se detectó neutropenia posiblemente post-infecciosa y transitoria. La exploración física fue normal. Se mantuvo bajo aislamiento respiratorio y antibioticoterapia.

Ante la sospecha clínica de inmunodeficiencia primaria humoral consecuencia del estudio de parámetros inmunológicos, se realizó tratamiento con gammaglobulina endovenosa a dosis 300mg/Kg. El paciente es vacunado según su edad y se consulta cada mes para tratamiento, aumentando la dosis según su desarrollo.

2.2. Parámetros inmunológicos

Se estudiaron las poblaciones linfocitarias en sangre periférica mediante citometría de flujo, observándose una casi completa ausencia de células B (aprox 0.1%). Se analizaron los marcadores característicos de los linfocitos B maduros (CD19 y CD20) mediante anticuerpos marcados con fluorocromos. Las subpoblaciones de linfocitos T CD3 CD4, CD8 y células NK se encontraron dentro de los rangos de normalidad tanto en el paciente y en la madre como se observa en la **Figura 2.1**.

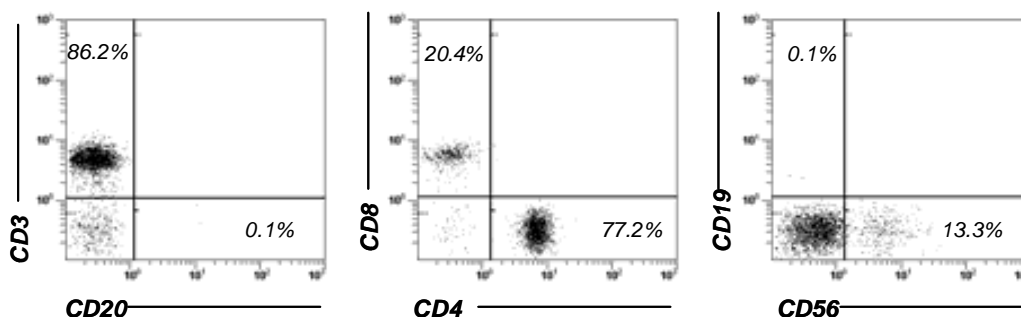


Figura 2.1. **Análisis de las poblaciones linfocitarias del paciente mediante citometría de flujo.**

En el primer histograma se muestra la distribución de poblaciones T y B, solo el 0,1% de células se tiñen con anti-CD20. En el segundo histograma se muestran las poblaciones CD4 y CD8. En el tercer histograma se observa que solo un 0,1% de linfocitos se tiñen con anti-CD19.

Se realizó un mielograma observándose una celularidad normal, hemopoyesis polimorfa, y la serie granulopoyética neutrófila sin anomalías valorables con una correcta maduración. También se observó ausencia de las células plasmáticas. El estudio inmunofenotípico realizado por

inmunofluorescencia directa en leucoblastos de médula ósea, mostró la ausencia de linfocitos B maduros.

Los problemas clínicos (infecciones piógenas) que aparecen en niños varones entre 6 y 10 meses, que hasta esa edad están protegidos por la IgG materna, hace que los niveles de inmunoglobulinas sea uno de los primeros parámetros a evaluar (Ochs et al. 1996). La concentración de IgG total en suero se encontró por debajo de 68 mg/dl y el resto de los isotipos analizados IgM, IgA, e IgE, mostraron niveles extremadamente bajos o indetectables. Los niveles de inmunoglobulinas en la madre se encontraron dentro de los rangos normales. Se estudió la concentración de las distintas subclases de IgG mediante inmunodifusión radial encontrándose indetectables, a excepción de la subclase IgG1 que se cuantificó en 0,49mg/ml y se muestra a continuación en la **Tabla 2.1**.

Posteriormente se determinaron los niveles serológicos de anticuerpos frente a diferentes patógenos, encontrando la serología negativa excepto para el virus de la rubeola IgG (+) y el citomegalovirus (CMV) IgG (+). No presentó anticuerpos anti-granulocitos, ni anti-neutrófilos y el test de Coombs fue negativo. No se encontraron isohematoglutininas (anti-B), siendo el paciente del grupo sanguíneo A+.

	Paciente	Rango normal (5-9 meses)	Madre	Rango normal (edad adulta)
Inmunoglobulinas				
IgG (mg/dl)	68	(292-816)	1100	(630-1775)
IgA (mg/dl)	<7	(27-73)	124	(106-668)
IgM (mg/dl)	20	(12-124)	178	(37-154)
IgE (UI/ml)	15	(3-56)	ND	(3-56)
IgG1 (mg/ml)	0,49		ND	(3,6-9,4)
IgG2 (mg/ml)	indetectable		ND	(1,7-55)
IgG3 (mg/ml)	indetectable		ND	(0,3-12)
IgG4 (mg/ml)	indetectable		ND	(0,6-12)
Poblaciones linfocitarias				
Linfocitos absolutos/mm ³	8750	6000	ND	1800
T CD3+ (%)	82,5	66	76,8	72
CD4+ (%)	63	45	57	44
CD8+ (%)	17	18	18	24
B CD19+ (%)	<1	3	15	12
NK CD56+ (%)	16	5	10	13

Tabla 2.1. **Dosificación de inmunoglobulinas y distribución de las poblaciones linfocitarias en el paciente con XLA y en su madre.** Tras el ingreso del paciente se evidenció una disminución de todos los isotipos de inmunoglobulinas y la ausencia de células B en sangre periférica en el paciente, en su madre todos los parámetros se encontraban dentro de la normalidad. ND. No determinado.

RESULTADOS

2.3. Estudio de la expresión de Btk mediante citometría de flujo

La proteína Btk se expresa en todos los linajes hematopoyéticos excepto en las células plasmáticas y en los linfocitos T. El hecho de que células mieloides y mastocitos expresen proteínas de la superfamilia de Btk adicionales como Tec11 e Itk, pudiera explicar por qué estas células no se encuentran ausentes en pacientes con XLA (Futatani et al. 1998).

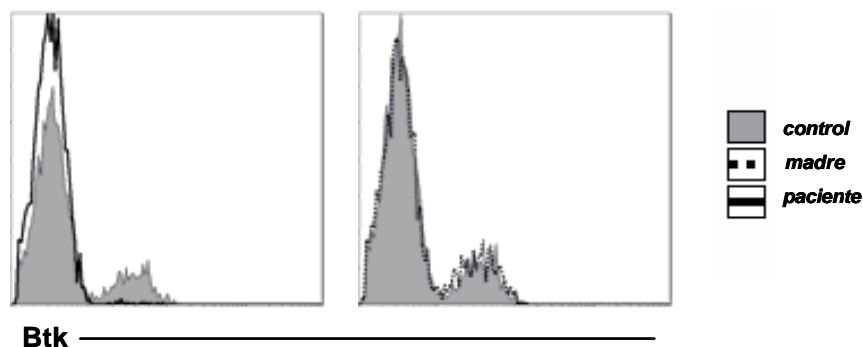


Figura 2.2. **Análisis de la proteína Btk mediante tinción intracelular en PBMC.** Mediante citometría de flujo se evaluó la expresión de Btk en PBMC en el paciente, que muestra una completa ausencia de la proteína y en su madre, cuyas células expresan Btk con normalidad.

Esta característica permite estudiar la presencia de la proteína mediante citometría de flujo en los tipos celulares presentes en estos pacientes, ya que carecen de células B. Por lo cual, realizamos la aproximación mediante el estudio de la expresión de Btk con una tinción intracelular en monocitos del paciente, de su madre y de controles sanos. Se marcaron primero con anti-CD14 conjugado con PE, posteriormente se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con anti-Btk seguido de un anticuerpo secundario. El análisis por citometría de flujo mostró la expresión conservada de la proteína tanto en células B como en monocitos de la madre y de donantes sanos (DS). Mientras que la ausencia de la proteína Btk en los monocitos del paciente es completa, como se muestra en la **Figura 2.2**.

2.4. Estudio de la proteína *Btk* mediante métodos bioquímicos

El estudio bioquímico de la expresión de la proteína Btk se realizó en lisados de células mononucleares del paciente, de su madre y de DS. Posteriormente se separaron las proteínas en condiciones reductoras SDS-PAGE, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada e incubada con anti-Btk y anti-actina como control de carga, posteriormente se lavó y se incubó con el anticuerpo secundario. Se obtuvo la señal por sistema de detección de quimioluminiscencia. El resultado puso de manifiesto la falta total de expresión de la proteína en el paciente, y una expresión disminuida en la madre respecto a los controles como se aprecia en la **Figura 2.3**.

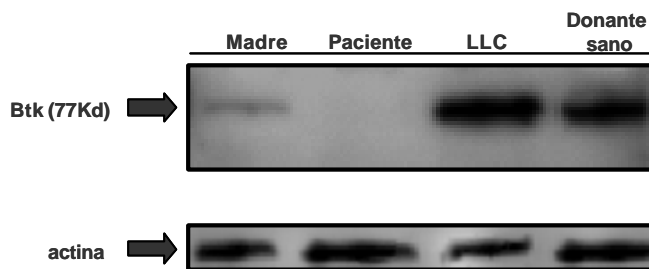


Figura 2.3. **Análisis de la expresión de Btk.** Western blot realizado para la detección de proteína Btk de peso molecular 77Kd en lisados celulares de muestras de la madre, del paciente, de una leucemia linfocítica crónica (LLC) y de un DS.

2.5. Estudio genético

Mediante técnicas de PCR y posterior secuenciación se estudió el gen de la Btk (Vorechovsky et al. 1995). Se encontró una transición homocigota en el paciente y heterocigota en su madre de una C por una T en la posición 439 del exón 4 (C→439T), que da lugar a una parada en la pauta de lectura en el residuo Gln-103-STOP (Q103X) y por tanto una proteína truncada responsable de la agammaglobulinemia en este paciente.

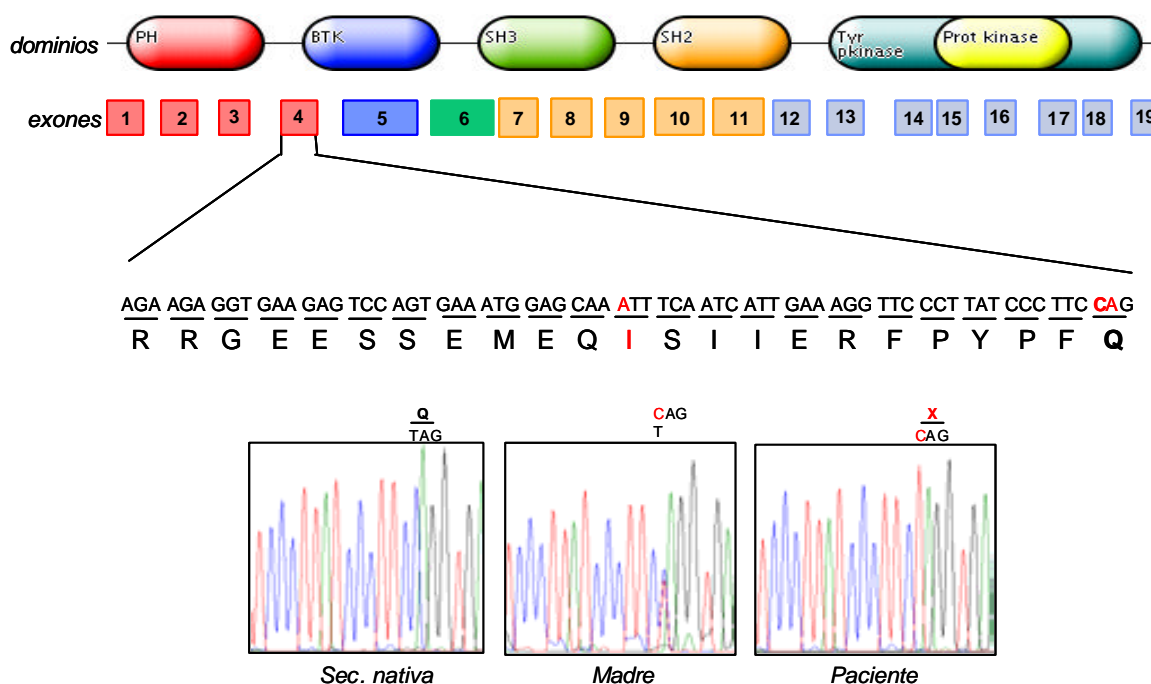


Figura 2.4. **Análisis de la secuencia del exón 4 de la Btk.** Esquema de los dominios y exones de Btk. En la secuencia del exón 4 se indican en rojo las mutaciones descritas hasta la fecha. En la parte inferior de la figura se muestran los electroferogramas de la secuencia del exón 4 del gen de la Btk en un control, en la madre del paciente, en heterocigosis y en el paciente con la mutación C439T.

RESULTADOS

La madre tiene la mutación en heterocigosis, por lo que es portadora de la enfermedad, como se observa en la **Figura 2.4**. El exón 4 tiene 69bp y es uno de los exones que codifica para el dominio PH de la Btk. La recomendación (consejo genético) fue la selección de sexo para futuros embarazos.

3. Síndrome de Hiper-IgM no ligado al X

3.1. Descripción de los casos clínicos

Caso P1:

Varón caucásico de 45 años, que ingresó en nuestro hospital en 1998 con una grave gastroenteritis por *Yersinia sp.* Refiere escasos antecedentes de infecciones, resaltando sinusitis de repetición en la infancia que requirieron tratamiento quirúrgico. Sin embargo, un análisis más cuidadoso mostró bronquiectasias cilíndricas basales bilaterales, lo que sugirió infecciones respiratorias previas y de cierta entidad. Recientemente aparecen nódulos subcutáneos en ambos pulgares y artropatía de cadera de la que fue intervenido para implante de prótesis. El paciente presenta una facies peculiar por lo que se realizó un cariotipo constitucional no hallándose alteraciones aparentes. El análisis del fenotipo en médula ósea fue normal, encontrándose precursores de células B. Se inició tratamiento con IVIGs en el año 2000 que fue suspendido por reacciones adversas al mismo. El paciente se encuentra prácticamente asintomático.

Caso P2:

Mujer caucásica de 13 años de edad que tras un antecedente de encefalitis, sufrió un episodio de crisis convulsiva y comenzó a ser tratada con carbamazepina (CBZ) (800mg/día). En un análisis de control a los tres años del inicio del tratamiento con CBZ, se descubre una intensa hipogammaglobulinemia (**Tabla 3.1.**), por lo que fue retirado el fármaco. Los niveles de inmunoglobulinas se evaluaron mensualmente no detectándose ningún aumento de inmunoglobulinas. En su historial se refieren infecciones del tracto urinario, un episodio de absceso supraclavicular por germen no filiado durante el periodo de tratamiento con CBZ. Desde el año 2001, cuando se suspende el tratamiento con CBZ, hasta finales del 2004 se observa un crecimiento de la IgM pero no se decide administrar IVIGs dada la ausencia de infecciones de gravedad. No obstante, a finales del 2004 sufrió una neumonía grave por *Klebsiella pneumoniae* por lo que se comienza a tratar con IVIGs a dosis de 300mg/kg peso cada cuatro semanas. En la actualidad se ha iniciado el tratamiento con Igs subcutánea y la paciente se encuentra asintomática

3.2. Parámetros inmunológicos

La determinación de los niveles de inmunoglobulinas en suero en los pacientes P1 y P2 presenta un perfil indicativo de Síndrome de Hiper IgM, como se observa en la **Tabla 3.1.** En el caso P1 cabe destacar la total ausencia de IgG, acompañado de déficit de IgA e IgE con cifras de IgM por encima de 1000 mg/dl en algunas de las analíticas, siendo la media del periodo de estudio 968 ± 210

RESULTADOS

mg/dl. En el paciente P1 se realizó la determinación de inmunoglobulinas en saliva, encontrándose exclusivamente el subtipo IgM.

Tabla 3.1. Perfil de todos los isotipos y subclases de inmunoglobulinas en suero y saliva del paciente P1. Primer análisis del suero del paciente P2 tras el tratamiento con CBZ. ND, no detectable.

		IgG mg/dl	IgA mg/dl	IgM mg/dl	IgE mg/dl	IgD mg/dl	IgG1 mg/dl	IgG2 mg/dl	IgG3 mg/dl	IgG4 mg/dl	IgA1 mg/dl	IgA2 mg/dl
Caso P1	suero	<33	<7	1140	<2	3.7	ND	ND	ND	ND	ND	7
	saliva	<1	<1	104	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Caso P2	suero	42	28	62	<2	ND	ND	ND	41	ND	18	7

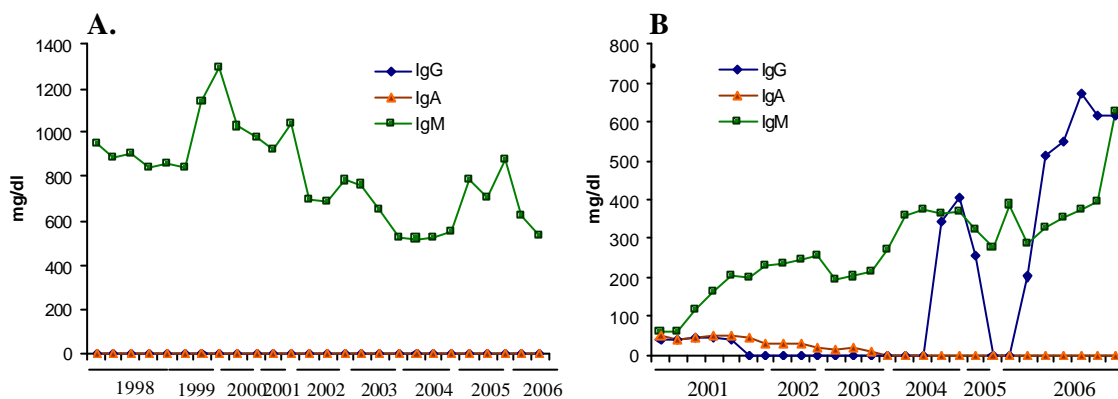


Figura 3.1. Diagrama cronológico de la evolución de los distintos isotipos de inmunoglobulinas en los pacientes con HIGM. En ambas gráficas se muestra la concentración sérica de los isotipos de inmunoglobulinas, IgG, IgA e IgM en el paciente P1 en A. y en la paciente P2 en B.

El estudio mediante técnicas más sensibles (inmunodifusión radial) permitió en este caso confirmar la ausencia completa de todas las subclases de IgG (IgG1-IgG4), y de IgA1, mientras que se detectó la presencia aislada de IgA2. Con el objetivo de descartar un componente monoclonal del subtipo IgM, se realizó una inmunofijación (IF) del suero del paciente P1. En la **Figura 3.2.** se observan la ausencia de las cadenas pesadas gamma (γ) y alfa (α). La cadena mu (μ) correspondía a un componente policlonal, y la presencia de cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ) era normal.

Los niveles de inmunoglobulinas en la paciente P2 mostraron la disminución de todos los isotipos de inmunoglobulinas en la primera determinación, por lo que se suspendió el tratamiento con CBZ, ya que este tratamiento suele causar una hipogammaglobulinemia transitoria. Aunque no se disponía de la determinación de inmunoglobulinas previa al tratamiento con CBZ, los datos bioquímicos de la concentración de las diferentes fracciones proteicas, sugieren una disminución de la fracción gammaglobulina.

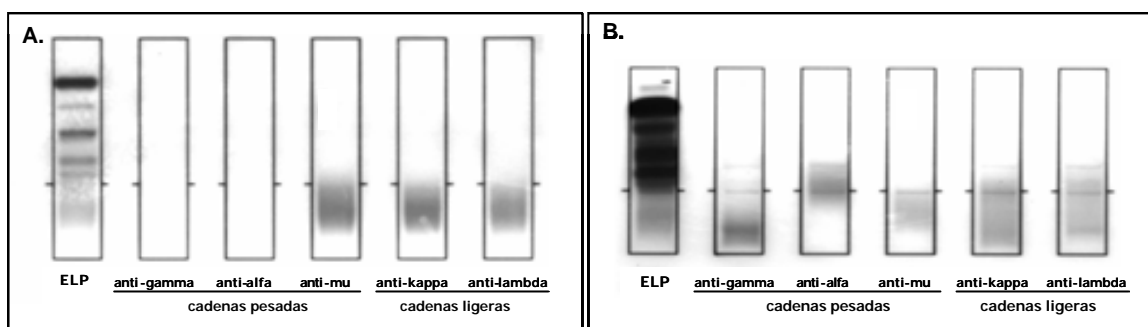


Figura 3.2. **Inmunofijaciones del suero de los pacientes con HIGM.** En el primer carril se muestra el electro-proteinograma (ELP) del suero. El suero del paciente P1 en **A.** muestra una IgM policlonal con cadenas ligeras kappa y lambda. La IF de suero en el paciente P2 en **B.** se realizó con el suero sin diluir, observándose un ligero componente monoclonal del isotipo IgG con cadena ligera lambda.

Tras la suspensión del tratamiento en la paciente P2, la concentración de IgM aumentó hasta llegar a valores normales, siendo la media del periodo previo al tratamiento con IVIGS de 206 ± 61 mg/dl. El aumento inicial de las concentraciones de IgG e IgA séricas fue discreto, disminuyendo hasta ser indetectables en la actualidad. Cabe llamar la atención en el aumento de IgM tras el tratamiento con IVIGS como se evidencia en la **Figura 3.1.B.** El estudio de las subclases de inmunoglobulinas mediante inmunodifusión radial mostró la presencia de las subclases IgG3, IgA1 e IgA2. En el caso de la paciente P2 la IF se realizó sin diluir el suero debido a la baja concentración de los isotipos IgG e IgA, encontrándose un componente mayoritario monoclonal correspondiente a IgG, con cadena ligera lambda.

Se analizaron las poblaciones linfocitarias de sangre periférica de ambos pacientes mediante citometría de flujo. En el paciente P1 se observó la inversión del cociente CD4/CD8, y cifras reducidas de células B (2%) y de células NK (<1%). En la paciente P2 las poblaciones linfocitarias se encontraban dentro de los rangos normales. Como se observa en la **Tabla 3.2.** el porcentaje de células B en el caso P2 muestra cifras normales, así como el resto de poblaciones linfocitarias.

Tabla 3.2. **Análisis de las poblaciones linfocitarias en los pacientes con HIGM.** Se muestran en números absolutos y en porcentaje en el momento del diagnóstico.

Poblaciones Linfocitarias	Caso P1		Caso P1	
	<i>Cel/mm3</i>	<i>%</i>	<i>Cel/mm3</i>	<i>%</i>
T CD3+ (%)	1814	96	1288	79
T CD3+ CD4+ (%)	567	30	701	43
T CD3+ CD8+ (%)	1134	60	505	31
B CD19+ (%)	38	2	118	14
NK CD56+ (%)	18	<1	65	4

RESULTADOS

La progresión de células B inmaduras a células B maduras puede ser monitorizada por la expresión de CD21. El fallo en una apropiada expresión de CD21 o en su complejo de señalización puede interferir por sí misma en una apropiada producción de anticuerpos (Fischer et al. 1998). La expresión de CD21 se analizó mediante citometría de flujo en ambos pacientes, como se observa en la **Figura 3.3.**, las células B CD20 son positivas para este marcador.

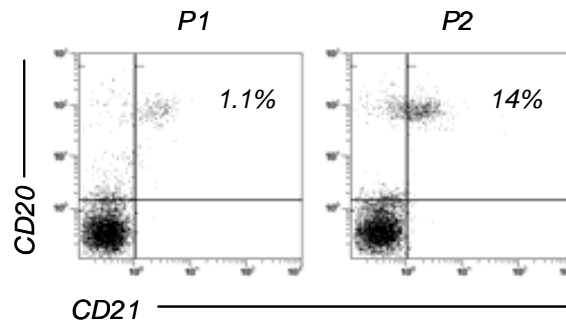


Figura 3.3. **Análisis de la expresión de CD21 y CD20 en los linfocitos de los pacientes con HIGM.** Mediante citometría de flujo se estudió la expresión de CD21 en los linfocitos B de los pacientes P1 y P2.

La expresión de CD27 en células B ha permitido la identificación de células memoria funcionales que han sido subdivididas en dos grupos: IgM-CD27+ que producen IgG, IgM e IgA y las IgM+CD27+ que producen predominantemente IgM (Agematsu et al. 1997). Estudiamos mediante citometría de flujo la expresión de IgM y CD27 en células B CD20 positivas. Para lo cual previamente separamos las PBMCs de sangre periférica mediante gradiente de Ficoll y lavamos tres veces para deshacernos de la IgM del suero. Como se muestra en la **Figura 3.4.** en ninguno de los dos pacientes se observan células IgM-CD27+.

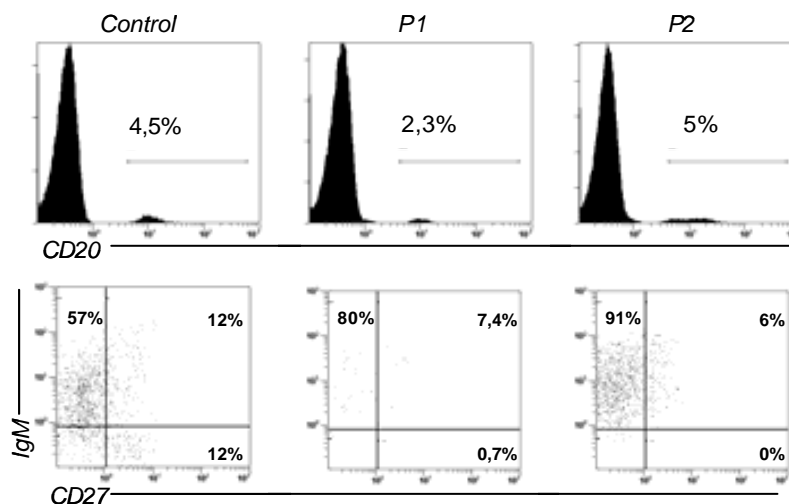


Figura 3.4. **Análisis del fenotipo memoria en las células B de los pacientes con HIGM.** Las PBMCs se tiñeron con CD20, CD27 e IgM y posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo. El análisis se realizó sobre las células CD20+ en un control y en los pacientes P1 y P2 seleccionadas en los histogramas superiores. En los histogramas inferiores se muestra el doble marcaje con IgM y CD27 realizado sobre las células CD20 positivas. Ninguno de los dos pacientes muestra células CD27 de memoria.

La deficiencia de ICOS en humanos ha sido clasificada como un defecto en el cambio de clase de las inmunoglobulinas. La expresión de ICOS en células T activadas en los pacientes con esta deficiencia se encuentra disminuida (Grimbacher et al. 2003).

La expresión de moléculas de activación en las células T de ambos pacientes se estudió tras separar las células PBMCs de sangre periférica, estimularlas con PHA e IL-2 y mantenerlas en cultivo durante cuatro días. Posteriormente, se analizó mediante citometría de flujo la expresión de HLA-DR, CD25 e ICOS sin encontrar alteración en el patrón ni en la dinámica de expresión como se observa en la **Figura 3.5**.

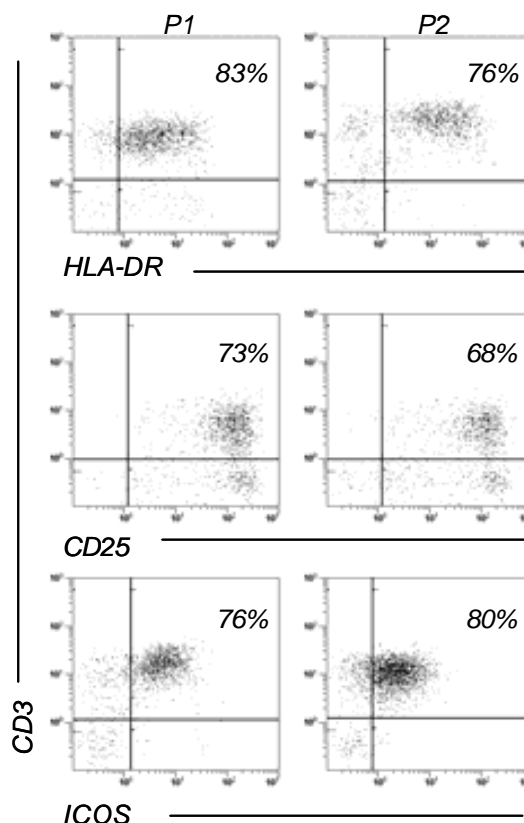


Figura 3.5. **Análisis de la expresión de las moléculas de activación HLA-DR, CD25 e ICOS en células T activadas.** El porcentaje e intensidad de expresión de estos marcadores analizado mediante citometría de flujo es similar en ambos pacientes y a su vez a lo encontrado en DS.

3.3. Estudio de la expresión de CD40 ligando (CD40L) y CD40.

Los defectos en el eje CD40-CD40L son causa del síndrome de hiper IgM, ya que es imprescindible para la colaboración entre las células T y las células B y para los fenómenos derivados de esta, como son el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y la hipermutación somática (Bhushan et al. 2001). Se estudió mediante citometría de flujo la expresión de CD40 y CD40L en los linfocitos CD4 activados y sin activar con PMA (15ng/ml) e ionomicina (300ng/ml) de ambos pacientes y de DS. En los DS la expresión basal de CD40L fue de 0,3% y tras estimulación con PMA e ionomicina se incrementó al 62,3%. La expresión de CD69, utilizada como control de la técnica, fue

RESULTADOS

similar tanto en los pacientes P1 y P2 como en el control tras estimulación con PMA e ionomicina (99,6%, 99,9% y 99,9%, respectivamente). Las células de los pacientes P1 y P2 mostraron una expresión basal de CD40L de un 0,2% en ambos casos, tras la estimulación con PMA e ionomicina la expresión de CD40L se incremento a valores de expresión de 33% y 25% respectivamente, como se muestra a continuación en **Figura 3.6**.

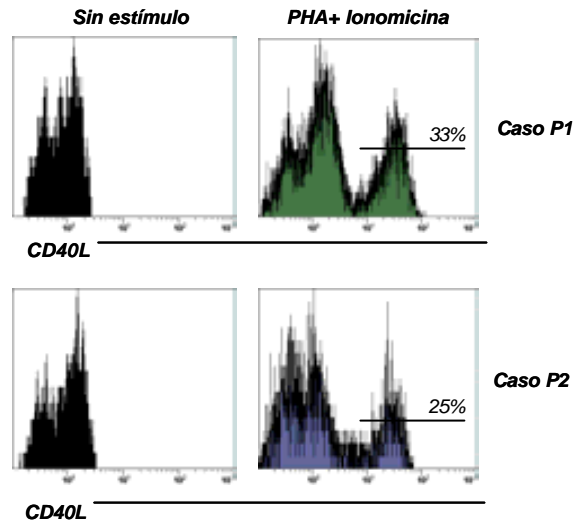


Figura 3.6. **Análisis de la expresión de CD40 ligando en linfocitos T CD4+ mediante citometría de flujo.** La determinación se realizó en PBMN estimuladas durante 6 h en ausencia o presencia de PMA e Ionomicina como se describe en materiales y métodos. Para la cuantificación de la expresión de CD40L en los linfocitos T CD4+ se utilizó el siguiente panel de tres colores: CD3-FITC/CD40L-PE/CD8-ECD. Esto, debido a que la estimulación durante 6 h con PMA e Ionomicina, induce una marcada disminución de la expresión de CD4. Los gráficos muestran el porcentaje de expresión de CD40L en los linfocitos T CD4+ de P1, P2 y el control en estado basal y tras estimulación con PMA e Ionomicina.

Se analizó la expresión de CD40 en los linfocitos de los pacientes y de DS mediante citometría de flujo con la doble tinción de anti-CD20 y anti-CD40 observando que la totalidad de los linfocitos B expresaban CD40.

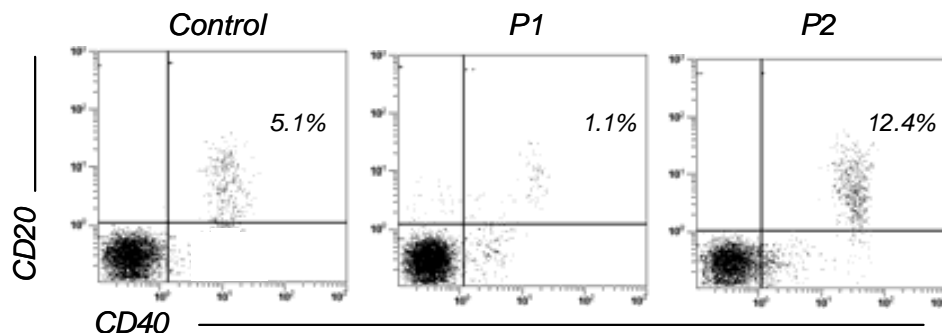


Figura 3.7. **Expresión de CD40 en las células B de los pacientes con HIGM.** Análisis con la tinción anti-CD20 y anti-CD40 en linfocitos de sangre periférica de un donante sano y de los pacientes P1 y P2, mediante citometría de flujo.

3.4. Proliferación celular

Las células PBMCs de los pacientes P1, P2 y de DS fueron aisladas por gradiente de densidad, posteriormente se les indujo la proliferación *in vitro* en presencia de estímulos mitógenos policlonales como fitohemaglutinina (PHA), el mitógeno Pokeweed (PWM), anti-CD3 y los superantígenos enterotoxina del *Staphilococcus A* (SEA) y B (SEB). Tras 48 horas en cultivo, medimos la proliferación como la incorporación de timidina tritiada [³H]. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, la respuesta linfoproliferativa de estos pacientes no mostró diferencias respecto a los DS como se observa en la **Figura 3.8**.

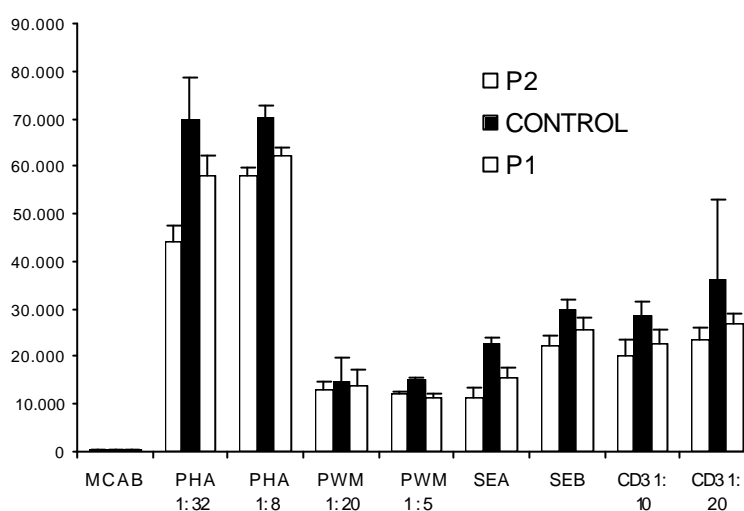


Figura 3.8. **Proliferación celular frente a estímulos mitogénicos en los pacientes con HIGM.** Gráfico donde se expresan la respuesta proliferativa en cuentas por minuto (c.p.m.) x10³ de células mononucleares de sangre periférica de ambos pacientes P1 y P2 comparada con DS. No existen diferencias significativas en la proliferación frente a mitógenos entre los pacientes P1 y P2 y los DS.

3.5. Estudio genético

El síndrome de hiper IgM ligado al X es la forma más común de herencia dentro de los síndromes de hiper IgM, no obstante han sido descritas otras formas de herencia autosómicas dominante (Lee et al. 2005). Estas formas del síndrome de hiper-IgM están caracterizadas por la ausencia de mutaciones en el gen *TNFSF5*, el cual codifica para CD40L, y por una expresión normal de CD40L en membrana de linfocitos T CD4 activados. El resto de defectos genéticos descritos en la literatura en pacientes con hiper IgM son intrínsecos a las células B. La ausencia de alteraciones en la expresión de CD40 y CD40 ligando en los pacientes aquí descritos, nos llevaron a estudiar el gen AID responsable del síndrome con de Hiper-IgM tipo2 (HIGM2) de herencia autosómica recesiva. La secuencia de los cinco exones fue estudiada a partir de ADN genómico en ambos pacientes y en DS. Los exones fueron amplificados utilizando primers situados en los intrones adyacentes,

RESULTADOS

posteriormente el producto amplificado fue secuenciado en ambas direcciones. No se encontraron mutaciones responsables de la enfermedad en ninguno de los exones analizados.

Los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas están localizados en un cluster en el cromosoma 14 conteniendo 9 genes funcionales y 2 pseudogenes, se han encontrado deleciones dentro de esta región que originan deficiencias en las subclases de las inmunoglobulinas (Pan et al. 2000). El hecho de que la paciente P2 mostrara niveles bajos de IgG y más concretamente de la subclase IgG3 además de IgA1 e IgA2 nos hizo pensar en el estudio de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, para lo cual estudiamos la parte constante de las cadenas pesadas $\gamma 1$ y $\gamma 2$. El estudio de posibles deleciones en las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas se realizó con técnicas de PCR a partir de DNA genómico, las secuencias de las regiones constantes de las cadenas pesadas IgG1 e IgG2 no mostraron alteraciones en ninguno de los pacientes.

La deficiencia en ICOS fue descrita inicialmente en homocigosis (Grimbacher et al. 2003), no obstante durante el análisis de dos grandes grupos de pacientes con CVID se encontraron cinco pacientes con mutaciones heterocigotas en esta molécula (Warnatz et al. 2006). Para analizar posibles defectos genéticos en esta molécula se obtuvo RNA de células estimuladas y posteriormente se amplificó el cDNA, a partir del cual se secuenció. No se encontraron alteraciones en la secuencia de ICOS en ninguno de los dos pacientes.

3.5.1. Estudio de tipaje HLA

En la literatura se ha descrito el caso de un paciente con hiper IgM ligada al X y otro con defectos en la señalización vía CD40 con una forma de artritis simétrica, masas extra-articulares y con factor reumatoide negativo. Se ha sugerido que los defectos en el eje de señalización CD40-CD40L podrían contribuir a la susceptibilidad de padecer artritis inflamatoria severa (Sibilia et al. 1996) (Webster et al. 1999).

Se realizó el tipaje de los alelos DR de HLA de clase II de ambos pacientes mediante secuenciación. El análisis de alta resolución de ambos alelos dio como resultado en el paciente P1 el tipaje DRB1*0404; DRB1*1401. Datos bibliográficos muestran una fuerte asociación entre el DRB1*0404 y la artritis reumatoide (Thomson et al. 1999). En la paciente P2 el tipaje de alta resolución fue el siguiente DRB1*0102; DRB1*1602.

3.6. Estudio de sinovia

El paciente P1 desarrolló nódulos subcutáneos similares a los encontrados en artritis reumatoide, así como artritis de cadera que requirió sustitución quirúrgica, lo que nos permitió el estudio de sinovia mediante inmunofluorescencia directa con diferentes anti-sueros.

Tras realizar cortes criostáticos de sinovia se evidenciaron infiltrados celulares organizados en focos y constituidos mayoritariamente en un 90% por células CD3+ y en un 10% por células CD20+

que teñían únicamente con IgM, constatando la ausencia de IgG e IgA, morfológicamente compatibles con células plasmáticas. Las células T se distribuían en un 90% de células CD4+ encontrándose activadas como lo muestra la expresión de HLA-DR; presentando en menor proporción (10%) de células CD8+.

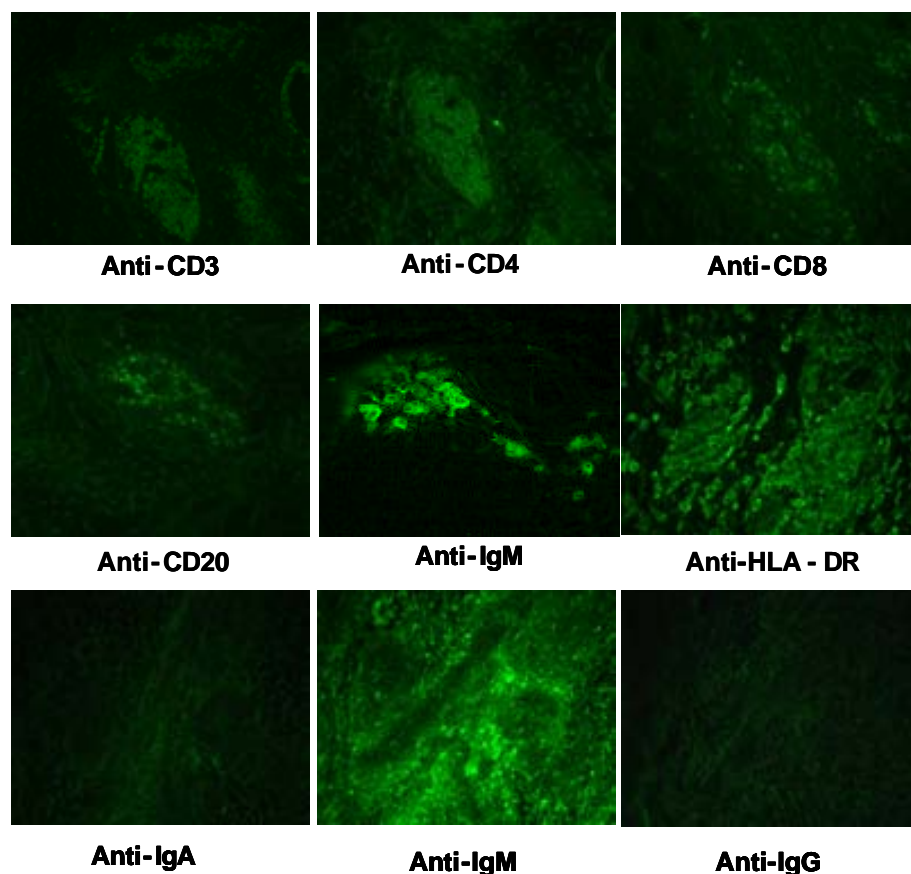


Figura 3.9. **Fluorescencia directa sobre sinovia procedente del paciente P1.** Se analizó la presencia de células CD3+, CD4+, CD8+ y CD20+, HLA-DR+ así como la expresión de IgM, IgA e IgG de superficie. Se evidenciaron infiltrados celulares organizados en focos y constituidos mayoritariamente (90%) por células CD3+.

4. Deficiencia en adenosín deaminasa

4.1. Caso clínico

Describimos el caso de un varón caucásico con antecedentes familiares de consanguinidad y un hermano sano en 1996, con retardo pondero-estatural, que presentó infecciones de repetición que afectaban a bronquios, tracto gastrointestinal y la articulación de la cadera, acompañado de una severa linfopenia durante los seis primeros meses de vida. A esa edad ingresó por neumonía intersticial, aislándose *Pneumocistis carinii* en lavado bronqueo-alveolar (LBA). Se realizó un estudio de virus que resultó negativo (virus sincitial respiratorio, virus parainfluenza y virus gripal A y B)

Los niveles de transaminasas en el suero de este paciente estaban elevados, AST (GOT) 127 U/L (<37), y ALT (GPT) 58 U/L (<41), y la fosfatasa alcalina de 1004 U/L (rango normal 40-130).

4.2. Parámetros inmunológicos

La primera analítica de las poblaciones linfocitarias se realizó a los seis meses de edad y mostró una linfopenia severa sugiriendo una inmunodeficiencia severa combinada. La determinación de inmunoglobulinas mostró niveles normales para la edad, como se indica en la **Tabla 4.4**. A pesar de que los niveles de IgG eran normales, el estudio mediante inmunofijación mostró un componente monoclonal IgG lambda, que a la edad de un año pasó a convertirse en un doble componente de la clase IgG.

El mielograma mostró celularidad normal; una serie eritroblástica del 58% y predominio poliortocromático con formación de nidos. Serie granulopoyética y monocítica del 6% con predominio promielo-promielonormocítica. Monocitos 2%, macrófagos 2%, linfocitos 6%, células plasmáticas 2%, sideroblastos 88%. Moderada anemia y trombocitopenia.

Dado que la linfopenia afectaba tanto a una estirpe T como a la B se sospechó un SCID, lo que junto a los altos niveles de transaminasas sugirió un defecto metabólico, por lo que se estudio la actividad de los enzimas adenosín deaminasa (ADA) y Purin nucleósido fosforilasa (PNP). El estudio de la actividad de estos enzimas se lleva a cabo en eritrocitos, la actividad de ADA en este paciente se encontraba muy disminuida respecto a los controles, en cambio la actividad de la PNP se encontraba dentro de los niveles normales **Tabla 4.1**. Esta prueba fue determinada por la Unidad Diagnóstica de enzimopatías del departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Actividad enzimática		
	ADA	Purin nucleósido fosforilasa
paciente	<0.01	35,35
controles	1,01+/- 0,37	41,76+/- 13,07

Tabla 4.1. **Determinación de la actividad enzimática de las enzimas ADA y PNP** en el paciente previo al trasplante de médula ósea y en controles.

Una vez confirmado el diagnóstico y observándose un empeoramiento progresivo del paciente consecuencia de la toxicidad que genera la falta de actividad del enzima ADA, se comenzó el estudio de histocompatibilidad en el paciente y en su familia, para la realización de un trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH).

Tipaje HLA		
Locus HLA	paciente	madre
A	31, --	25, --
B	5, 7	5, 7
Cw	7, --	7, --
DRB1*	1501, 1501	0401, 1501

Tabla 4.2. **Tipaje HLA del paciente y de su madre.** Los locus de clase I se estudiaron por técnicas serológicas, mientras que el locus de clase II HLA-DRB1 se estudió por técnicas de biología molecular.

Una vez estudiados los loci HLA de clase I y clase II del paciente y su familia se eligió la madre como posible donante haploidéntico, (el tipaje HLA se muestra en la **Tabla 4.2.**) Además, se realizó un cultivo mixto linfocitario (CML) para evaluar las reacciones de las moléculas de HLA de clase II, que previamente habían sido tipadas por biología molecular y mostraban una diferencia en HLA-DR. Para lo cual se utilizó un control con el siguiente tipaje HLA (A 01,33; B 08, 14; Cw 04, 16; DR 03,-).

El resultado del CML es difícilmente evaluable ya que la respuesta del receptor estaba disminuida frente al donante y frente al control, como se observa en la **Tabla 4.3.** Por el contrario la respuesta de la donante contra el receptor fue negativa y valorable. La falta de aloreactividad (donante→ receptor) era debida a la homocigosis en los loci de clase HLA-II en el paciente, por lo cual el trasplante se llevó a cabo.

A los nueve meses de edad se le practicó un trasplante de médula ósea de donante emparentado (madre). Al ser el donante haploidéntico se hizo con previa depleción parcial de linfocitos T. El paciente falleció a los cuatro meses del trasplante por un linfoma cerebral.

RESULTADOS

Cultivos unidireccionales			Cultivos bidireccionales			células con M.C.
célula estimulado- ra irradiada	célula responde-dora	c.p.m.	célula estimulado-ra irradiada	célula responde-dora	c.p.m.	c.p.m.
R	D	728	R	D	1398	245
D	R	640	R	C	16518	940
C	D	7002	D	C	7229	231
C	R	1851				

Tabla 4.3. **Cultivo Mixto linfocitario evaluado mediante incorporación de Timidina-H³**, expresada en cuentas por minuto (c.p.m.). R. receptor, D. donante, MC medio de cultivo. En negrita indica irradiado.

La recuperación del sistema inmunológico del paciente tras el trasplante fue evidente si comparamos las cifras de linfocitos absolutos y los niveles de inmunoglobulinas, ambos disminuidos antes del trasplante y recuperados a los tres meses del trasplante como se indica en la **Tabla 4.4.**

	TMO				
	6 meses	9 meses	Post-TMO: 1 mes	2 meses	3 meses
Linfocitos/mm ³	370	380	1040	1410	2110
T CD3+ /mm ³	266	198	645	743	1139
T CD4+ /mm ³	59	133	312	676	401
T CD8+ /mm ³	159	38	239	70	633
B CD19 /mm ³	7	57	2	28	338
NK CD56+ /mm ³	ND	ND	291	117	359
IgG (mg/dl)	630	412	426	770	1050
IgA (mg/dl)	9	<7	53	66	197
IgM (mg/dl)	491	56	40	79	70

Tabla 4.4. **Análisis de poblaciones linfocitarias e inmunoglobulinas antes y tras el trasplante de médula ósea (TMO).** A los seis meses se observa una severa linfopenia. A los tres meses del trasplante el sistema inmunológico del paciente se encuentra totalmente recuperado. ND, no determinado.

5. Síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS).

5.1. Descripción de los casos clínicos

En general la enfermedad linfoproliferativa en los pacientes con ALPS se asocia a la presencia de enfermedad autoinmune, y las manifestaciones clínicas incluyen episodios recurrentes de anemia hemolítica, trombocitopenia idiopática, adenopatías y/o esplenomegalia. Estudiamos once pacientes con rasgos fenotípicos de ALPS. Diez de los pacientes analizados en este trabajo presentan esplenomegalia persistente, linfadenopatía periférica o ambas. Cabe llamar la atención que el sujeto A-II no ha desarrollado ningún rasgo clínico de enfermedad linfoproliferativa, ni autoinmune. Salvo este, el resto de los casos presentaron trombocitopenia al inicio de los síntomas. Los que cursaron con esplenomegalia, posteriormente fueron esplenectomizados lo que en muchos de los casos corrigió el cuadro clínico. En todos ellos existen citopenias sanguíneas autoinmunes. Solo en dos de los casos (A-I y D) se constata un aumento de la concentración de linfocitos en sangre periférica. Y solo el paciente D desarrolló un proceso linfoproliferativo maligno (linfoma de Burkitt). Los datos clínicos y de laboratorio están incluidos en la **Tabla Resumen 5.4.** página 127 y en las **Tablas 5.1, 5.2. y 5.3.** El árbol familiar de cada uno de los casos estudiados se muestra en la **Figura 5.1.** A continuación se recoge una breve historia de cada uno de ellos.

FAMILIA A:

Mujer caucásica (A-I), hija de padres sanos (padre A-II y madre A-III). Que a los cuatro años de edad debutó con esplenomegalia gigante, la cual llegó a ocupar la fosa ilíaca izquierda. No mostró adenopatías ni hepatomegalia. El estudio microbiológico fue negativo. La existencia de una severa trombopenia, resistente a tratamientos farmacológicos hizo que a la edad de 7 años se le practicara una esplenectomía, que solucionó la trombopenia. Desde ese momento hasta hace unos meses ha estado asintomática sin tratamiento y con vacunación actualizada (incluido *S. pneumoniae*, conjugada, no conjugada y *H. influenzae*). A los 13 años de edad ingresó por sospecha de una meningitis bacteriana que fue diagnosticada de meningitis neumocócica, y que se resolvió con antibioterapia. En la actualidad no percibe ningún tratamiento y se encuentra asintomática.

El resultado de la fórmula leucocitaria en el momento del diagnóstico de la paciente (A-I) subyacen niveles de neutrófilos y plaquetas inferiores a los rangos normales. Los niveles de leucocitos y linfocitos mostraron niveles aumentados para su edad. El recuento leucocitario en sus padres fue normal. El estudio de las subpoblaciones linfocitarias mostró una disminución del número y el porcentaje de las células CD3+CD4+ y CD3+CD8+ disminuidas en la paciente (A-I). Acompañado de un elevado porcentaje (39%) de células CD3+TCR $\alpha\beta$ CD4-CD8- doble negativas (DNT), dato que se encontró también en el análisis de las subpoblaciones linfocitarias del padre (A-II), el cual presentó un 36% de células DNT.

El análisis de los niveles de inmunoglobulinas de la paciente (A-I) mostró concentraciones séricas elevadas de IgG e IgE; los niveles de IgA en su padre (A-II) estaban ligeramente aumentados.

RESULTADOS

En la paciente (A-I) se detectaron ANAs positivos con un patrón moteado y título 1/80, no así en sus padres. En la madre (A-III) los parámetros analizados se encontraron en los rangos normales.

Paciente	Sexo	Edad de comienzo	Linfoproliferación				Autoinmunidad					
			Adenopatía	Esplenomegalia	Leucocitos	Linfocitos	Linfoma	Anemia	Trombocitopenia	Neutropenia	ANAs	Infecciones
A-I	M	4	no	si	16	11,2	no	no	si	si	M 1/80	no
A-II	V	NE	no	no	ND	3,1	no	no	no	no	no	no
B-I	V	7	si	si	8	ND	no	no	si	si	no	no
B-II	V	D	si	no	6,4	ND	no	si	si	si	no	no
B-III	M	4	no	si	3,5	ND	no	no	si	si	no	no
B-IV	V	2	no	si	3,1	ND	no	si	si	si	no	no
C	V	9	si	si	2,1	1,05	no	si	si	si	no	si
D	V	16	si	si	9,6	5,1	Linfoma de Burkitt	no	si	si	no	si
E	V	14	si	si	8,8	1,9	no	no	si	si	M 1/160	no
F-I	M	20	no	si	10,7	3,1	no	si	si	no	M 1/320	no
F-II	V	15	no	si	5,8	1,8	no	no	si	no	M 1/160	si

Tabla 5.1. **Características clínicas de los pacientes con sospecha de ALPS.** Consideramos anemia con valores de hemáties inferiores a $3,8 \times 10^9/L$, trombopenia con valores inferiores a $140 \times 10^9/L$ y neutropenia con valores inferiores a $1,8 \times 10^9/L$. Los valores normales de leucocitos y linfocitos están en los rangos ($3,8-11 \times 10^9/L$) y ($1-4 \times 10^9/L$), respectivamente. NE, no presenta enfermedad. D, desconocido. ND, no determinado. V, varón. M, mujer.

FAMILIA B:

Se trata de una amplia familia en la que hemos estudiado cuatro de sus miembros. Iniciamos el estudio de un varón caucásico de 20 años de edad (B-I), hijo único con antecedentes familiares, cuyo padre sufrió un linfoma linfocitario y falleció de sepsis neumocócica. Su tío paterno (B-II) fue diagnosticado de Sd. de Evans (por la asociación de anemia hemolítica y púrpura trombocitopénica idiopática (PTI)) y su prima hermana (B-III) y primo segundo (B-VI) por parte paterna mostraron esplenomegalia desde temprana edad.

El paciente (B-I) se remitió a los siete años de edad para el estudio de esplenomegalia y adenopatías latero cervicales. Presentó varios episodios de trombopenia inmune, que cedieron con tratamiento IVIG, corticoterapia e inmunosupresores. Se le practicó esplenectomía a los doce años. Presentó varios episodios de neutropenia y anemia autoinmune que también respondieron a dicho tratamiento. A lo largo del periodo ha presentado poliartralgias, rinitis alérgica, eczema xerodérmico y pitiriasis alba.

Su prima hermana, una mujer de 19 años de edad (B-III) ingresó a los cuatro años de edad por una convulsión febril. A la edad de seis años se detectó una gran esplenomegalia y a los trece años fue esplenectomizada. No presentó linfadenopatías periféricas ni abdominales, pero sí citopenias generalmente leves que fueron previas a la esplenectomía. No mostró incidencias hematológicas ni infecciosas desde la esplenectomía.

Su primo segundo, varón de 10 años de edad (B-IV), que a los dos años presentó una gran esplenomegalia. Mostró citopenias desde la primera consulta hasta que se le esplenectomizó con cinco años de edad. Ambos presentaron leucopenia y neutropenia respondedoras al tratamiento con corticoides e IVIG.

Los cuatro miembros de esta familia analizados mostraron trombocitopenia y neutropenia, solo dos de ellos (B-II) y (B-IV) presentaron anemia. El número absoluto de leucocitos y linfocitos en todos ellos se encontró dentro de los rangos normales. Las subpoblaciones linfocitarias fueron analizadas en todos ellos encontrando porcentajes de células DNTs entre un 8% y un 2%.

El análisis de los niveles de inmunoglobulinas en los pacientes de esta familia mostró los niveles de IgG aumentados únicamente en el paciente (B-III), en cambio las concentraciones de IgA se encontraron ligeramente aumentadas en todos ellos. No se detectaron ANAs en ninguno de los pacientes de esta familia.

FAMILIA C:

Varón caucásico sin antecedentes familiares, que a los nueve años debutó con neutropenia autoinmune. Fue tratado con corticoides y G-CSF. Posteriormente, sufrió anemia hemolítica autoinmune con test de Coombs positivo para el isotipo IgG y plaquetopenia autoinmune con test de Coombs positivo para el isotipo IgM.

Desde los 16 años hasta los 18 presentó infecciones graves en el área gingival, celulitis facial, acceso testicular, y neumonía. Así como lesiones purpúreas en extremidades inferiores, se desconoce si de origen vasculítico o idiopático. En el transcurso del 2004 presentó esplenomegalia gigante, neutropenia autoinmune y pancitopenia autoinmune. Fue tratado con el antimalárico Fansidar®, que no mejoró el cuadro. Se le realizó esplenectomía en enero de 2005 y falleció a los 20 años de edad en 2006 a causa de una sepsis por *Clostridium sp.*

El recuento leucocitario en este paciente puso de manifiesto la presencia de anemia, trombocitopenia en distintas fase de su enfermedad, con una neutropenia grave ($0,3 \times 10^9/L$ neutrófilos) durante todo curso de la misma. El dato más llamativo del análisis de las subpoblaciones linfocitarias fue el hallazgo de un 32% de células CD3+CD4+CD8+, de las cuales el 17% eran TCR $\alpha\beta$. La concentración de IgG e IgM se encontró marcadamente elevada en este paciente.

Todos los parámetros fueron analizados en los miembros de su familia sin encontrar hallazgos llamativos, por encontrarse en los rangos normales.

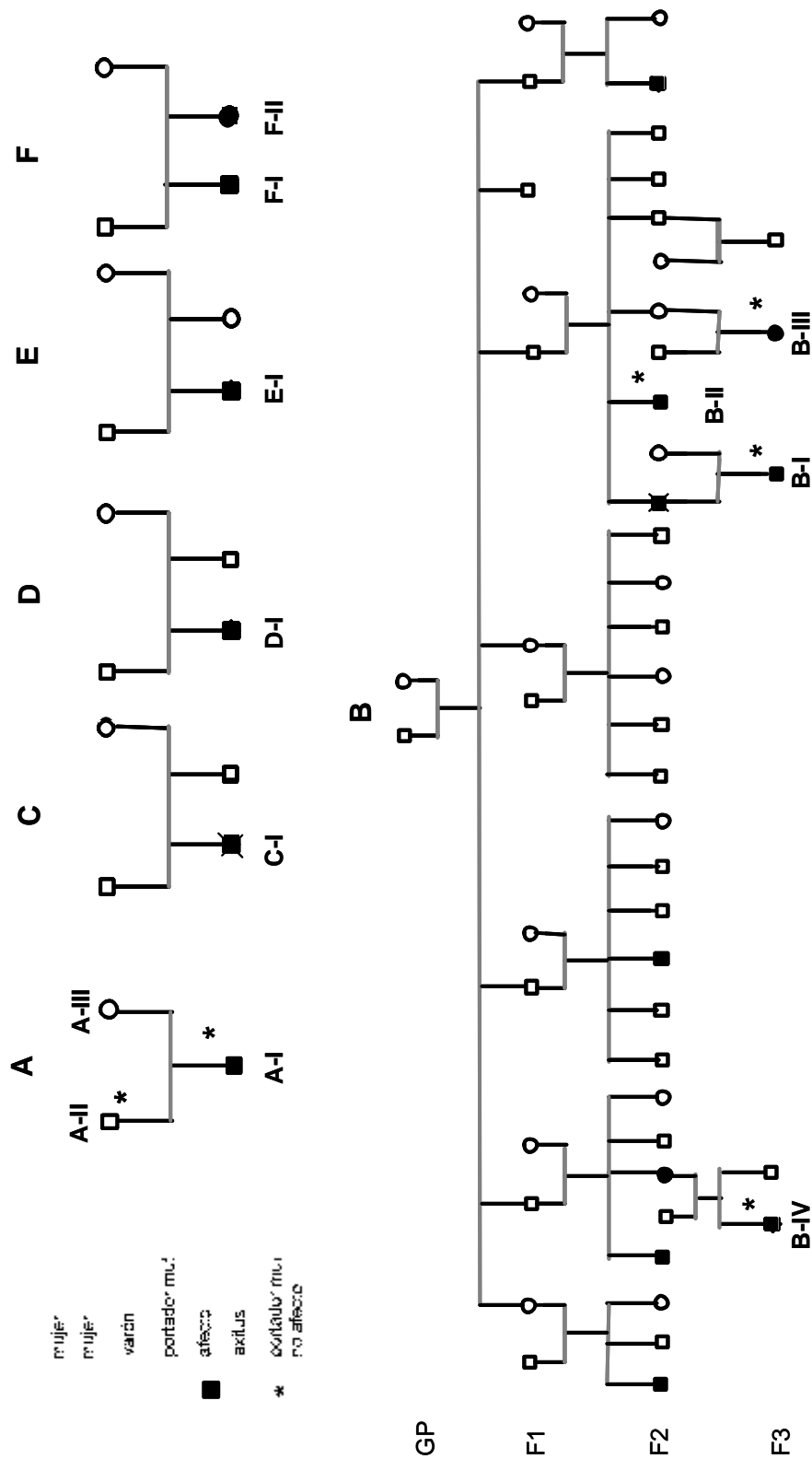


Figura 5.1. **Árbol genealógico de las familias con sospecha de ALPS.** Los pacientes estudiados se señalan con una letra que identifica a la familia seguida de un número romano. La leyenda aparece arriba a la izquierda. GP generación paterna. F generación filial.

FAMILIA D:

Varón caucásico sin antecedentes familiares, que a los 16 años presentó trombocitopenia y neutropenia con buena respuesta inicial a corticoides. Fue diagnosticado de síndrome autoinmune, recibiendo múltiples tratamientos entre ellos, corticoides a dosis altas, azatioprina, anti-CD20, y esplenectomía. A la edad de 22 años, en el año 2000 presentó múltiples adenopatías laterocervicales, carotídeas y axilares.

En junio del 2001 ingreso en UCI por encefalitis aguda, con buena respuesta a corticoides. En enero del 2002 fue diagnosticado de linfoma de Burkitt y tratado con cuatro tandas de hiper-CVAD y posterior auto-TPH. En febrero de 2002 presentó artritis séptica en rodilla derecha por *E. coli*, que requirió drenaje quirúrgico. Posteriormente presentó shock séptico por *E. coli* en diciembre de 2002 y que fue resuelto con antibioticoterapia. Los últimos tratamientos para el ALPS fueron micofenolato-mofetil, que se revelo ineficaz y ciclosporina más corticoides. Ingresó en abril 2003 por fiebre, rigidez nuchal, y cultivos de LCR y hemocultivos positivos para *E. coli* resistente a múltiples antibióticos, con shock séptico y necesitando UCI durante unos días. En la actualidad está asintomático.

El recuento leucocitario en las fases tempranas de la enfermedad mostró valores disminuidos de plaquetas y neutrófilos, los valores de leucocitos han sido variables durante el curso de la enfermedad. Presentando una ligera linfocitosis en algunas fases de la misma. Las subpoblaciones linfocitarias mostraron un 3% de células DNTs y niveles de células B en el límite superior. Las concentraciones de inmunoglobulinas no mostraron alteraciones llamativas. Todos los miembros de su familia fueron estudiados sin encontrar alteraciones valorables.

FAMILIA E:

Varón caucásico sin antecedentes familiares que debutó a los 14 años de edad con trombocitopenia autoinmune y esplenomegalia. Tras dos años de evolución se le practicó esplenectomía la cual resolvió el cuadro clínico, en la actualidad se encuentra asintomático.

El recuento leucocitario mostró niveles disminuidos de plaquetas y neutrófilos, con cifras normales de hematíes, leucocitos y linfocitos. El análisis de las subpoblaciones linfocitarias puso de manifiesto un 7% de células DNTs y un 20% de células B. Las concentraciones de inmunoglobulinas en el suero de este paciente estaban dentro de los rangos normales. El suero del paciente fue positivo frente a antígenos nucleares con un patrón moteado y un título 1/160. Al igual que en el resto de los casos, fueron analizados todos los miembros de su familia sin encontrar alteraciones.

FAMILIA F:

Mujer caucásica (F-I) que debutó con trombocitopenia idiopática a la edad de 20 años. A los 24 años desarrolló una esplenomegalia que fue tratada con cirugía, posteriormente desarrollo un lupus eritematoso sistémico (LES). No se refiere consanguinidad aunque si antecedentes familiares, ya que su hermano menor varón (F-II) debutó a los 15 años con púrpura trombocitopénica idiopática y esplenomegalia, que se hizo crónica. En la actualidad esta en discusión el tratamiento quirúrgico de esplenectomía.

RESULTADOS

Ambos hermanos mostraron niveles disminuidos de plaquetas, que en el caso de la hermana (F-I) se encontraban acompañados de una disminución en el número de hematíes. El estudio de las subpoblaciones en la paciente (F-I) mostró un 5% de DNTs, no así en su hermano (F-II) en el que solo había un 1%. Los niveles de IgG e IgA en la paciente (F-I) estaban elevados, mientras que en su hermano (F-II) se encontraban en los rangos normales. Ambos presentaron ANAs positivos con títulos 1/320 (F-I) y 1/160 (F-II) y un patrón moteado.

5.2. Estudio serológico, inmunoglobulinas y autoanticuerpos

En todos los casos se realizó la determinación de inmunoglobulinas, factor reumatoide y proteínas del complemento (C3 y C4) mediante nefelometría. Concentraciones séricas elevadas de uno o más isotipos de inmunoglobulinas apoyan el diagnóstico de ALPS.

La paciente A-I presentó un incremento de las concentraciones séricas de IgG e IgE; mientras que los niveles de IgG en su padre A-II estaban ligeramente aumentados. En todos los casos de la familia B los niveles de IgA estaban aumentados y los de IgG mostraron rangos normales. El paciente C presentó una elevada concentración de IgG, y un incremento de IgM. La paciente F-I tenía niveles aumentados de IgG e IgA. En el resto de pacientes (D, E y F-II) la dosificación de inmunoglobulinas se encontraba dentro de los rangos normales. Las proteínas del complemento C3 y C4 y el FR se encontraban dentro de los rangos normales en todos ellos como se observa en la **Tabla 5.2**.

	<i>A-I</i>	<i>A-II</i>	<i>B-I</i>	<i>B-II</i>	<i>B-III</i>	<i>B-IV</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F-I</i>	<i>F-II</i>	<i>Valores normales</i>
<i>IgG (mg/dl)</i>	2120	1770	1350	1260	2210	1630	3500	1220	1500	2360	1060	723-1685
<i>IgA (mg/dl)</i>	164	477	544	434	536	349	275	59	45	463	198	69-382
<i>IgM (mg/dl)</i>	8	65	29	63	42	35	619	374	182	91	222	40-230
<i>IgE (UI/ml)</i>	3050	125	36	68	26		98	159	136	58	64	3-160
<i>FR (UI/ml)</i>	<20	94	22	<20	<20	<20	113	<20	<20	<20	<20	0-20
<i>C3 (mg/dl)</i>	120	ND	94,7	105	101	112	108	104	147	96	99	85-193
<i>C4 (mg/dl)</i>	21	ND	26	24	25	34	25	20	20,4	41	19	12-36

Tabla 5.2. **Parámetros inmunológicos séricos.** Tabla en la que se muestran las concentraciones de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas, de las proteínas del complemento, (C3, C4) y de factor reumatoide (FR) de todos los pacientes en el momento del diagnóstico.

La determinación de la presencia de auto-anticuerpos se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta encontrándose cuatro pacientes con ANAs positivos, dos de ellos (F-I y F-II) de la misma familia, la paciente F-I presentaba un patrón moteado con títulos superiores a 1/320 y se detectaron anticuerpos anti-U1RNP, su hermano presentó un patrón moteado con título de 1/80. El paciente E

mostró un patrón moteado de ANAs con título 1/160. En la paciente A-I se detectaron ANAs positivos con un patrón moteado y título 1/80. En todos ellos se descartó la presencia de anticuerpos anti-DNA. Ver tabla 5.1.

5.3. Análisis fenotípico de las poblaciones linfocitarias

Uno de los datos analíticos más característico de las poblaciones linfocitarias en los pacientes con ALPS es el aumento de las células T CD3+ CD4-CD8- dobles negativas. El porcentaje de estas células en sangre periférica se correlaciona en muchos casos con el grado de linfoproliferación, no obstante existe una enorme variación entre diferentes pacientes afectos, que va de un 1% a un 75% (Sneller et al. 1997). Analizamos las poblaciones linfocitarias en sangre periférica en todos los pacientes mediante citometría de flujo. La cifra de linfocitos totales fue normal en todos los pacientes excepto en la paciente A-I y en el paciente D en los que se encontraban aumentadas, como se observa en la **Tabla 5.3**. De los once pacientes, seis presentan un incremento del número de células B en múltiples determinaciones. El número de células NK es variable en este grupo de pacientes pero en todos los casos se encuentra dentro de los rangos de normalidad.

Tras el análisis de la población de células T se observa un ligero aumento de las células CD8 respecto al número de células CD4, lo que en muchos casos disminuye el cociente de células CD4/CD8. En la familia A tanto la enferma (A-I) como su padre (A-II) presentaron un porcentaje elevado (36-39%) de células T doble negativas (CD4-CD8-), mientras que en la madre esta población no superó el 4%, encontrándose dentro de los valores de un DS.

	A-I		A-II		B-I		B-II		B-III		B-IV		C		D		E		F-I		F-II		Rangos normales
<i>Linfocitos absolutos/mm³</i>	11180	%	3170	%	4500	%	3900	%	3100	%	2600	%	1050	%	5120	%	1940	%	3090	%	4740	%	1000-4000
T CD3+	8050	72	2568	81	3060	68	2964	76	3159	81	2145	55	809	77	3686	72	1358	70	1792	58	4313	91	832-2028 (61-84)
CD3+CD4+	2124	19	634	20	1080	24	1365	35	1131	29	1170	30	339	38	2191	43	601	31	989	32	806	47	480-1339 (33-59)
CD3+CD8+	1789	16	951	30	1395	31	1326	34	1716	44	858	22	237	26	1275	25	582	30	618	20	3413	42	351-911 (18-47)
CD3+CD4-CD8-	4807	43	1268	40	585	13	234	6	390	10	156	4	179	32	338	7	194	10	247	8	142	3	<10%
TCR DN a/b	4360	39	1141	36	279	6,2	85,8	2,2	78	2	78	2	41	4	154	3	136	7	155	5	57	1	<1%
TCR g/d	335	3	127	4	225	5	144,3	3,7	78	2	78	2	136,5	13	189	4	30	1,5	102	3	62	1	<10%
B CD19+	2460	22	254	8	1080	24	273	7	195	5	1560	40	200	19	742	15	388	20	865	28	142	3	94-378 (6-16)
NK CD56+	335	3	190	6	360	8	195	5	78	2	78	2	42	4	701	14	58	3	340	11	190	4	120-490 (6-30)

Tabla 5.3. **Subpoblaciones linfocitarias de todos los pacientes estudiados con sospecha de ALPS**, en el momento del diagnóstico. En cada subpoblación se detalla el porcentaje y el número absoluto de cada población.

RESULTADOS

Los pacientes de la familia B presentaron porcentajes de células DNTs entre un 13% y un 4%. En el paciente C un 32% de las células T eran dobles negativas para CD4 y CD8. Los pacientes D y E tenía un 7% y un 10% de células doble negativas respectivamente. El que presentó menor número (3%) de esta población fue el paciente F-II, mientras que su hermana tenía un 8% de células DNT.

Para realizar el análisis de las poblaciones TCR $\gamma\delta$ o TCR $\alpha\beta$ con una única combinación de marcadores, lo que evitaría una acumulación de errores de cálculo en el porcentaje final de células DNTs. Teñimos los correceptores CD4 y CD8 con FITC, el receptor TCR $\gamma\delta$ con PE y el marcador CD3 con PC5. Tras seleccionar las células CD3 positivas, analizamos en un histograma doble las fluorescencias 1 (FITC) y 2 (PE). En el tercer cuadrante obteníamos directamente en porcentaje de células CD3+CD4-CD8- TCR $\alpha\beta$ como se observa en la **Figura 5.2**.

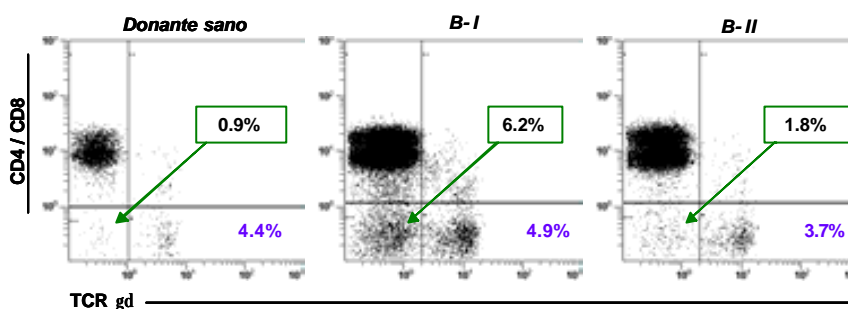


Figura. 5.2. **Análisis de la población DN TCR $\alpha\beta$** . Mediante tinción directa se marcaron los linfocitos de donantes sanos, y de los pacientes B-I y B-II. Se analizaron por citometría de flujo, seleccionándose los linfocitos CD3 positivos. En el recuadro verde se indica el porcentaje de células doble negativas TCR $\alpha\beta$, debajo y a la derecha de cada histograma se indica el número de células doble negativas TCR $\gamma\delta$.

Según esta combinación y aplicando este criterio, ningún DS (n=20) presentaba un porcentaje superior al 0,9% de la población doble negativa TCR $\alpha\beta$. Por el contrario, el paciente con cifras más bajas tenía un 1,8% de células DNTs. Llamativamente en el caso C el 17% de las células DNTs eran positivas para TCR $\gamma\delta$. En el resto de los casos el porcentaje de células TCR $\gamma\delta$ osciló entre un 1% y un 5%. El porcentaje de las células DNT se recogen en la **Tabla 5.3**.

Estudiamos la expresión de Fas mediante citometría de flujo en las células T de todos los pacientes, encontrando una distribución idéntica a la observada en células T de DS en todos ellos, excepto en el paciente C en el cual solo el 29% de las células CD3 expresaban Fas con los mismos niveles que los DS. Por lo que en este paciente analizamos la expresión de Fas específicamente en cada una de las subpoblaciones T CD4, CD8 y DNTs observando que solo la mitad de las células CD4 y de las DNTs expresaban Fas, como se observa en la **Figura 5.3**.

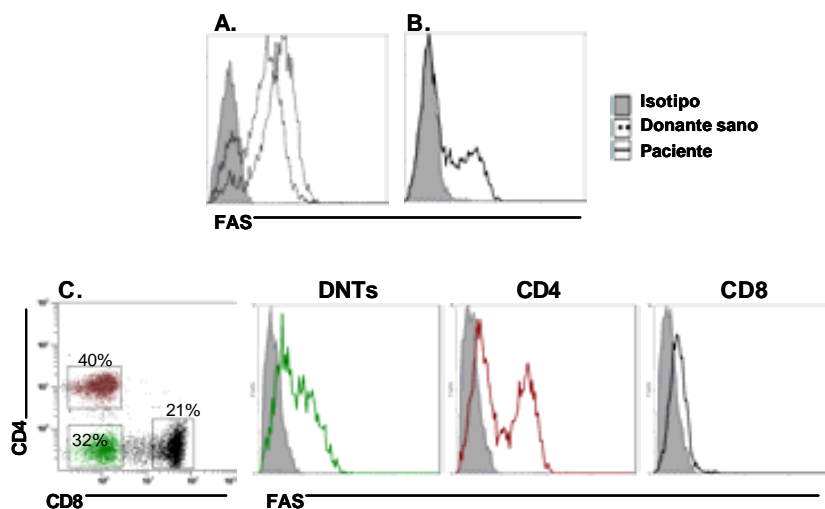


Figura 5.3. **Análisis de la expresión de la molécula Fas en las células CD3 de los pacientes estudiados.** **A.** Expresión de Fas en el paciente E y un donante sano. **B.** Expresión de Fas en el paciente C, en la que solo un 30% de las células T son positivas para Fas. **C.** Análisis de la expresión de Fas en las subpoblaciones CD3 del paciente C.

5.4. Inducción de la apoptosis

La ligación de Fas por anticuerpos monoclonales o por Fas ligando soluble induce la muerte celular programada en linfocitos CD4 activados. Se ha demostrado que la sensibilidad para lograr la apoptosis es más lenta en células maduras por lo que se requiere una activación previa de los linfocitos con PHA (Lenardo et al. 1999). La evaluación funcional de la apoptosis vía Fas se analizó en células PMBCs previamente estimuladas con PHA en presencia de IL-2 durante seis días. Posteriormente y mediante un tratamiento con el anticuerpo anti-Fas (CH11) del isotipo IgM durante 20 horas se indujo la muerte celular programada.

Estandarizamos la técnica en la línea celular humana Jurkat y en células PBMCs procedentes de DS. Tras la inducción de la apoptosis en los blastos de DS y en los de pacientes, esta fue analizada mediante citometría de flujo con la tinción de anexina-V y ioduro de propidio. En el análisis de la viabilidad de las células en las que se indujo la muerte celular se observa que las células apoptóticas además de marcarse positivamente para anexina-V, sufren cambios en su morfología. Estos cambios se observan en el histograma doble FS:SS donde aparecen dos núcleos celulares bien diferenciados. Por una parte, una población homogénea que corresponde a las células vivas, ventana W y otro núcleo de células con un tamaño más variable (FS) y de morfología más irregular (SS), ventana Y, como se observa en la **Figura 5.4**. En las células que han sufrido apoptosis tras el tratamiento con anti-Fas, el porcentaje de células en la ventana W disminuye, aumentando el de la ventana Y.

RESULTADOS

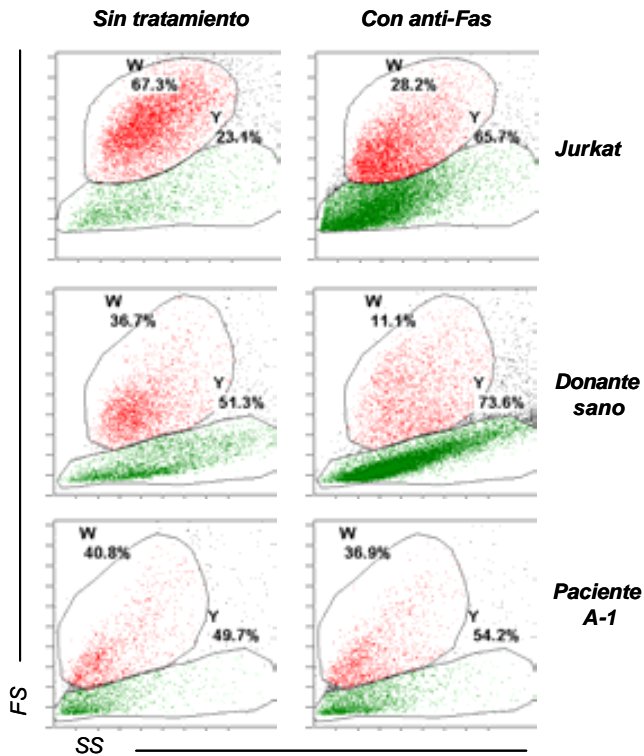


Figura 5.4. **Cambios en la morfología de los linfocitos tras la inducción de apoptosis.** La apoptosis *in vitro* se realizó tras tratar las células de pacientes y controles con PHA e IL-2 durante una semana; posteriormente y mediante se indujo la apoptosis con el anticuerpo monoclonal anti-Fas (CH11). En la parte superior de la figura se observan los cambios morfológicos en línea celular JURKAT. Tras inducir la apoptosis los linfocitos cambian su morfología pasando de la ventana W a la Y. La apoptosis se detectó por tinción de anexina-V-FITC seleccionando las células de la ventana W. En un paciente con ALPS, la parte inferior de la figura, no se observa cambio en la morfología.

El porcentaje de apoptosis se determinó cuantificando la expresión de anexina-V en las células seleccionadas en la región W. La media del porcentaje de apoptosis en la línea celular Jurkat fue de $(50,3 \pm 7,5)$ y en DS $(41,6 \pm 12,1)$. El porcentaje de apoptosis de las células de los pacientes pertenecientes a las familias A, B y D estaba disminuido muy significativamente ($p < 0,01$) tras la inducción de esta. En el caso del paciente C el porcentaje de apoptosis mostraba una diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a los donantes sanos. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células sensibles a la apoptosis vía Fas en el paciente E aunque estaba ligeramente disminuida respecto a la media de los DS. Respecto a los pacientes de la familia F se observó una resistencia a la apoptosis inducida vía Fas en la paciente F-I, mientras que su hermano F-II el porcentaje de apoptosis no mostraba diferencias significativas respecto al porcentaje observado en donantes sanos, **Figura 5.5.**

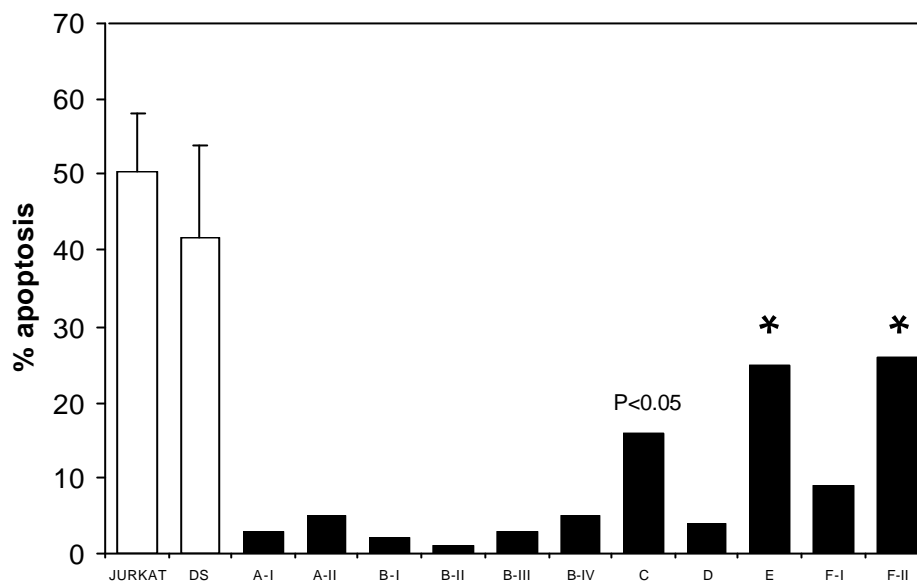


Figura 5.5. **Análisis de la apoptosis vía Fas.** Diagrama de barras donde se indica el porcentaje de apoptosis tras la inducción de la muerte celular con el anticuerpo anti-Fas (CH11) en la línea celular Jurkat, en blastos de donantes sanos (DS) (en punteado) y en los pacientes estudiados (en negro). Los pacientes muestran una apoptosis inducida por anti-Fas disminuida muy significativamente ($p < 0,01$) en relación con los donantes sanos. * no existen diferencias significativas.

5.5. Estudio genético

El síndrome linfoproliferativo autoinmune se clasifica según el defecto genético, así el tipo 0 presenta mutaciones homocigotas que causan una completa deficiencia de la proteína Fas. El tipo I muestra mutaciones heterocigotas en Fas (tipo Ia) o en Fas ligando (tipo Ib) asociadas con defectos parciales de la apoptosis. El tipo II se caracteriza por resistencia a la apoptosis mediada por Fas a pesar de la expresión normal de Fas y Fas ligando, (se han encontrado dos pacientes con mutaciones en caspasa 10 y en caspasa 8). En el ALPS tipo III presenta una apoptosis normal *in vitro* y el defecto genético no está esclarecido (Rieux-Laucat et al. 2003).

Realizamos el estudio del gen que codifica para Fas, *TNFRSF6*, para ello secuenciamos inicialmente DNA genómico de todas las muestras utilizando primers adyacentes de los exones de dicho gen. El análisis de las secuencias del exón 9 mostró una mutación puntual heterocigota en la paciente A-I y en su padre A-II en la posición 943 (G→A 943), que da lugar a una transición de guanina a adenina, generando una transición heterocigota aminoácido Arg-234-Gln (R234Q), como se observa en la **Figura 5.6. A.**

Localizamos otra mutación en la secuencia del exón 9 del gen *TNFRSF6* en todos los pacientes de la familia B. Esta mutación consistía en una transición heterocigota de una C por una T en la

RESULTADOS

posición 942 (C→T 942), implicando al mismo codon que en la familia A, con la diferencia de que la mutación de la familia B genera una parada en la pauta de lectura Arg-234-STOP (R234X).

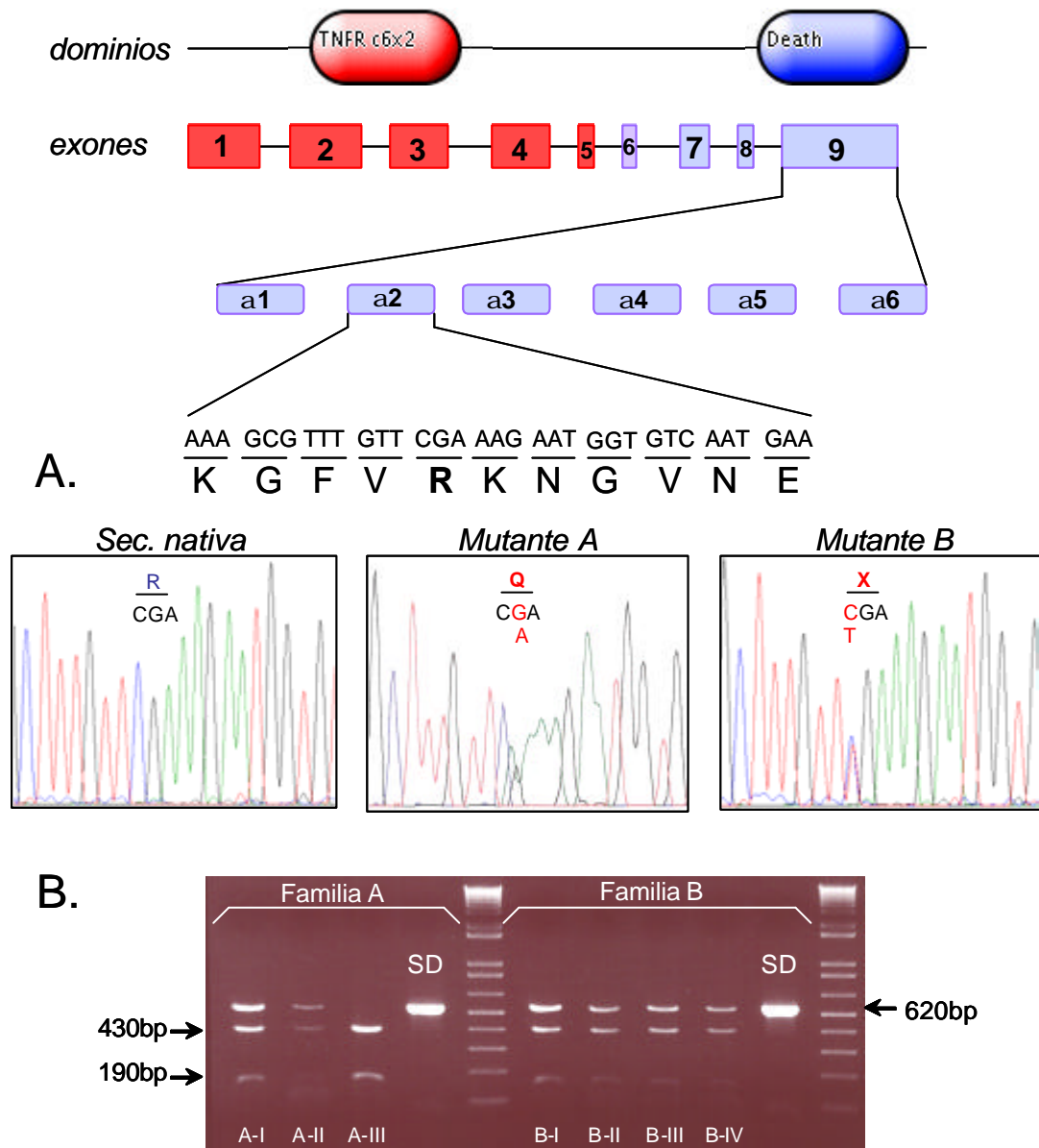


Figura. 5.6. **Análisis molecular del exón 9 del gen *TNFRF6* en las familias A y B.** **A.** Electroferograma donde se muestra la posición mutada en la familia A (G943A) y en la familia B (C942T), que por encontrarse en heterocigosis aparecen como un doble pico debido a la superposición de la secuencia normal y la mutada. **B.** PCR-RFLP del exón 9 del gen *TNFRF6*. El análisis de restricción con el enzima Taq1 genera dos fragmentos de 430bp y 190bp en los donantes sanos, como en la madre (A-III) de la familia A. En todos los pacientes que portan la mutación se genera un fragmento adicional de 620bp, que corresponde a la banda sin digerir. SD. Sin digerir.

Se realizó el análisis mediante enzimas de restricción del exón 9 en las familias A y B con el enzima Taq1, que tiene como diana de corte la secuencia TCGA. Este enzima permite distinguir entre portadores y no portadores de las familias A y B; en los mutados solo se digiere una copia del exón, ya que la otra por estar mutada pierde el punto de corte. La secuencia amplificada del exón 9 tiene un tamaño de 620bp, en un donante sano se generan dos fragmentos de 430bp y 190bp tras la digestión, como se observa en la **Figura 5.6.B**. En los pacientes mutados de ambas familias encontramos un fragmento adicional de 620bp que corresponde a la banda sin digerir.

Para analizar el resto del gen realizamos la extracción de RNA en el resto de muestras y posteriormente obtuvimos el cDNA que amplificamos y secuenciamos. El resultado confirmó las mutaciones en el exón 9 en las familias A y B, y la falta de alteraciones en el resto de los pacientes.

La descripción de mutaciones somáticas en la subpoblación de células DNTs por en pacientes con ALPS tipo III el grupo de Rieux-Laucat nos hizo pensar en la posibilidad de que algunos de los pacientes estudiados pertenecieran a este grupo (Holzelova et al. 2004). El paciente C en el que habíamos encontrado una expresión disminuida de Fas en las células T CD4 y en las DNTs (apartado 5.3), además de una respuesta parcial a la apoptosis inducida *in vitro*, estudiamos de manera aislada las poblaciones T CD4, CD8 y células DNTs. Para lo cual las separamos mediante "sorting" obteniendo una pureza del 99% en cada una de ellas. Se realizó la extracción de RNA de cada subpoblación (CD4, CD8 y DNT) y posterior cDNA y secuenciación del gen *TNFRSF6*. El análisis de la secuencia no mostró mutaciones en el gen *TNFRSF6* en ninguna de las poblaciones.

5.6. Hallazgos anatomopatológicos

Recogimos los datos histológicos de ganglio y bazo en los casos en los que hubo biopsia o esplenectomía. Esta bien definido que en los casos de ALPS existe una expansión de la zona T paracortical de ganglio linfóide, así como una pérdida de la arquitectura del tejido linfóide y esplénico (Buckley et al. 1999).

En el caso A-I se analizó el bazo tras la esplenectomía observándose folículos B reducidos, casi inexistentes, el mismo hallazgo se encontró en ganglio como se observa en la **Figura 5.7**. En la zona T se observaron gran cantidad de linfocitos con expresión aberrante de marcadores de células T (pérdida parcial de la expresión de CD3 en estas células tanto en ganglio como en bazo, que marcan con CD4 pero no con CD8). La expresión de CD20 en folículos mostró una disposición normal.

En el bazo del caso D el parénquima esplénico mostró una arquitectura normal con signos de éxtasis crónico, con una hiperplasia moderada de la zona marginal y algún pequeño agregado histiocitario. Se le extrajo y analizó ganglio en dos ocasiones en 2001 mostró hiperplasia B folicular policlonal, que presentó hiperplasia del área T con agregados de elementos más inmaduros. En 2002 muestra una proliferación linfóide maligna monoclonal lambda clasificada como linfoma B linfoblástico tipo Burkitt.

RESULTADOS

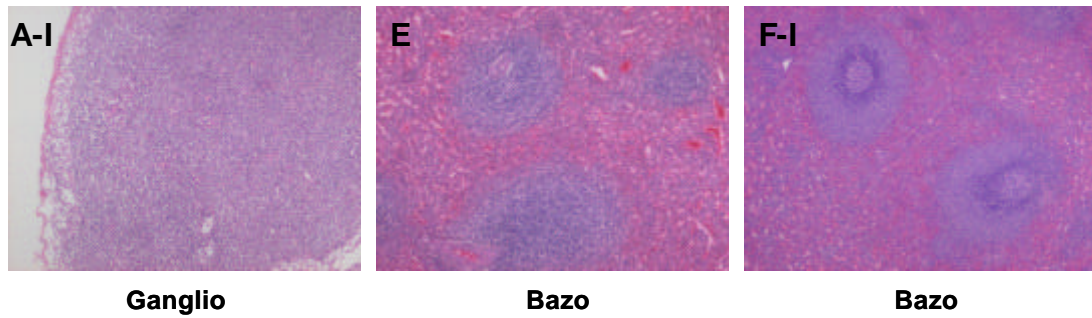


Figura 5.7. **Hallazgos patológicos en pacientes con ALPS.** Histopatología de ganglio en el paciente A-I donde se observa una pérdida de organización tisular. Imágenes de bazo en el paciente D donde se observa una infiltración linfocitaria en pulpa roja. En la imagen de bazo del paciente F-I se observa una arquitectura conservada.

En el caso E el análisis anatomopatológico del bazo mostró infiltración linfocitaria en pulpa roja, CD20 que marca folículos linfoides B, con pérdida parcial de expresión de CD3, los linfocitos infiltrantes se tiñen más débilmente que los del folículo siendo negativos para CD8 negativo. En el paciente F-I se estudió el bazo tras esplenectomía el cual mostró una morfología normal, con un aumento en el número de macrófagos.

6. Linfoproliferación DP

6.1. Descripción del caso clínico

Estudiamos la evolución de un varón caucásico de 32 años que ingresó en nuestro hospital en 1996 con un cuadro de insuficiencia respiratoria aguda (IRA), mal estado general, fatiga, fiebre alta, tos, disnea, hemoptisis y síntomas extrapulmonares (artromialgias).

Lo que requirió ingreso, oxigenoterapia y tratamiento con altas dosis de corticoides. La radiografía de tórax y la tomografía axial computerizada (TAC) mostraron infiltrados bilaterales cambiantes durante la crisis de IRA. La respuesta tanto clínica como radiológica a dosis altas de corticoides (250-300mg Prednisona (PDN)) fue extraordinaria, como se observa en las Figuras 6.1.A, B. y C.

El perfil citológico del lavado bronqueoalveolar (LBA) no presentó infiltración eosinófila. Por esta razón se descartó el diagnóstico original de una neumonía aguda eosinofílica. También se descartaron otras causas como infecciones, consumo de drogas, fármacos o colagenopatías. Estos datos, junto al análisis anatomopatológico de la biopsia de pulmón (**Figura 6.2.D.**) permitieron el diagnóstico de neumonía organizada con bronqueolitis obliterante de origen idiopático (BOOP), no detectándose ni hepatoesplenomegalia, ni linfadenopatía en ninguna fase de la enfermedad.

Desde ese momento y durante los últimos diez años ha referido múltiples episodios de menor intensidad (aproximadamente unos 40), similares a un síndrome gripal (distermia, fiebre elevada, tos, artromialgias) acompañados de disnea y presentando en ocasiones esputos hemoptoicos. Tres de estos episodios han sido extremadamente graves (2000, 2003 y 2005), requiriendo ingreso en cuidados intensivos.

A partir de la segunda crisis en el año 2000, se instauró un tratamiento con PDN y diferentes regímenes de inmunosupresores, constatándose que la única asociación capaz de mantener asintomático al paciente durante un periodo largo de tiempo (2000-2003) fue ciclosporina-A (300mg/d), azatioprina (100mg/d) y PDN a dosis descendientes. Tras la última crisis en enero de 2005, sigue un tratamiento con PDN 30mg/día. No obstante el paciente va variando la dosis en función de la sintomatología, aumentándola hasta 60mg/día. En la actualidad y desde hace cinco meses está siendo tratado de nuevo con la triple terapia. En general los cuadros se inician siempre con pródromos de 24-48 horas de duración de mal estar general, astenia, mialgias y fiebre alta 38-39°C. Posteriormente aparece tos que acaba siendo hemoptoica. Los episodios graves siempre se han encontrado asociados a una intensa hipoxemia.

En condiciones estables los gases en sangre son normales, manteniendo una función pulmonar que solo muestra un ligero patrón restrictivo y un descenso mínimo de la difusión de CO₂. Los episodios no se han relacionado nunca con una situación ambiental determinada. Retrospectivamente se observa una estrecha relación entre las crisis de insuficiencia respiratoria y la disminución de dosis de corticoides.

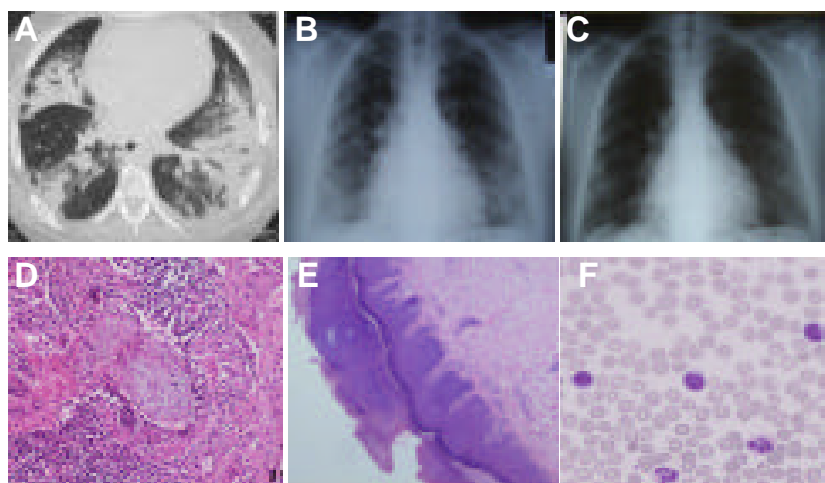


Figura 6.1. **Placas tórax, TAC y biopsias.** **A.** TAC que muestra múltiples lesiones nodulares y condensaciones diseminadas en parénquima pulmonar. **B.** Radiografía de tórax mostrando opacidades bilaterales cambiantes, particularmente en la base de los pulmones. **C.** Imagen tras 12h del tratamiento con corticoides. **D.** Biopsia pulmonar mostrando polipos intraluminales de tejido fibroblástico (Cuerpos de Masson), histopatología compatible con bronqueolitis obliterante con neumonía organizativa (BOOP). **E.** El patrón histológico de la biopsia de piel consiste en hiperqueratosis sin presencia infiltración celular. **F.** Extensión de sangre periférica donde se observan linfocitos de pequeño tamaño con contorno nuclear regular.

Desde el tercer episodio en 2003 hasta la fecha, el paciente ha mantenido una linfocitosis media (8.000-10.000 cells/mm³). En todas las analíticas del periodo (2000-2006) se constata una anemia con una concentración media de hemoglobina de 100+/-9 g/L, (siendo el rango normal de concentración en un varón adulto 135-170 g/L). La media de leucocitos 19,8+/-3.1 x10⁹ células/L se encuentra aumentada comparada con el rango normal (3,80-11) x10⁹ células/L. Existe desviación izquierda y una velocidad de sedimentación globular (VSG) mayor de 80.

El síndrome anti-sintetasa es un trastorno no bien definido, poco frecuente, incluido hasta ahora dentro de las miopatías inflamatorias idiopáticas y que cursa con manos de mecánico. Desde el punto de vista neumológico tiene una asociación con un cuadro de afección pulmonar intersticial. El paciente presentó lesiones cutáneas en ambas manos que fueron catalogadas como “manos de mecánico”, se descartó la presencia de anticuerpos anti-sintetasa mediante precipitación de RNAs. Posteriormente, se realizó biopsia de piel no encontrándose infiltración linfocitaria como se muestra en la **Figura 6.1.E**. La extensión de sangre periférica mostró una morfología normal de las células, ver **Figura 6.1.F**. No se detectaron anticuerpos contra el virus linfotrópico humano I (HTLV-I) ni II (HTLV-II), tampoco frente al virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1) ni 2 (HIV-2).

RESULTADOS

6.2. Evolución de poblaciones en sangre periférica y en lavado broncoalveolar (LBA)

El seguimiento y caracterización de las células DP del paciente en sangre y en LBA se realizó mediante citometría de flujo, con anticuerpos monoclonales específicos marcados con diferentes fluorocromos.

Analizamos la evolución de las subpoblaciones de células T en extracciones regulares durante los últimos cinco años. Representamos los valores absolutos de cada una de ellas en la gráfica de la **Figura 6.2.**, en la cual destaca el incremento de la población T CD3+CD4+CD8+ a lo largo del tiempo, tanto en porcentaje como en números absolutos. El aumento de células DP se acentúa a partir de la tercera crisis a comienzos del 2003. Esta progresión repercute en el incremento de la cifra total de linfocitos CD3.

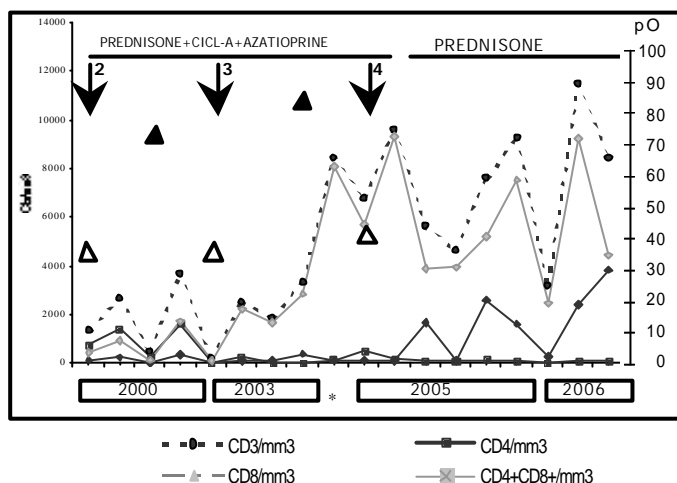


Figura 6.2. **Diagrama cronológico de la evolución de las subpoblaciones T del paciente.** Las diferentes crisis severas están marcadas con una flecha y un número (la primera crisis fue en 1996). En la parte superior se muestran los tratamientos a lo largo del periodo. En el eje de la izquierda en números absolutos (CIs/mm³). En el eje derecho se muestra la pO₂, la cual decrece en las crisis (triángulos abiertos) y muestra valores normales fuera de las crisis (triángulos cerrados). * 2004.

La población T CD3+CD4+CD8- disminuyó con el tiempo hasta estabilizarse en un 2% del total de las células CD3+ (102-196 linfocitos/mm³). El número de células T CD3+CD4+CD8+ osciló entre un 1 y un 8 % incrementándose en las últimas analíticas hasta un 33% (2620 linfocitos/mm³).

El resto de poblaciones linfocitarias, células B y células NK se han mantenido estables en números absolutos. Encontramos niveles disminuidos tanto porcentualmente como en números absolutos de linfocitos B que oscilaron en las diferentes analíticas entre un 1-3% (89-7 linfocitos/mm³), las células NKs CD56+ oscilaron entre un 1-4% (136-98mm³).

Presentamos el análisis retrospectivo de las poblaciones linfocitarias T en sangre periférica y en LBA desde el primer episodio severo de insuficiencia respiratoria aguda en la Figura 6.3. Existen

datos de las poblaciones linfocitarias T en tres LBAs coincidiendo con los episodios severos de insuficiencia respiratoria. La obtención del LBA se realizó por broncoscopia y las células mononucleares se obtuvieron tras filtrado con fibra de vidrio.

El estudio de LBA perteneciente a la primera crisis se realizó en ausencia de tratamiento corticoideo, las poblaciones linfocitarias en este LBA muestran proporciones similares a las que se podría encontrar sangre periférica. Los otros dos LBA, se realizaron una vez el tratamiento corticoideo fue instaurado, y se corresponden a la segunda y cuarta crisis.

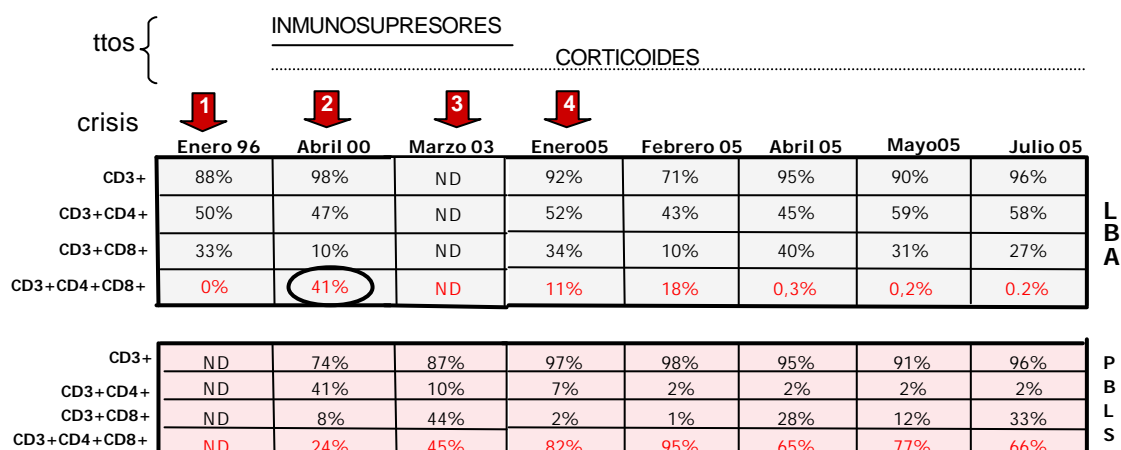


Figura 6.3. **Esquema de la distribución de poblaciones linfocitarias en sangre y LBA.** Las flechas rojas muestran extracciones en el momento de crisis. Línea superior discontinua indica el periodo de tratamiento con corticoides. Línea continua indica el periodo de tto con inmunosupresores. ND. No determinado.

El análisis de las poblaciones linfoides en LBA en la segunda crisis mostró, que el 41% del total de células del infiltrado correspondían una población de células T CD3+CD4+CD8+. Simultáneamente, el análisis en sangre periférica constató la presencia de dicha población DP en un 24%. Aunque el porcentaje de células DP en este LBA es el doble que en PBLs las proporciones de células T simples positivas son similares.

En la cuarta crisis la población DP era un 11% del infiltrado del LBA, mientras que el porcentaje de células DP en sangre periférica era el 82% de las células CD3+, observándose una disminución de las poblaciones simples positivas CD4 y CD8 en sangre periférica. A comienzos del 2005 y coincidiendo con la suspensión del tratamiento con inmunosupresores (Azatioprina y Ciclosporina-A) se analizaron las poblaciones linfocitarias en sangre periférica y LBA del paciente en cuatro ocasiones, con una frecuencia de mes y medio entre cada una de ellas. En todas las extracciones de sangre se encontró la población DP, la cual disminuyó desde un 95% (7062/mm³) tras la crisis, hasta un 66% (3887/mm³). En LBA, solo se encontró la población T CD3+CD4+CD8+ en la primera extracción tras la crisis, estando ausente en las analíticas posteriores. En PBLs siempre existe una alta proporción de células DP tanto en los momentos de crisis como fuera de ellos y es independiente

RESULTADOS

del número de células DP en LBA. En LBA las células DP disminuyen fuera de los periodos de crisis y los porcentajes de células CD3+CD4+CD8- y CD3+CD4-CD8+ en LBA son superiores a las que se observan en linfocitos de sangre periférica.

6.3. Fenotipo de la población en sangre periférica

La caracterización fenotípica completa de la población linfocitaria de este paciente se llevó a cabo a lo largo de toda la evolución de la enfermedad. Debido al carácter anómalo de esta población linfocitaria se estudió la presencia de diferentes marcadores celulares, tanto inducidos por activación, como algunos que usualmente muestran expresión constitutiva.

6.3.1. Niveles de expresión de CD4 y CD8 $\alpha\beta$ en las células CD3+CD4+CD8+

Se realizó el estudio inmunofenotípico de células T procedentes de sangre periférica del paciente, de donantes sanos y de timocitos derivados de timo extraído de pacientes que fueron sometidos a cirugía cardiaca sin existencia de patología inmune aparente. Para ello se tiñeron con anticuerpos monoclonales contra diferentes antígenos de superficie y posteriormente se analizaron por citometría de flujo.

Las células teñidas se representaron según su tamaño y granularidad, lo que permitió diferenciar y seleccionar las distintas poblaciones celulares (linfocitos, monocitos y granulocitos) en diferentes ventanas para su posterior análisis. Las células en reposo del paciente mostraron características morfológicas similares a los linfocitos procedentes de donantes sanos. Una vez localizada por morfología la ventana de linfocitos, sobre ella fue seleccionada la población de linfocitos positivos para CD3. Posteriormente se realizó el análisis en el histograma doble para los marcadores CD4 y CD8, ver **Figura 6.4**.

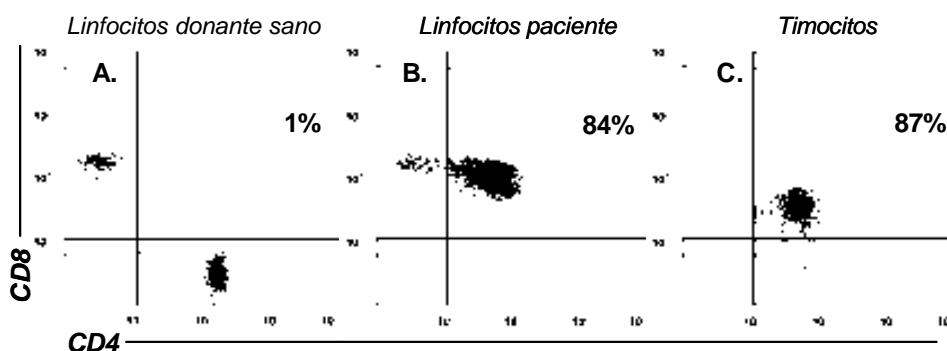


Figura 6.4. **Identificación y cuantificación de la subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ de sangre periférica** de: **A.** Donante sano, **B.** Paciente y **C.** Timocitos. Cada punto representa una célula marcada con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 y/o anti-CD8. En el eje de abscisas se muestran las células CD4+ y en el eje de ordenadas las células CD8+. El porcentaje de células doble positivas se indica en el cuadrante superior derecho. Resultados similares se obtuvieron en 3 experimentos independientes.

Se determinaron los niveles de expresión de las moléculas de superficie CD3, CD4 y CD8 en sangre periférica, mediante una medida relativa de la cantidad de moléculas expresadas en la superficie celular, la media de intensidad de fluorescencia (MFI) en una población linfocítica mayoritaria compuesta por linfocitos T CD3+CD4+CD8+. Los niveles de expresión de CD3 en la población doble positiva (11.44+/-2.85) son similares a los de una población de linfocitos T de un DS, MFI (12.65+/-1.86) ($p>0.05$).

La MFI de CD8 en las células doble positivas de sangre periférica muestra una expresión equivalente a la que se encuentra en linfocitos CD3+CD4-CD8+ en donantes sanos (12,45+/-0,97 vs 14,98+/-3,93) ($p>0.05$). La intensidad para el correceptor CD4 de la población doble positiva del paciente es equivalente a la de las células CD3+CD4+CD8- de DS (MFI) (12,65+/-2,66 vs 16,45+/-1,29) ($p>0.05$), como se detalla en la **Tabla 6.1**. Al comparar los linfocitos DP con timocitos DP observamos que la MFI es muy inferior en esta última tanto, para CD4 como en CD8. La MFI de CD4 y CD8 en timocitos es significativamente menor que en los linfocitos de sangre periférica, tanto en las células DP como en las simples positivas. La expresión de los correceptores CD4 y CD8 se ha analizado en todas las extracciones encontrándose variabilidad en el porcentaje de células pero no en la intensidad de fluorescencia.

receptor analizado	linfocitos donante sano	linfocitos paciente	timocitos	linfocitos DS vs paciente	linfocitos paciente vs timocitos
CD3	12.65+/-1.86	11.44+/-2.85	3.84+/-1.52	NS	$p<0,01$
CD4+(DP)	N.D.	12.65+/-2.66	4.82+/-1.28	NS+	$p<0,01$
CD8+(DP)	N.D.	12.45+/-0.97	5.07+/-1.34	NS+	$p<0,01$
CD4+	16.45+/-1.29	17.75+/-3.50	6.30+/-2.46	NS	$p<0,01$
CD8+	14.88+/-3.93	16.90+/-4.36	4.46+/-1.91	NS	$p<0,01$

Tabla 6.1. **Media de intensidad de fluorescencia (MFI) de CD4 y CD8 en las subpoblaciones T.**
 Tabla donde se muestra la MFI como media +/- desv. stand de los receptores CD3, CD4 y CD8 en diferentes subpoblaciones celulares del paciente, donantes sanos y timocitos. N.D. No determinado. NS. No significativo. NS+ Comparación entre CD4 de linfocitos DP y de linfocitos SP del paciente.

Debido a que se han encontrado distintas situaciones patológicas en las que los linfocitos T CD3+CD4+CD8- pueden expresar el homodímero CD8 $\alpha\alpha$ generando un fenotipo doble positivo; estudiamos por citometría de flujo la expresión de la cadena α y la cadena β del CD8 en esta población doble positiva, observando que la expresión de la cadena β del CD8 es homogénea y todas las células DP expresan el heterodímero CD8 $\alpha\beta$. Tras el análisis de CD8 β en estas células podemos decir que toda la población DP expresa la cadena β del CD8 con la misma intensidad que lo expresan células T CD4-CD8+ de donantes sanos como se observa en la **Figura 6.5**.

RESULTADOS

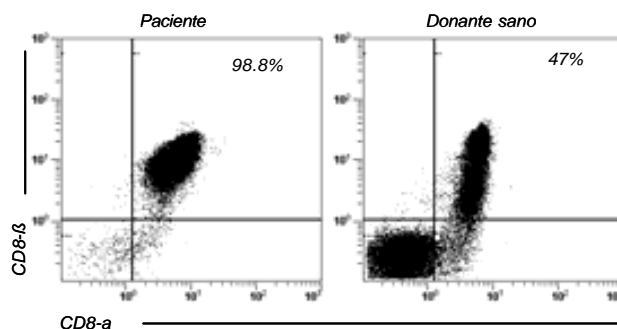


Figura 6.5. **Expresión de las moléculas CD8a y CD8b en los linfocitos CD3.** Mediante citometría de flujo se determinó la expresión de membrana de las cadenas α y β del CD8. En el donante sano se el 22% de las células CD3 expresan la cadena β , y en el paciente se expresa en el 98,8% de las células CD3.

6.3.2. Análisis de la expresión de las isoformas de CD45

El antígeno CD45 juega un papel clave en la superficie celular en la regulación de las señales mediadas por el receptor de la célula T. Básicamente, la mayoría de las células T neonatales y las células T adultas llamadas células vírgenes, pertenecen a la subpoblación que expresa la isoforma CD45RA⁺, mientras que la isoforma CD45RO⁺ la expresan las células T denominadas células de memoria, que han sido previamente activadas y que responden bien a antígenos de recuerdo (Clement 1992). Mediante citometría de flujo se determinó en linfocitos CD3⁺ la expresión de las moléculas CD45RA⁺ y CD45RO⁺, con el objetivo de saber la distribución de las isoformas y el estado de maduración de la población doble positiva de linfocitos.

Los linfocitos T CD3⁺ del paciente mostraron un significativo aumento en el porcentaje de las células que expresan la isoforma CD45RO⁺ respecto a los controles (98,28 \pm 0,66) vs (47,13 \pm 2,73) ($p < 0,001$), y un reducido número de células con fenotipo CD45RA⁺ respecto a los niveles de los donantes sanos (2,27 \pm 0,66) (46,48 \pm 1,86) ($p < 0,001$), como se observa en la **Figura 6.6**.

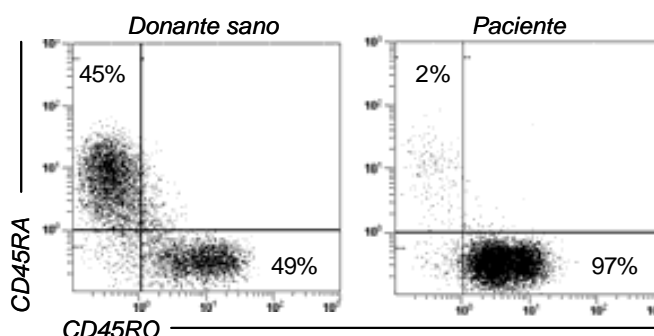


Figura 6.6. **Expresión de CD45RO⁺ y CD45RA⁺ en linfocitos de sangre periférica.** Histograma doble en el que se muestra la distribución de las isoformas CD45RA⁺ en ordenadas y CD45RO⁺ en abscisas en células T CD3⁺ de sangre periférica en un donante sano y en el paciente. El 97% de los linfocitos del paciente muestran fenotipo memoria.

Las células CD45RO+ presentaban dos niveles de expresión, el de mayor expresión comprendía aproximadamente un 46% de las células CD45RO+ y el de menor intensidad que aproximadamente abarca el 53%, como se observa en la **Tabla 6.2**.

		CD45RO+	
		%	MFI
Donante sano	CD4	35,72+/-3,2	33,61+/-0,70
	CD8	13,85+/-2,4	62,08+/-0,67
Paciente	DP	46,61+/-0,8	47,08+/-1,48
	DP(-)	53,38+/-1,4	8,83+/-0,57

Tabla. 6.2. **Media de intensidad de fluorescencia (MFI) de CD45RO en las poblaciones T.** Comparación del porcentaje y la MFI de las células positivas para CD45RO+. DP. Población doble positiva. DP (-) población doble positiva de menor intensidad.

La MFI de CD45RO+ en células de donantes sanos CD3+CD4+ y CD3+CD8+ es diferente si la comparamos con la de las células DP, ya que estas presentaban dos diferentes niveles de expresión. La MFI de las células DP con mayor intensidad de fluorescencia muestra un valor intermedio respecto a la MFI de las células CD3+CD4+ y las CD3+CD8+ de DS.

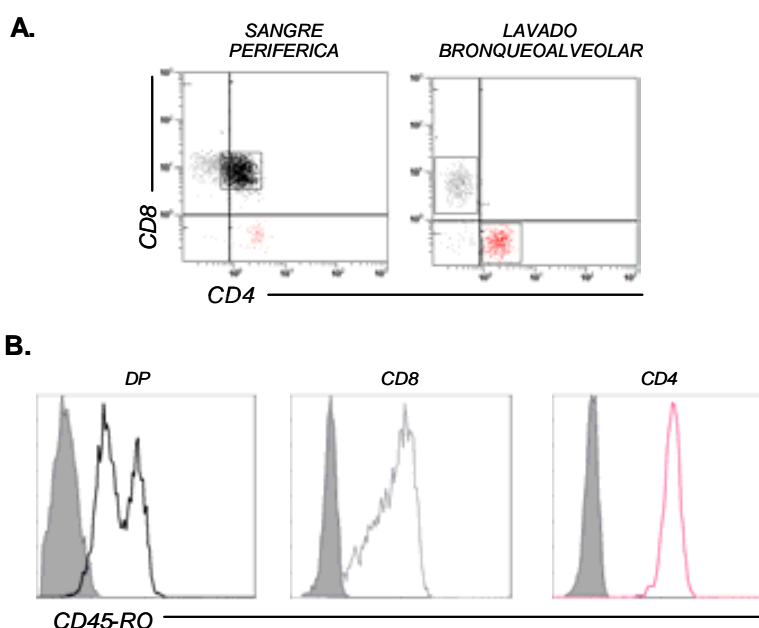


Figura 6.7. **Expresión de CD45RO+ las distintas subpoblaciones de células T del paciente.** **A.** Distribución de CD4 y CD8 en sangre y LBA del paciente. **B.** Expresión de CD45RO+ en células DP de sangre periférica, en linfocitos CD8 de LBA y en linfocitos CD4 de LBA del paciente.

RESULTADOS

El análisis de los niveles de expresión de las isoformas de CD45 en las células de LBA mostró al igual que en sangre periférica, que todas las células CD3+ expresan exclusivamente la isoforma CD45RO. Realizamos un marcaje de cuatro colores para distinguir la diferente expresión de CD45RO en linfocitos de sangre periférica y poder relacionarla con la expresión de CD4, de CD8 o de ambos correceptores. En el LBA, tanto las células CD3+CD4+ como las CD3+CD8+ expresan mayores niveles de CD45RO que en sangre como se observa en la **Figura 6.7**.

6.4. Marcadores generales de linaje celular

Durante el estudio de la población T DP se analizaron marcadores de otras poblaciones linfocitarias, así como moléculas de adhesión presentes en las células T. No se encontraron marcadores específicos de linaje de otras subpoblaciones linfoides como células NK (CD56 y CD57) y células B (CD19) en los linfocitos DP del paciente. El marcador CD27 presente en diferentes linajes celulares, se expresa de igual forma que en los linfocitos de donantes sanos, ver **Figura 6.8**.

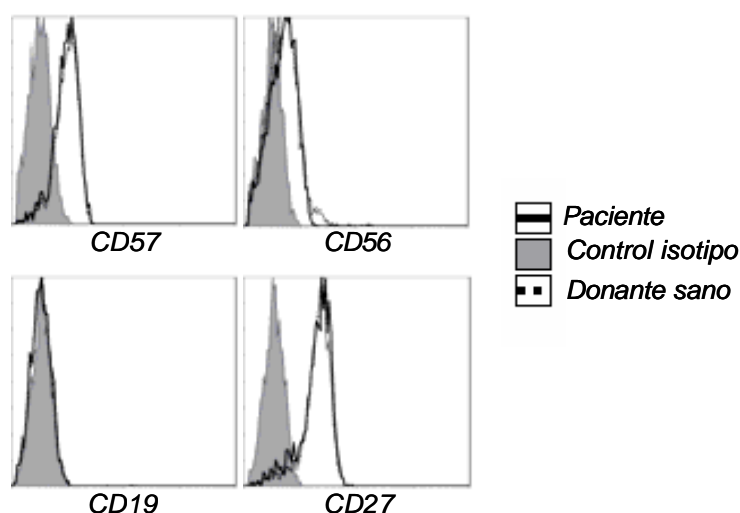


Figura 6.8. **Expresión de CD57, CD56, CD19 y CD27 en los linfocitos CD3 del paciente y en DS.** El análisis de la expresión de marcadores de células B y NK mostró que los linfocitos del paciente en estudio eran negativos para estos.

Analizamos la expresión de TRCa β + y TRC γ d+ en las células del paciente y donantes sanos. El 99% de los linfocitos T CD3+ expresan TRCa β . Se analizaron marcadores característicos de linfocitos T, como CD2 y CD7 (marcador temprano del linaje T) encontrándose niveles de expresión similares a los que expresa una población T de un donante sano, como se muestra en la **Figura 6.9**.

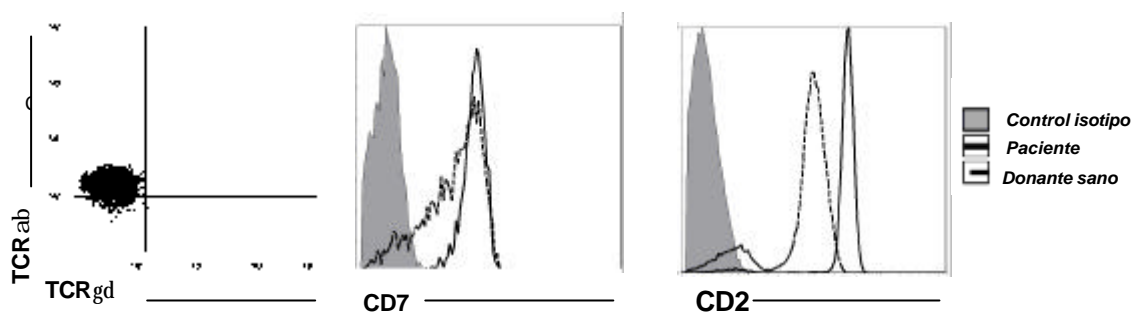


Figura 6.9. **Análisis de la expresión de TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, CD7 y CD2.** En el histograma de la izquierda se muestra que las células CD3 del paciente expresan mayoritariamente TCR $\alpha\beta$. Expresión de CD7 es similar a la de DS y la expresión de CD2 se encuentra incrementada en las células del paciente.

El análisis de la expresión de superficie del marcador CD5 se realizó en las células CD3+, observándose una distribución bimodal. Realizamos marcajes dobles con CD5 y diferentes marcadores, CD7, CD8, CD4, CD95 con la intención de distinguir mediante otro marcador las poblaciones CD5 positivas que mostraban diferente intensidad.

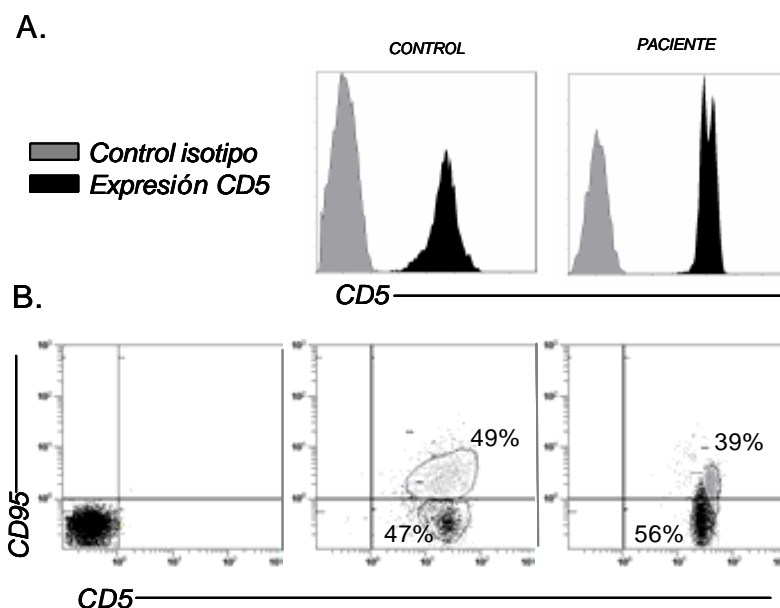


Figura 6.10. **Estudio mediante citometría de flujo de la expresión de CD5.** A. Expresión de la molécula CD5 en linfocitos de sangre periférica del paciente y de un donante sano. B. Doble marcaje con CD5 y CD95 en linfocitos CD3, a la izquierda se muestra el control de isotipo, control sano y paciente.

El doble marcaje de las células CD3 del paciente con CD5 y CD95 indicó que las células que expresan más CD5 también expresan mayores niveles de CD95. En los DS también observamos la

RESULTADOS

existencia de dos poblaciones respecto a la expresión de CD95, no obstante la expresión de CD5 se distribuye homogéneamente, ver **Figura 6.10**.

En el proceso de homing, el receptor CD44 media interacciones entre los linfocitos y la luz endotelial venosa, así como en la extravasación durante la inflamación (Sanders ME et al, 1988) (Drillenburg P 2000). Su expresión en la población de linfocitos DP analizada fue normal al igual que las moléculas de adhesión CD11a, y CD18, como se muestra en la **Figura 6.11**.

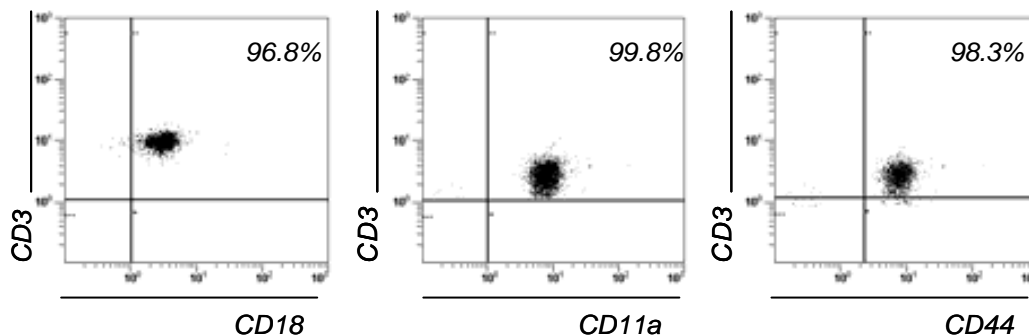


Figura 6.11. **Expresión de moléculas de adhesión linfocitaria CD18, CD11a y CD44 en linfocitos CD3 del paciente.** Mediante citometría de flujo se constató que las células T del paciente expresan

6.5. Análisis de la expresión de moléculas de activación (CD69, CD25 y HLA-DR) y de moléculas de adhesión

La activación celular promueve la expresión de diferentes moléculas en la superficie celular. Para definir el estado de activación de los linfocitos T en reposo de este paciente analizamos los siguientes marcadores de activación, CD69, que se expresa de manera precoz, el antígeno leucocitario humano HLA-DR que se expresa de forma más tardía y la molécula CD25 (receptor de alta afinidad para IL-2), de expresión intermedia (Miyano et al. 2001).

Para conocer la dinámica de expresión de estas moléculas tras la activación, se realizaron cultivos de células mononucleares de sangre periférica del paciente y de DS. No se encontraron diferencias en la expresión de CD69 entre las células T en condiciones basales del paciente y de controles sanos. Tras la activación *in vitro* durante cuatro horas con PMA e ionomicina analizamos la expresión del marcador, el cual se expresaba en la mitad de los linfocitos T, al igual que en los DS. Las células mononucleares de sangre periférica del paciente y DS no expresaban CD25 (cadena α del receptor de la IL-2), ni HLA-DR, como se observa en la **Figura 6.12**. Para determinar que la dinámica de expresión de estos marcadores era normal en los linfocitos DP, activamos *in vitro* las células con PHA en presencia de IL-2 exógena y analizamos la expresión de CD25 y HLA-DR por citometría de flujo, observando una expresión correspondiente al estado de activación.

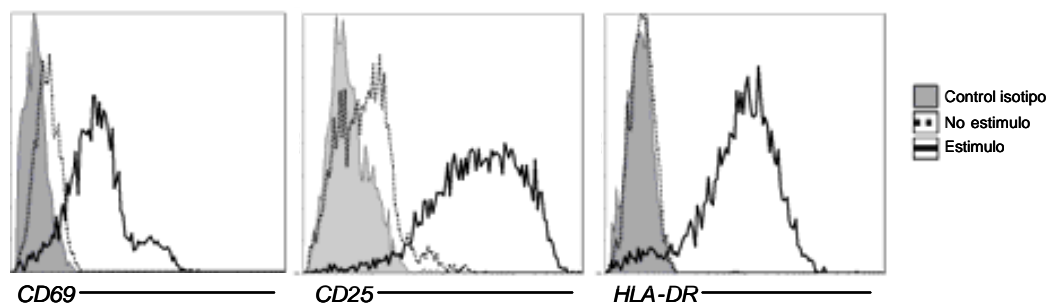


Figura 6.12. **Análisis de la expresión de moléculas de activación.** Expresión de CD69 en linfocitos del paciente antes y después de ser estimulados con PMA e ionomicina. Expresión de CD25 y HLA-DR en linfocitos del paciente previo y tras estimulación con PHA e IL2.

El receptor de la transferrina CD71 es esencial para el transporte de hierro en células que se dividen activamente. La densidad de este receptor está inversamente relacionada con la disponibilidad de hierro, y se ha visto aumentada su expresión en células en proliferación. CD71 se expresa en células replicantes de todos los linajes hematopoyéticos y en algunos no hematopoyéticos pero no en linfocitos en reposo, monocitos, granulocitos, y hematíes (Sutherland et al. 1981).

Analizamos la expresión de esta glicoproteína de superficie antes y tras una estimulación con PHA e IL-2, cuando el paciente tenía una población del 82% de células DP. El 10% de los linfocitos expresaban CD71 en los linfocitos del paciente sin estimular. Tras cinco días de estimulación, el 94% de las células CD3 expresan altos niveles de CD71. El 72% de los linfocitos CD3 son positivos tanto para CD71 como para HLA-DR tras la estimulación con PHA e IL-2, como se observa en la **Figura 6.13**. La mayoría de las células DP no expresan inicialmente CD71, pero son capaces de expresarlo normalmente cuando las células comienzan a dividirse.

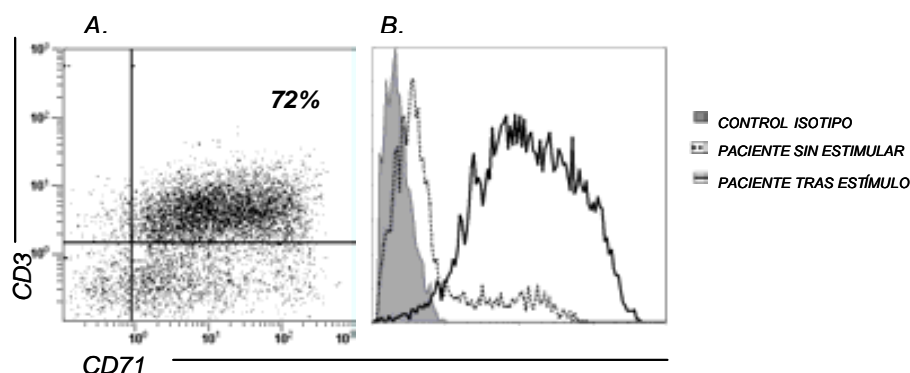


Figura 6.13. **Expresión de CD71 (receptor de la transferrina) en linfocitos CD3.** A. Las células del paciente previo estimulación (línea punteada), tras cinco días de estimulación (línea continua). Control isotipo en gris. B. Doble marcaje de los linfocitos CD3 tras estimulación, el 66% son positivos para ambos.

RESULTADOS

6.6. Análisis de moléculas coestimuladoras (CD28, CD80)

La proliferación y diferenciación de las células T requiere señales de moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de antígeno, además de las señales inducidas por el antígeno. La mayoría de las células CD4 expresan CD28 en su superficie en niveles bajos, mientras que solo la mitad de las CD8+ lo hacen (Chen 2004). Analizamos la expresión de las moléculas coestimuladoras y su papel en la homeostasis inmunológica.

Tras estudiar mediante citometría de flujo la expresión de CD28 en los linfocitos T en reposo del paciente y de donantes sanos no encontramos diferencias en su expresión. Tras estimular las células en cultivo con PHA e IL2 durante cinco días, realizamos un marcaje con anti-CD28 y anti-HLA-DR, seleccionando los linfocitos T CD3+. El 98% de los linfocitos T del paciente expresan CD28 y HLA-DR tras la activación, frente al 60% de expresión en DS, como se muestra en la **Figura 6.14**.

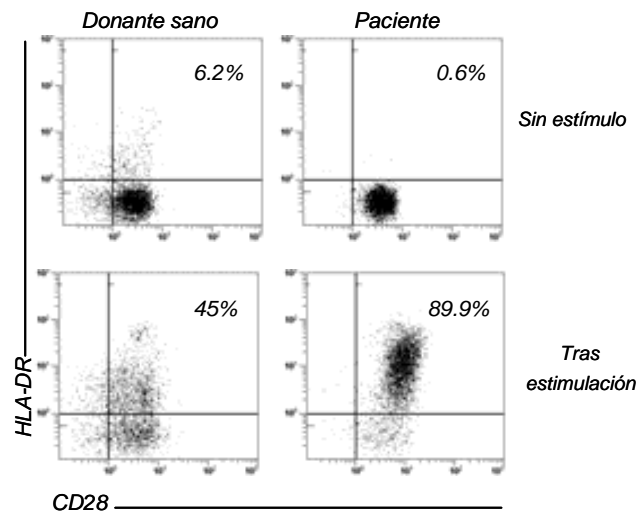
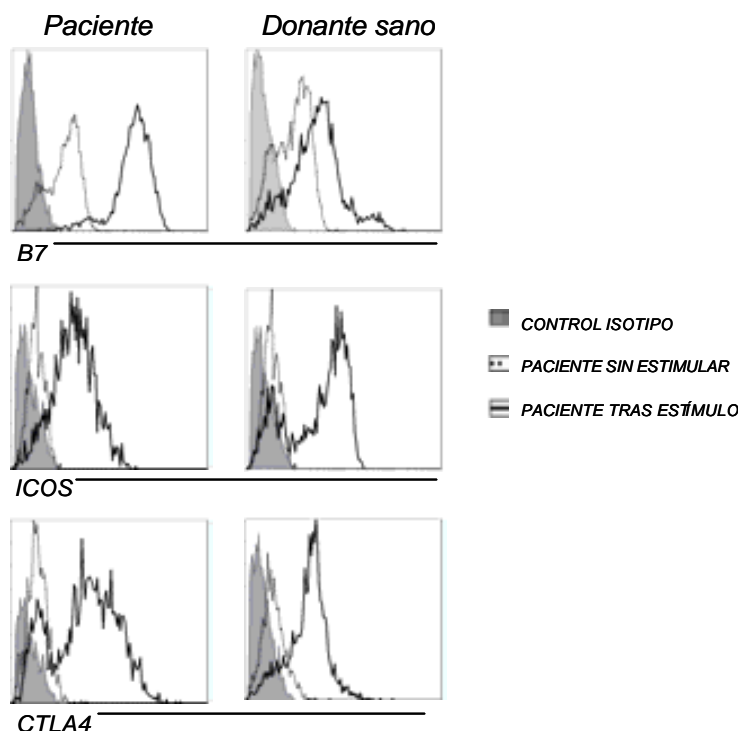


Figura 6.14. **Expresión de HLA-DR y CD28 en células CD3 del paciente y DS.** Histograma doble antes de estimular y tras una estimulación con PHA e IL2. Previamente fueron seleccionadas por tamaño, morfología y expresión de CD3. Tanto en el paciente como en el control aumenta la expresión de ambos marcadores tras la activación.

Se analizaron mediante citometría de flujo los ligandos de CD28 en las células en reposo y tras estimulación. Pevio a la estimulación las células no expresan CD80 (B7.1) al igual que los DS. Tras dos días en activación con PHA e IL2 aumenta la expresión de CD80 en los linfocitos del paciente y no en los de DS, que lo expresan tardíamente en el día ocho tras la activación. También se estudiaron la expresión de los receptores ICOS y CTLA-4, el inhibidor fisiológico de la activación de la célula T. No encontrándose expresados en las células en reposo, pero sí tras estimular las células durante 10 días de cultivo, como se observa en la **Figura 6.15**.

Figura 6.15. **Expresión de moléculas coestimuladoras B7.1, ICOS Y CTLA4 en células T del paciente y de DS.** Células mononucleares de sangre periférica fueron separadas y se mantuvieron en cultivo con PHA e IL2 durante dos semanas. Se analizó la expresión de B7.1, ICOS y CTLA4 mediante citometría de flujo cada dos días. El 89% de las células T del paciente expresan B7.1 tras dos días en cultivo con PHA e IL2, mientras que las células de DS lo hacen a los siete días en cultivo. La expresión de ICOS es similar en células del paciente y de DS. La expresión de CTLA-4 tras estimulación aumenta en el 36% de las células, siendo similar a la expresión de los controles.



6.7. Análisis de la expresión de CD103 en los linfocitos del paciente

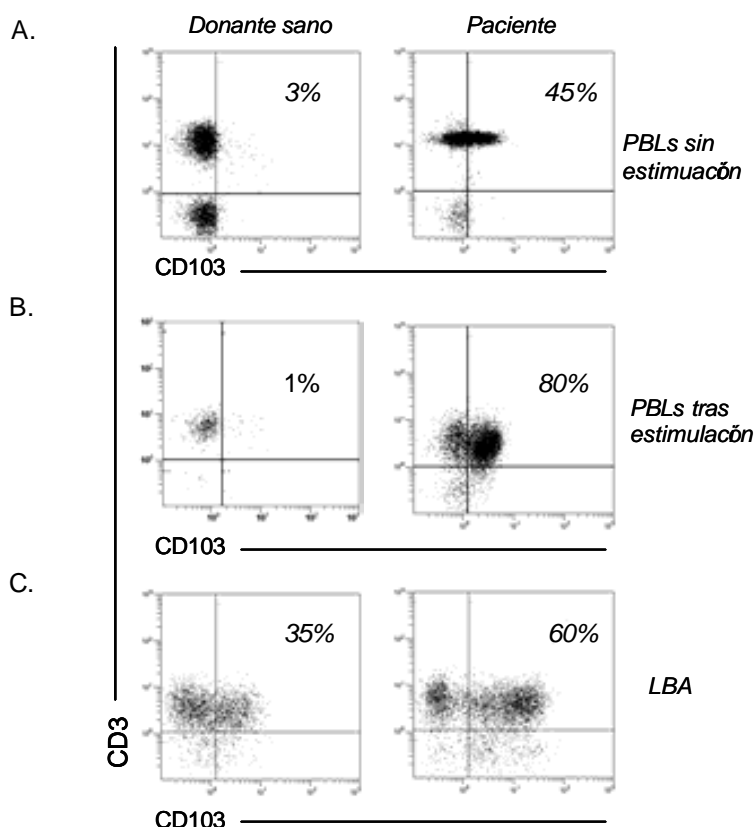
Las integrinas son heterodímeros transmembrana que unen componentes de la matriz extracelular y a ligandos celulares. Las cuales median la adhesión celular, migración y señalización, siendo importantes para la localización de los linfocitos T. Las integrinas son además moléculas accesorias durante la estimulación de las células T. La integrina CD103 (T-cell integrin, alpha(E)beta(7)) fue la primera en ser identificada a través de su expresión selectiva en más del 90% de las células T CD8+ y aproximadamente en un 40-50% de los linfocitos T CD4+ en mucosa intestinal (Hadley et al. 1999).

El porcentaje de linfocitos que expresan antígeno linfocitario de la mucosa CD103 fue analizado en sangre periférica del paciente y de DS. La expresión también se analizó en LBA del paciente en estudio y de pacientes con otros tipos de patologías respiratorias, a los cuales se les había realizado broncoscopia con diagnóstico de neumonía intersticial.

El 45% de los linfocitos T de sangre periférica expresaban CD103 siendo esta cifra significativamente superior a lo que expresan los linfocitos de donantes sanos. El 80% de los linfocitos de LBA del paciente expresaban CD103. La expresión en células de LBA en neumonías intersticiales no superaba el 1%. Los linfocitos de sangre periférica del paciente mostraron un menor porcentaje de células que expresaran CD103 que los linfocitos de LBA. Al analizar esta expresión en la población DP, no se encontró diferente distribución de CD103 respecto a la observada en el total de células T CD3+.

RESULTADOS

Figura 6.16. **Expresión de CD103 en linfocitos de un DS y del paciente.** **A.** En sangre periférica a día cero, sin estímulo, donde se observa que el 45% de los linfocitos del paciente expresan CD103 en superficie, lo que contrasta con la expresión en DS que no supera el 3% de los linfocitos. **B.** Expresión de CD103 tras 4 días de estimulación con PHA e IL2, observándose un aumento de la expresión de CD103 hasta el 80%. **C.** Expresión de CD103 en células de LBA, en un paciente con neumonía intersticial (izquierda) y en el paciente con linfoproliferación DP (derecha); el porcentaje de expresión de CD103 en los linfocitos del paciente con linfoproliferación DP.



Tras la estimulación de PBMCs *in vitro* con PHA e IL-2 durante cinco días, se observó un incremento en la expresión de CD103, que pasaba de un 45% a un 60%, mientras que las células de donantes sanos pasaban de un 3% a un 35%, como se observa en la **Figura 6.16**. El porcentaje de células que expresan la integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103) se encuentra aumentado en la población estudiada de sangre periférica y LBA procedente de paciente.

6.8. Estudio de la expresión de receptores de quimiocinas en la población de linfocitos T DP

El perfil de expresión de los receptores de quimiocinas puede definir subpoblaciones funcionales de linfocitos y proporcionar claves sobre la localización de estos en el tejido y sus interacciones (Gutierrez-Ramos et al. 2000). En un intento de relacionar la patología pulmonar con la existencia de la población DP presente en sangre periférica y en LBA durante las situaciones de crisis, estudiamos la expresión de receptores de quimiocinas en los linfocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo.

Se realizó un estudio preliminar en el que se analizó el porcentaje de expresión de diferentes receptores de quimiocinas en células CD4 del paciente y lo comparamos con las características de

expresión de la población control CD4 de donantes sanos. Dado que la población DP del paciente en el momento del análisis era del 98% de los linfocitos T, realizamos el estudio sobre células positivas para CD4. En la **Figura 6.17**, se representa el porcentaje de células CD4 que expresaron cada uno de los receptores de quimiocinas, tanto en el paciente como en DS.

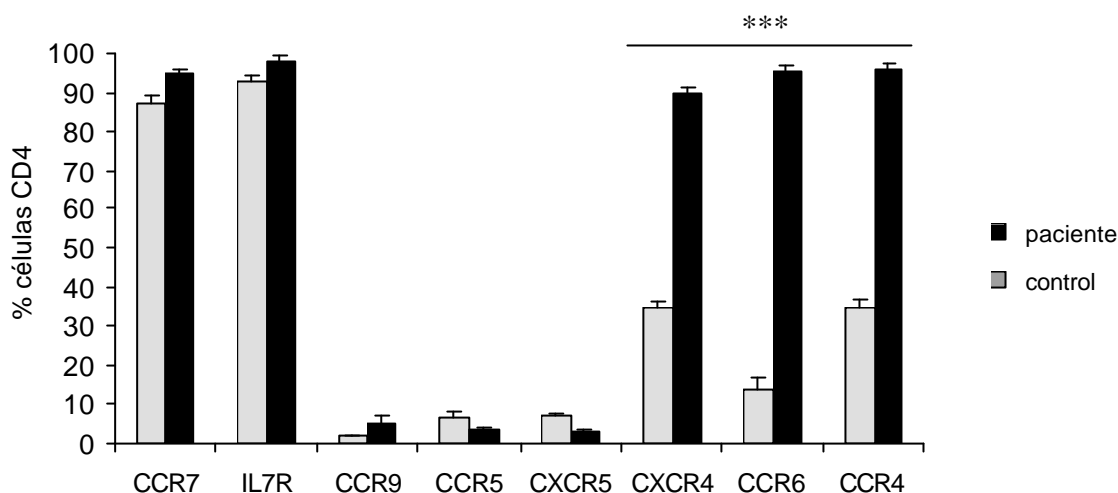


Figura 6.17. **Expresión de receptores de quimiocinas en células T CD4.** Gráfico de barras en el que se representa el porcentaje de células T CD4+ que expresan cada uno de los receptores quimiocinas y citoquinas indicados en el eje de abscisas. En el momento del análisis las células DP del paciente eran el 98% de las los linfocitos T, ***($p < 0,01$).

Los niveles de expresión de CCR7 y del receptor de la interleuquina-7 (IL-7-R) fueron similares en las células del paciente y en DS, mostrando ambas una expresión por encima del 80%. La expresión de CCR9, CCR5 y CXCR5 en las células CD3+CD4+CD8- del paciente fue negativa, al igual que en células de donantes sanos. En cambio, encontramos diferencias de expresión entre las células T CD4+ de DS y del paciente en tres de los receptores de quimiocinas analizados. El 85% de células CD4+ del paciente expresaban CXCR4, mientras que en el DS lo expresan el 40% de las células. Datos similares se observaron en la expresión de CCR4. No obstante, el dato más llamativo fue que el 97% de las células T CD4+ del paciente expresaban CCR6 frente al 14% de expresión en células T CD4+ de DS; en el análisis del porcentaje de expresión de estos tres receptores encontramos diferencias muy significativas ($p < 0,01$) entre el paciente y los DS.

Para constatar los resultados anteriores se analizó de nuevo la expresión de receptores de quimiocinas en las subpoblaciones de células DP, células CD3+CD4+ y CD3+ CD8+ del paciente y de DS. Se utilizaron diferentes combinaciones de anticuerpos que nos permitieron estudiar la expresión de los receptores de quimiocinas en la población de células DP del paciente. Las células que previamente fueron seleccionadas por la expresión de CD3, se analizaron en un histograma doble para CD4 y CD8. Ver **Figura 6.18**.

RESULTADOS

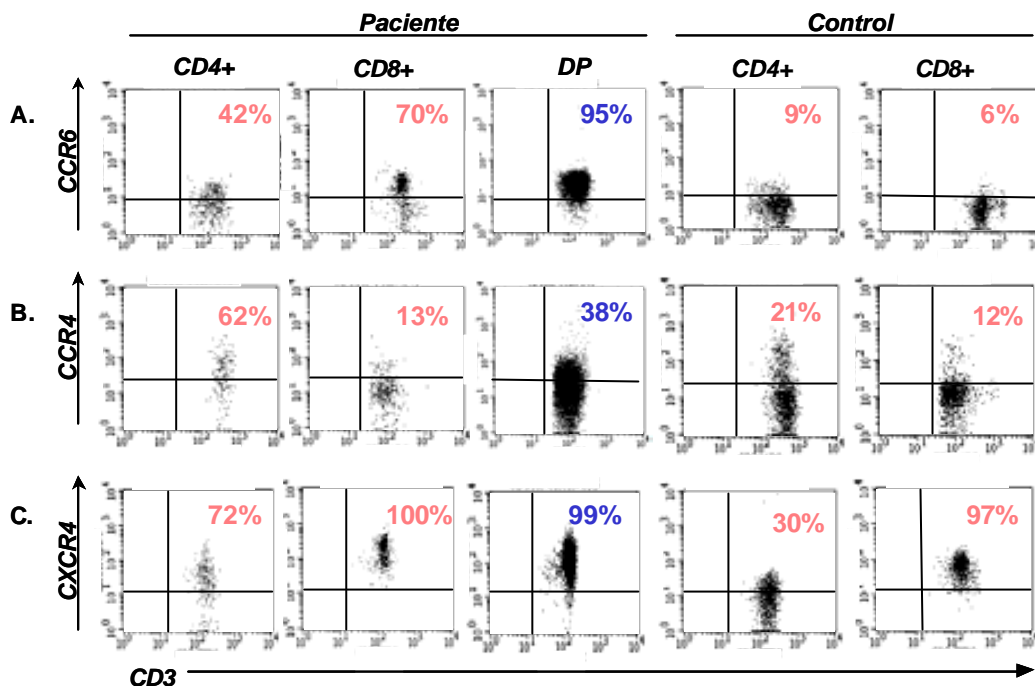


Figura 6.18. **Análisis por citometría de marcadores de superficie CCR6, CCR4 y CXCR4 en diferentes poblaciones de células T del paciente y de un DS.** A. La expresión de CCR6 en todas las subpoblaciones de células del paciente esta aumentada significativamente frente al control, sobre todo la DP. B. La expresión de CCR4 en las células DP está aumentada respecto al control. C. La expresión de CXCR4 en los linfocitos DP es del 99%, estos niveles de expresión son similares a los de las células CD8, tanto del paciente como del control.

La expresión de IL7-R, CCR3, CCR5, CCR9, CXCR5 y CXCR3 en las células DP no se encontró alterada respecto a una población de células CD3+CD4+ de DS.

La expresión de CCR6 en las células DP del paciente fue del 95%, las células CD3+CD8+ del paciente lo expresan en un 70%, mientras que en las poblaciones de DS no superó el 9%. Respecto a la expresión de CCR4, lo expresaron el 38% de las células DP y el 62% de las células CD3+CD4+ del paciente. La expresión de CCR4 en las células CD3+CD4+CD8- de donantes sanos era del 21%.

El 99% de las células CD3+CD4+CD8 y el 100% de las CD3+CD8+ del paciente expresaron CXCR4. Resultados similares se encontraron en la expresión en CD3+CD8+ de donantes sanos, con una expresión del 97%. La expresión en CD3+CD4+ en donantes sanos era de un 30%, mientras que en la misma población del paciente se observó un 72% de expresión.

6.9. Estudios funcionales

6.9.1. Proliferación celular

Tras la fase de activación en los linfocitos T se dan importantes cambios, uno de ellos es la proliferación que lleva a una expansión y a la amplificación de la respuesta. Analizamos la capacidad proliferativa de las células del paciente en presencia de estímulos mitógenos policlonales como concanavalina-A (ConA), fitohemaglutinina (PHA), mitógeno Pokeweed (PWM), anti-CD3 y los superantígenos enterotoxina del *Staphylococcus* A (SEA) y B (SEB). Tras 48 horas en cultivo, medimos la proliferación como la incorporación de timidina tritiada [^3H], los datos se muestran en la **Figura 6.19**.

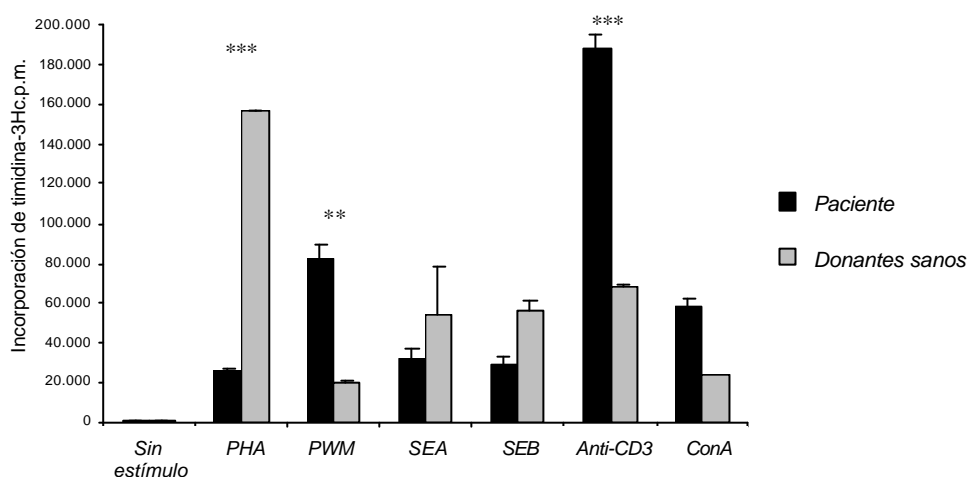


Figura 6.19. **Gráfico que muestra el ensayo de proliferación en presencia de diferentes estímulos mitogénicos tras 48 horas de cultivo de PBMC.** Se indican los valores de proliferación (c.p.m.) expresados como la media de incorporación de timidina de células mononucleares del paciente y de controles sanos de tres ensayos independientes. Se encuentran diferencias significativas en la proliferación frente a PHA, PWM y anti-CD3 entre el paciente y donantes sanos. ** ($p < 0,05$); *** ($p < 0,01$).

La respuesta proliferativa de las células del paciente en presencia de PHA fue significativamente menor a la que mostraban las células de DS. No obstante, la proliferación mostrada en tres ensayos independientes en presencia PWM fue siempre superior por parte de las células del paciente. Independientemente del porcentaje de células DP en el momento de cada ensayo, la proliferación en respuesta a anti-CD3 siempre estuvo aumentada respecto a la de los controles.

Los corticoides son drogas inmunosupresoras, pudiendo ser responsables de la disminución de la proliferación frente a PHA, por esta razón paralelamente a los ensayos realizados con DS se incluyeron en el ensayo pacientes tratados con PDN, no existiendo diferencias entre la proliferación de estos y la de DS. Pensamos que la falta de proliferación tras el estímulo PHA podría deberse a

RESULTADOS

una temprana proliferación que no permitiera una correcta incorporación de timidina en un cultivo de 48h. Para descartar esta posibilidad se realizaron cultivos a 24, 48 y 72h, con cuatro diferentes dosis de PHA (1:4, 1:8, 1:32, 1:64) y de forma paralela se realizó el ensayo de proliferación en presencia de tres diferentes dosis de anti-CD3 (1:10, 1:20 y 1:40) (**Figura 6.20.**).

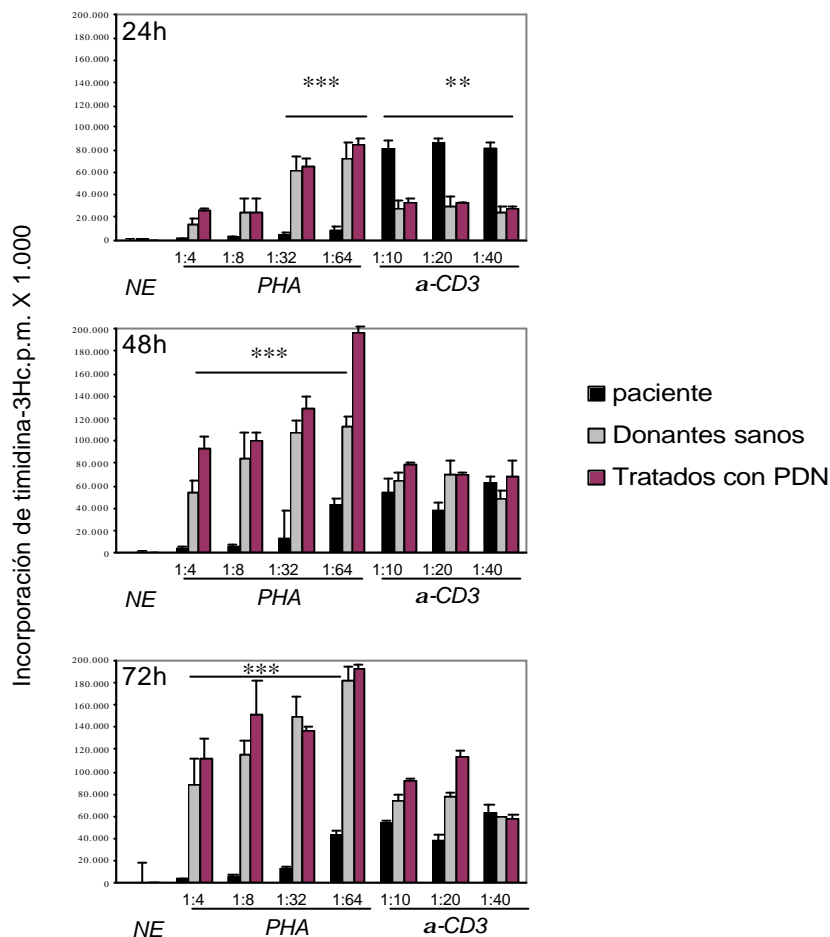


Figura 6.20. **Proliferación celular frente a PHA y anti-CD3.** Respuesta proliferativa frente a diferentes dosis de PHA (1:4, 1:8, 1:32, 1:64) y de anti-CD3 (1:10, 1:20 y 1:40) en cultivos de 24, 48 y 72h de PBMC de sangre periférica del paciente, de DS y de pacientes tratados con PDN. Expresados en cuentas por minuto (c.p.m.) $\times 10^3$, NE. No estimulado. ** ($p < 0,05$); *** ($p < 0,01$).

En cultivo a 24h se verificó la disminución significativa de proliferación de las células del paciente a cuatro diferentes concentraciones de PHA comparado con las células de donantes sanos. El resultado obtenido de la proliferación con anti-CD3 mostró que las células del paciente proliferaban más del doble que los DS en un cultivo de 24 h, observándose este fenómeno con todas las concentraciones de anti-CD3. El resultado del cultivo a 48h y a 72h con diferentes dosis de PHA mostró la misma dinámica que el anterior, a ninguna concentración las células del paciente superaron las 40.000 c.p.m. La respuesta de las células del paciente a anti-CD3 en los cultivos a 48h y 72h fue similar al de los controles.

La mayoría de los receptores de la superficie celular implicados en el reconocimiento del antígeno por las células T y en los subsecuentes eventos de señalización son glicoproteínas. La PHA estimula la mitosis en diferentes estirpes celulares por su unión a N-acetil-D-glucosamina (Saveriano et al. 1981). El hecho de que las células del paciente tuvieran una proliferación disminuida frente al mitógeno PHA nos hizo pensar que cabía la posibilidad de que un defecto en la glicosilación estuviera impidiendo una correcta unión del mitógeno y la posterior proliferación celular.

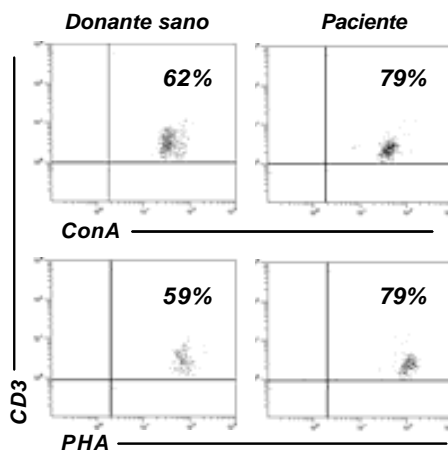
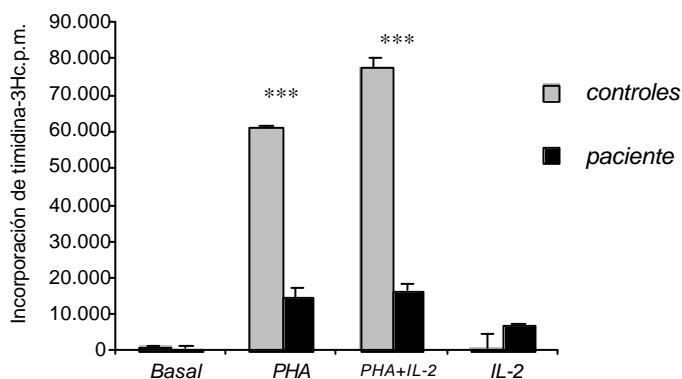


Figura 6.21. **Análisis de la unión de células del paciente y DS a ConA y PHA.** Todas las células CD3 tanto del control como del paciente se unen a ConA y PHA.

Para descartar un posible defecto que impidiera la correcta unión entre PHA y N-acetil glicosamina, utilizamos PHA marcada con el fluorocromo alexa-488 y mediante citometría de flujo analizamos la unión de las células del paciente a PHA y a ConA. Debido a que la proliferación frente a ConA de las células del paciente fue similar a la mostrada por células de DS, utilizamos ConA marcada con alexa-488 como control positivo de unión. Las células T del paciente se unen con la misma intensidad a PHA y a ConA que las de un DS, como se muestra en la **Figura 6.21**.

Pensando en la posibilidad de que la proliferación frente a PHA fuera dependiente de IL-2 en las células de este paciente, se realizó un ensayo de proliferación en presencia de IL-2 exógena y PHA y solo con PHA, no observándose cambio alguno en ambas condiciones, **Figura 6.22**.

Figura 6.22. **Gráfico del ensayo de proliferación con PHA y con PHA+IL2** en células mononucleares de sangre periférica del paciente y de DS. ** ($p < 0,05$); *** ($p < 0,01$).



RESULTADOS

6.9.2. Expresión de CD40 ligando tras inducción con PMA e ionóforo

La molécula CD40L (CD154) es una molécula de la familia del TNF que se encuentra expresada principalmente en linfocitos CD4+ activados y en muy baja proporción en linfocitos CD8+, mastocitos, basófilos y plaquetas (Roy et al. 1993).

Para determinar si las células DP eran capaces de expresar CD40L, PBMC de DS y del paciente fueron estimuladas durante 6 h en ausencia o presencia de forbol miristato acetato (PMA) e ionomicina a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se tiñeron con anticuerpos monoclonales utilizando un panel de 3 colores (CD3-FITC/CD40L-PE/CD8-ECD). Como control positivo de la estimulación se utilizó la expresión del marcador temprano de activación CD69. Generalmente tanto el PMA como la ionomicina inducen una prolongada “downregulación” del receptor CD4, por esta razón seleccionamos las células T no CD8 (CD3+CD8-) para analizar de la expresión de CD154.

Tras la estimulación analizamos la expresión de CD40L en células de un DS, para ello seleccionamos las células T negativas para el marcador CD8, observando que toda la población seleccionada expresaba CD40L. Por el contrario, la población positiva para CD8 no expresaba CD40L. En el paciente obtuvimos un resultado diferente al de los DS, ya que las células positivas para CD8 expresaron CD40L, como se observa en la **Figura 6.23**. La expresión de CD4 disminuye tras la estimulación, no obstante y debido a que los linfocitos del paciente son mayoritariamente DP, dicha población sigue siendo positiva para CD8. Por lo que las células CD8 positivas para CD40L muestran características funcionales de células T CD4.

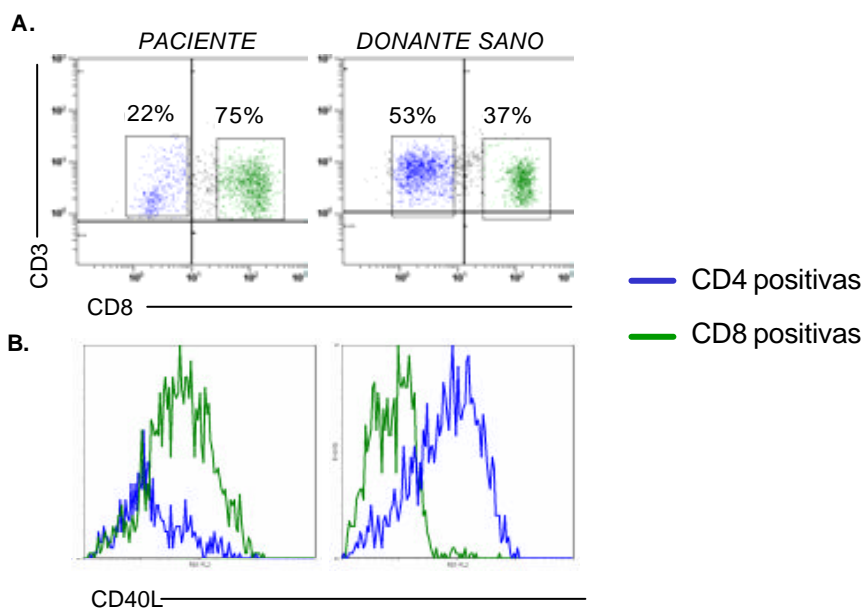


Figura 6.23. Análisis de la expresión de CD40L mediante citometría de flujo tras la estimulación con PMA e ionóforo. A. Histograma donde se seleccionan en el recuadro en verde las células CD8+ y en el azul las células CD4+ de un DS y del paciente. B. Histograma donde se representa la expresión de CD40L tanto en la población CD8+ (verde), como en la CD4+ (azul) en el paciente y en un DS.

6.9.3. Expresión de perforina

El hecho de que la población celular aquí analizada coexpresara CD4 y CD8 hizo que tras estudiar su capacidad funcional como célula T helper, quisiéramos analizar su también su capacidad citotóxica. Un linfocito T citotóxico (CTL) maduro contiene gránulos preformados en su citoplasma, portadores de perforina y granzimas. El proceso de degranulación de los CTL depende de una estimulación adicional a partir de su receptor de antígeno. La proteína perforina es uno de los componentes de estos gránulos, y es crucial en la inducción de apoptosis por este sistema (Voskoboinik et al. 2006).

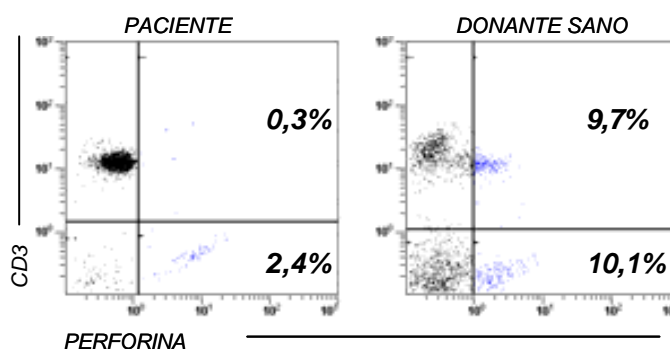


Figura 6.24. **Expresión de perforina en linfocitos del paciente y de un DS.** El 9,7% de las células CD3 son positivas expresan perforina y corresponden al porcentaje de células CD8 en un DS. Los linfocitos T del paciente son negativos para la expresión de perforina, mientras que sus células NK expresan este marcador con normalidad.

Analizamos por citometría la expresión de perforina y CD3 en los linfocitos de este paciente y en DS. En DS la perforina se expresa en células CD8 y en células NK. Las células T positivas para perforina corresponden a las células CD8, mientras que las células positivas para perforina y negativas para CD3 corresponde a las células NK. Observamos en la **Figura 6.24.** que ningún linfocito T del paciente se tiñen con perforina.

6.9.4. Análisis de la inducción de apoptosis vía FAS

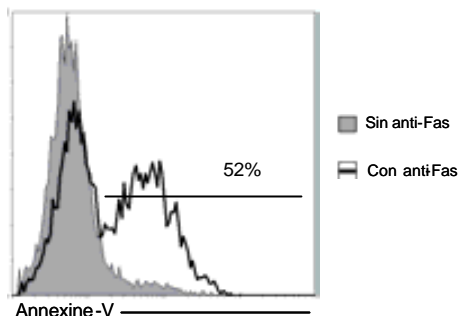
En el sistema inmunológico, la apoptosis es un rasgo esencial para la educación de los linfocitos en órganos linfoides primarios a través de la selección negativa y positiva de las células potencialmente auto-reactivas, y para la función efectora de las células citotóxicas que usarán distintos métodos para desencadenar la apoptosis en células diana.

Evaluamos la capacidad apoptótica de las células DP tras ser estimuladas durante una semana, para generar blastos y posteriormente inducir la apoptosis con el anticuerpo anti-Fas (CH11). Pasadas 20 horas teñimos con anexina-V y analizamos su expresión por citometría de flujo. El resultado mostró que esta población sigue la misma dinámica de muerte que las células de un donante sano. En estas células no se detectó ninguna resistencia a la apoptosis, encontrándose que

RESULTADOS

aproximadamente el 52% de las células se teñían con anexina-V, como se muestra en la **Figura 6.25**. De este modo descartamos una acumulación por fallo la vía FAS de muerte celular programada.

Figura 6.25. **Análisis de la inducción de apoptosis vía Fas.** Expresión de anexina-V en linfocitos del paciente tras inducir la muerte celular con el anticuerpo anti-FAS. El porcentaje de apoptosis de las células del paciente es del 52%, valor similar al encontrado en donantes sanos.



6.10. Efecto de la prednisona en la viabilidad de células activadas con PHA

Las hormonas glucocorticoides (HGC) se incluyen dentro de las drogas inmunosupresoras más potentes. Además las HGC inducen apoptosis tanto en líneas T linfoblásticas derivadas de linfocitos humanos como en linfocitos humanos maduros (Scudeletti et al. 1999).

Estudiamos la sensibilidad de los linfocitos T a sufrir apoptosis en respuesta al corticoide de tratamiento en el paciente (prednisona) para lo cual realizamos cultivos a diferentes dosis de PDN con el objetivo de saber si existía alguna diferencia de sensibilidad a la apoptosis entre las células del paciente y las de DS. La PDN incrementa significativamente la apoptosis en células de sangre periférica separadas y activadas *in vitro* con PHA de la misma forma en el paciente y en los controles, como se observa en la **Figura 6.26**. Existe un incremento de apoptosis en células del paciente respecto a los controles a concentraciones intermedias de 8 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pero la diferencia no es significativa.

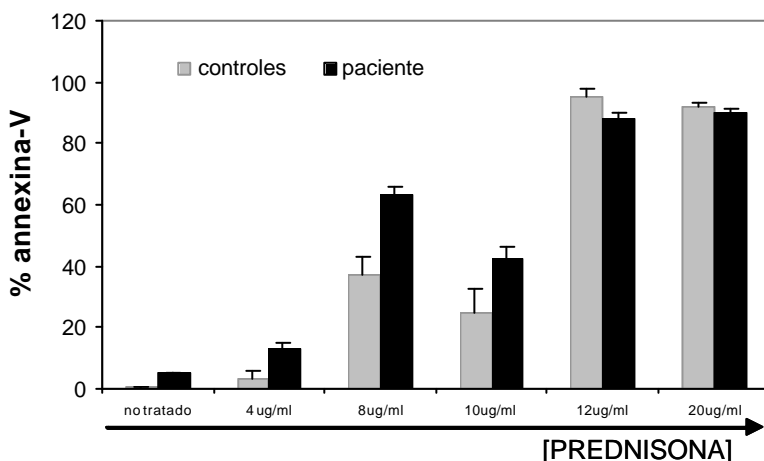


Figura 6.26. **Análisis de la apoptosis inducida por el tratamiento de Prednisona en linfocitos activados.** PBMCs del paciente y de DS fueron estimuladas durante una semana con PHA e IL-2, posteriormente fueron tratadas *in vitro* con dosis crecientes durante 20 horas. El porcentaje de apoptosis se cuantificó como el porcentaje de células positivas para anexina-V. El ensayo se realizó por triplicado, no encontrándose diferencias significativas entre el paciente y los DS.

6.11. Estudio del sistema inmune humoral. Otros parámetros inmunológicos

Los niveles de inmunoglobulinas en suero se determinaron por nefelometría en todas las analíticas, en todas ellas los valores estaban dentro de los rangos normales (**Tabla 6.3**). En cambio, los niveles de IgE estaban muy elevados al comienzo de las manifestaciones clínicas con valores superiores a 2000 UI/ml, que disminuyeron hasta valores dentro de la normalidad (52 UI/ml) en la actualidad. El factor reumatoide y las proteínas del complemento, C3 y C4, así como la actividad de este mostraron valores normales.

Tabla 6.3. Parámetros inmunológicos, * se expresa (media +/- devst) de todas analíticas.

Prueba	Paciente*	Rango normal
IgG	786+/-113	mg/dl (723-1685)
IgA	137+/-50	mg/dl (69-382)
IgM	157+/-28	mg/dl (40-230)
IgE (1ª analítica)	>2000	U/ml (3-160)
IgE (última analítica)	52	U/ml (3-160)
CH50	40+/-6	(25-65)
C3	146+/-37	mg/dl (85-193)
C4	32+/-5	mg/dl (12-36)
FR	<20	
ANAs	neg	
Anti-Musculo liso	neg	
Anti-Mucosa gástrica	neg	
Anti-Mitocondrias	neg	
Anti-Sintetasa	neg	
Anti-MBG	neg	
ANCA	neg	

Las vasculitis sistémicas constituyen un grupo de enfermedades autoinmunes caracterizadas por la inflamación y necrosis de los vasos sanguíneos con muy diversas formas de expresión (Manganelli et al. 2006). En muchas de ellas se ven afectadas vías respiratorias altas junto con síntomas propiamente pulmonares por lo que se analizaron la presencia de anticuerpos antinucleares, anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo, y anticuerpos anti-membrana basal glomerular en el suero del paciente siendo todos ellos negativos. Dado que el paciente ha mostrado durante años lesiones en las manos (manos de mecánico) características del síndrome anti-sintetasa, se descartó la presencia de anticuerpos anti-sintetasa por ELISA y por inmunoprecipitación de RNAs, siendo por ambas técnicas negativo.

6.12. Análisis de los niveles de círculos de reordenamiento del TCR

Existen evidencias que indican que la timopoyesis continúa a lo largo de la vida, a pesar del progresivo reemplazo que sufren los diferentes espacios anatómicos tímicos por grasa en la vida

RESULTADOS

adulto. Aunque la timopoyesis provee continuamente a la periferia de linfocitos T con fenotipo virgen o “naive” al sistema inmunitario, la frecuencia de estos linfocitos T se reduce a medida que se incrementa la edad (McFarland et al. 2000). Las células que emigran del timo pueden ser identificadas por la presencia de pequeños fragmentos de DNA que se generan durante el reordenamiento de la cadena α del TCR del linfocito T y que se denominan TRECs (signal join T cell receptor excision circles, por sus siglas en inglés). Estos círculos están presentes en forma de ADN episomal, y se forman al excindirse y circularizarse el gen δ del TCR, que originalmente está insertado en el gen que codifica para la cadena α del TCR. Los TRECs no se replican durante la mitosis, por lo que se diluyen progresivamente tras la división celular.

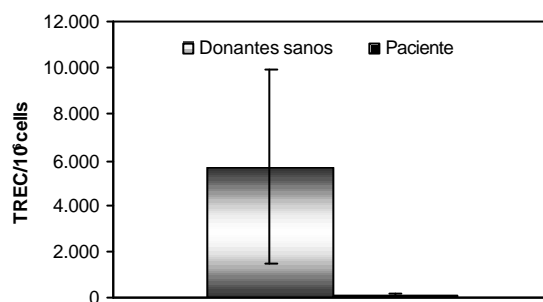


Figura 6.27. Niveles de TRECS en donantes sanos y en las células del paciente.

Analizamos la presencia de TRECs en la población T del paciente y lo comparamos con los niveles de TRECs presentes en DS del mismo rango de edad. Aunque los niveles de TRECs son bastante variables entre individuos sanos como indica la desviación estándar en la **Figura 6.27.**, los bajos niveles de TRECs que mostraron los linfocitos del paciente en repetidas ocasiones sugerían una expansión a nivel periférico, más que una salida masiva de células tímicas a periferia. No obstante, a parte de la producción tímica otro tipo de factores determinan el contenido de TRECs en las poblaciones linfocitarias T como es la división y la muerte celular.

6.13. Estudio del repertorio $V\beta$ y γ del TCR

Durante el proceso de maduración linfoide, los genes del TCR llevan a cabo un proceso fisiológico de recombinación y mutación que dará lugar a secuencias de ADN específicas para cada célula. Este proceso no solo tiene lugar en todas las células T maduras, sino que también ocurre en proliferaciones malignas. Durante el proceso se dan dos pasos consecutivos, el reordenamiento D-J y el posterior reordenamiento de la región V con D-J produciéndose una multitud de combinaciones para el reordenamiento V-(D)-J (base de la diversidad inmunológica). La consecuencia de este proceso es que cada célula T mostrará una única combinación de TCR en su superficie. Según lo cual, una población linfoide policlonal estará caracterizada por una heterogeneidad en cuanto a sus

secuencias V-(D)-J en estos loci y una población monoclonal estaría caracterizada por una homogeneidad en las mismas. Por lo que, el análisis molecular de la diversidad de las cadenas β y γ del TCR es una importante herramienta para conocer la clonalidad en proliferaciones de células T (Krangel et al. 1998).

La citometría de flujo posibilita el análisis del repertorio del TCR mediante anticuerpos que reconocen diferentes familias TCR-V- β y que cubren aproximadamente el 70% del repertorio de los linfocitos T. Estos estudios permiten además la detección de clonalidad en las expansiones del repertorio del TCR, ya que los reordenamientos clonales modifican cuantitativamente el repertorio. Realizamos una primera aproximación mediante citometría de flujo para el análisis del repertorio $V\beta$ del TCR en las células DP del paciente. Para ello se utilizó un panel de anticuerpos monoclonales estandarizado para el estudio de clonalidad en células T.

El análisis por citometría de flujo de las células T del paciente mostró que ninguno de los anticuerpos monoclonales del panel utilizado identificaba la población linfocitaria T mayoritaria DP. La suma del porcentaje de células positivas para cada una de las 24 familias $V\beta$ estudiadas fue de un 2.5%, en lugar del 70%, como se observa en la **Tabla 6.4**. Estos datos sugirieron que la población mayoritaria de células T en este paciente no estaba siendo detectada con los anticuerpos utilizados.

Tras obtener los datos de citometría sugiriendo la posibilidad de una población mayoritariamente clonal realizamos estudio molecular del reordenamiento de las cadenas β y γ del TCR mediante técnicas de biología molecular (van Dongen et al. 2003).

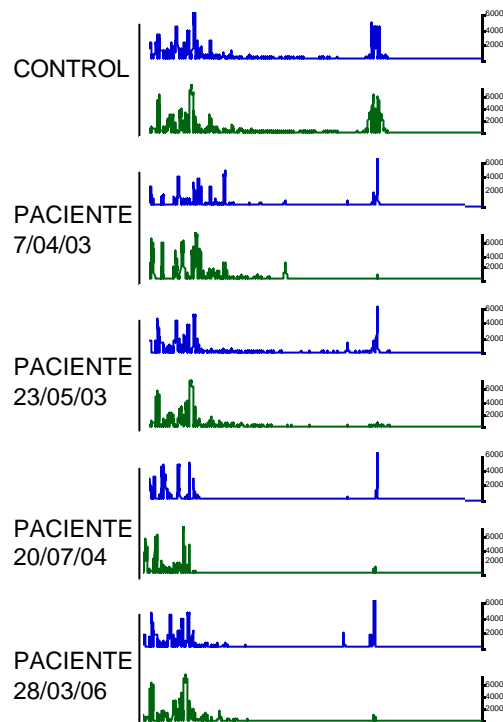
Tabla 6.4. Porcentaje de células positivas para cada una de las familias $V\beta$ del TCR en células T del paciente y de donantes sanos. DS.

Familia	%DS	% Paciente
<i>Vb 5,3</i>	1,1	0,17
<i>Vb 7,1</i>	2,7	0,09
<i>Vb 3</i>	3,85	0
<i>Vb 9</i>	2,87	0,63
<i>Vb 17</i>	5,32	0,07
<i>Vb 16</i>	0,77	0
<i>Vb 18</i>	1,21	0,44
<i>Vb 5,1</i>	4,44	0
<i>Vb 20</i>	2,08	0
<i>Vb 13,1</i>	3,59	0,17
<i>Vb 13,6</i>	1,84	0,05
<i>Vb 8</i>	3,56	0
<i>Vb 5,2</i>	1,44	0,07
<i>Vb 2</i>	9,39	0,14
<i>Vb 12</i>	1,85	0,02
<i>Vb 23</i>	1,04	0,054
<i>Vb 1</i>	2,87	0
<i>Vb 21,3</i>	1,95	0,29
<i>Vb 11</i>	1,03	0
<i>Vb 22</i>	4,65	0
<i>Vb 14</i>	3,29	0
<i>Vb 13,2</i>	2,78	0,14
<i>Vb 4</i>	2,23	0
<i>Vb 7,2</i>	1,08	0
Total	66,93	2,334

RESULTADOS

Tres reacciones de PCR multiplex amplifican el gen TCR- γ . Las combinaciones de primers son elegidas dentro de las regiones de las diferentes subfamilias V y J. El protocolo TCR- γ PCR muestra una sensibilidad diagnóstica del 90% para detectar clonalidad en el linaje T. De la misma forma con primers específicos se analizaron las diferentes familias β del TCR. Encontramos que los reordenamientos de las cadenas β y γ del TCR mostraban un patrón clonal en muestras del paciente desde el año 2003 hasta la actualidad, como se observa en la **Figura 6.28**.

Figura 6.28. Análisis de los reordenamientos génicos de la cadena β del TCR, de una muestra de un control (DS) y de muestras del paciente pertenecientes a diferentes fechas. Los colores verde y azul indican el distinto marcaje de los dos terminadores utilizados. En el control se observa una distribución gaussiana policlonal, mientras que en el resto de muestras pertenecientes al paciente se observa una distribución monoclonal que corresponde a un único reordenamiento mayoritario.



Para conocer las características de distribución de las diferentes familias $V\beta$ del TCR de los linfocitos T de este paciente se realizó el análisis TcLandscape, que consiste en el análisis de la expresión de 26 genes de las cadenas del TCR, el cual genera dos tipos de datos; cuantitativos y cualitativos. Los datos cuantitativos representan la valoración de la PCR cuantitativa para cada una de las familias de cadenas $V\beta$ del TCR. Los datos se expresan como copias de cDNA o como el ratio cuantitativo $V\beta$ /HPRT (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa).

Los datos cualitativos consisten en el porcentaje de alteración del patrón de distribución de la longitud de CDR3. El análisis se realiza a través de los siguientes softwares. El software Immunoscope genera la distribución de perfiles de longitud de CDR3 en aminoácidos de cada una de las familias de $V\beta$, según el cual se puede saber si la distribución de cada una de las cadenas $V\beta$ se distribuye de manera clonal o policlonal. El perfil encontrado en la población estudiada mostró tres familias $V\beta$ con la misma longitud, lo que confirmó los datos previos que habían mostrado un reordenamiento clonal. La distribución de longitudes del resto de familias $V\beta$ sigue una dinámica gaussiana, como se muestra en la **Figura 6.29**.

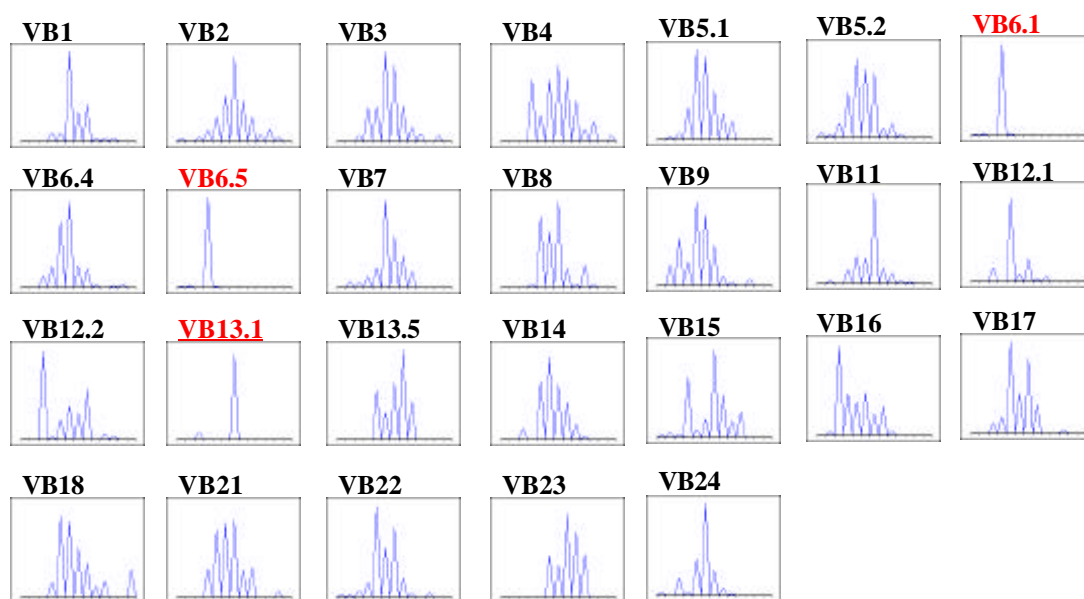


Figura 6.29. **Análisis Immunoscope donde se muestra la distribución de las diferentes longitudes de CDR3 de cada una de las familias V β del TCR.** Las familias VB6.1, VB6.5 y VB13.1 (en rojo) muestran la misma longitud de reordenamiento, mientras que el resto tienen reordenamientos policlonales u oligoclonales.

El software TcLandscape genera una aproximación visual de la suma de alteración del RNA mensajero de cada V β . Cada pico corresponde a un transcrito del TCR con una longitud del CDR3 dada, la elevación del pico indica la existencia de una expansión clonal, y los colores representan el porcentaje de alteración. El patrón de la población analizada mostró tres reordenamientos clonales principales, siendo uno de ellos cuantitativamente muy superior en el número de copias de cDNA, el cual corresponde a la familia V β 13.1, junto a otros dos minoritarios de las familias V β 6.1 y V β 6.5, como se observa en la **Figura 6.30**.

RESULTADOS

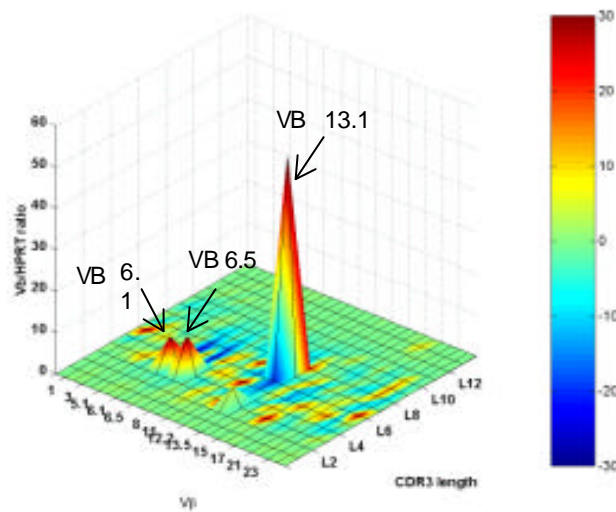


Figura 6.30. **Análisis Landscape** consistente en una representación gráfica integrando los datos cualitativos y cuantitativos de las alteraciones del TCR. En el eje de las X se muestran las diferentes familias Vbeta analizadas, en el eje de las Y se indica la distribución de longitud de CDR3 y en el eje de las Z se muestra el ratio de transcritos VB/HPRT. Los colores representan el porcentaje de alteración (desde el verde para perfiles gaussianos hasta el rojo para perfiles alterados). El principal reordenamiento detectado pertenece a la familia VB13.1 y muestra un alto grado de alteración. Existen otros dos reordenamientos de las familias VB6.1 y VB6.5.

6.14. Estudio citogenético: Cariotipo espectral (SKY)

El análisis citogenético convencional consiste en el estudio de las alteraciones cromosómicas en las metafases de células obtenidas tras el cultivo "*in vitro*" a corto plazo. El estudio de la morfología de los cromosomas, teñidos fundamentalmente con bandas G (Tripsina-Giemsa), permite detectar en un único experimento, tanto las alteraciones numéricas (monosomías, trisomías, etc.), como las estructurales (translocaciones, inversiones, deleciones, etc.) presentes en todo el genoma. El resultado del estudio citogenético clásico en células de sangre periférica del paciente demostró una población clonal con las siguientes alteraciones 46 XY/45,-Y,Xq+der(8),-11,11q+,14q-.

Para conocer más específicamente las alteraciones cromosómicas de las células en estudio realizamos un cariotipo multicolor o espectral (SKY) que consiste en marcar el DNA de cada cromosoma con uno o varios fluorocromos, de manera que el espectro de emisión de cada cromosoma sea único y diferenciable de los demás.

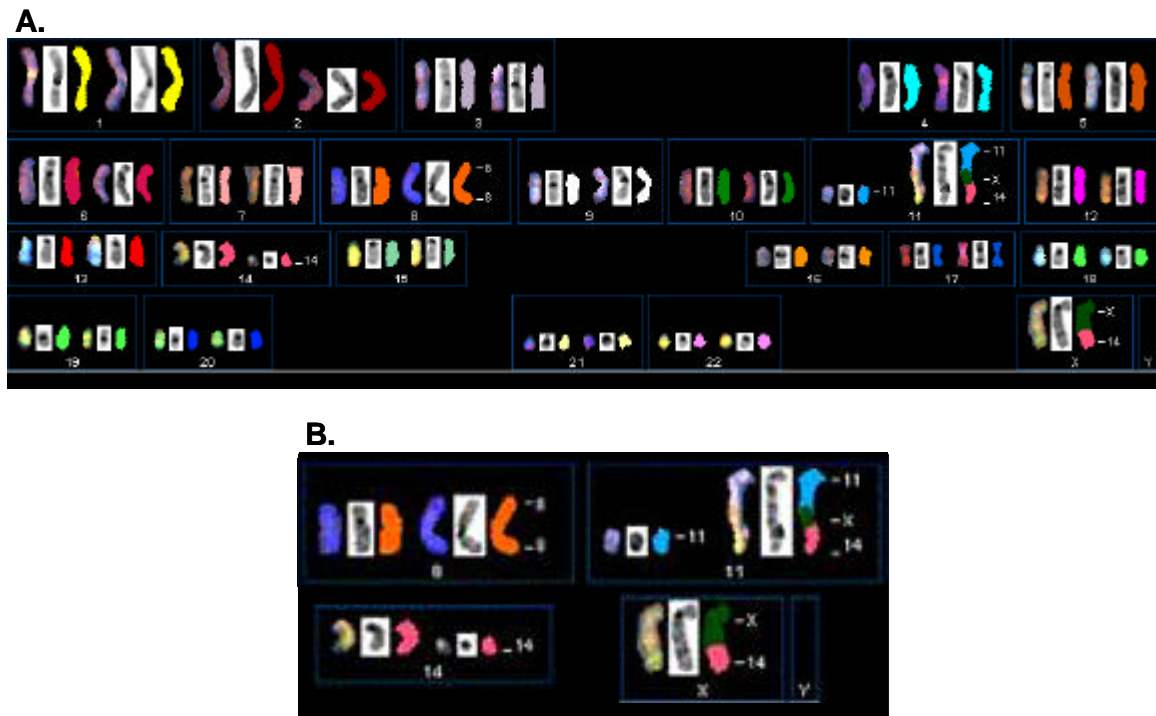


Figura 6.31. **Análisis citogenético mediante cariotipo espectral multicolor (SKY).** **A.** Cariotipo espectral multicolor, donde se observan múltiples translocaciones cromosómicas. El 25% de las células mostraron un cariotipo normal, 46,XY. Mientras que el 75% restante 45,t(X;14)(q28;q11.2) ,Y,i(8)(q10), del(11)(q13), der(11)t(X;11;14)(q?;q23;q11.2). **B.** Detalle de las principales alteraciones, isocromosoma 8, deleción del brazo largo del cromosoma 11, una translocación triple entre los cromosomas X, 11 y 14 y translocación recíproca entre los cromosomas X y 14.

Con esta técnica más sensible que el cariotipo convencional se han podido caracterizar correctamente translocaciones complejas, lo que ha permitido identificar un gran número de nuevas alteraciones cromosómicas. El cariotipo espectral multicolor (SKY) detectó además de un 25% de células normales con cariotipo XY, la presencia de un clon celular de 45 cromosomas (debido a la pérdida del cromosoma Y) con alteraciones estructurales. Dentro de estas anomalías se encuentran algunas de las frecuentemente asociadas con T-PLL, como son la presencia de isocromosoma 8, translocación recíproca entre los cromosomas X y 14, una deleción del brazo largo del cromosoma 11 y una translocación triple entre los cromosomas X, 11 y 14, como se observa en la **Figura 6.31.**

6.15. Estudio genético

Previo a los estudios hematológicos y citogenéticos, el estudio de esta población DP nos planteó varias hipótesis sobre su origen. Los correceptores CD4 y CD8 tienen un importante papel durante la selección tímica, aunque el rol preciso y su implicación en la selección positiva y negativa están aun sin resolver. No obstante, su importancia en la modulación de la unión del ligando al TCR y la aproximación de la tirosin kinasa p56lck al complejo CD3 está demostrada (Zamoyska 2003). En términos de selección positiva, es de particular importancia un motivo localizado en la membrana proximal de la cadena alfa del TCR denominado "connecting peptide motif" CPM el cual consta de una secuencia de siete aminoácidos altamente conservados, y que solo está presente en las células TCR $\alpha\beta$.

Los timocitos de ratones que expresan CPM mutante sufren un defecto en la selección positiva, mientras que la selección negativa no se encuentra afectada. Apareciendo una alta proporción de células DP en periferia. Pensamos que la población DP presente en la periferia de este individuo podría haber tenido su origen como consecuencia de algún defecto durante el proceso de selección positiva. No obstante, no encontramos ningún defecto en la secuencia del CPM de la cadena alfa del TCR, como se observa en la **Figura 6.32**.

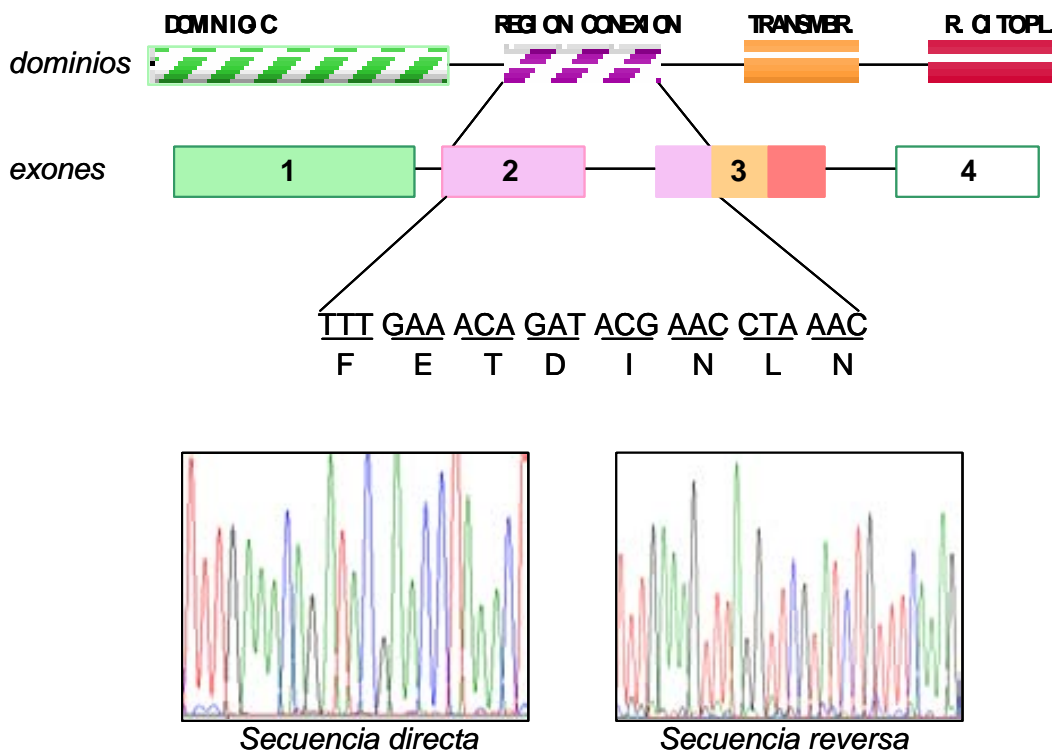


Figura 6.32. **Análisis de la secuencia de la región constante de la cadena alfa del TCR.** La zona ampliada corresponde a la secuencia del "connecting peptide motif". En la parte inferior izquierda se muestra el electroferograma de la secuencia directa y a la derecha de la reversa del paciente.

La segunda hipótesis para justificar la existencia de los dos correceptores en una célula T madura fue pensar que, tal vez uno de los receptores (CD4 o CD8) estuviera desreprimido en el otro tipo celular. Este mecanismo es bien conocido en la represión del CD4 en las células CD8 maduras, debido a la existencia de una región silenciadora del CD4 a la cual se unen diferentes factores de transcripción, que en último término van a hacer que la expresión de CD4 esté reprimida en las células CD8. Se ha visto en modelos murinos, que mutaciones en lugares concretos del silenciador CD4 resultan en una desrepresión parcial de correceptor CD4 en linfocitos CD8+ maduros. Mientras que mutaciones compuestas o una completa deleción del silenciador del CD4 dan lugar a un fenotipo DP en periferia El silenciador del CD4 es una secuencia altamente conservada, en la cual no existen polimorfismos simples (SNPs). Secuenciamos este segmento génico conservado, no encontrando variación respecto a muestras control, como se observa en la **Figura 6.33**.

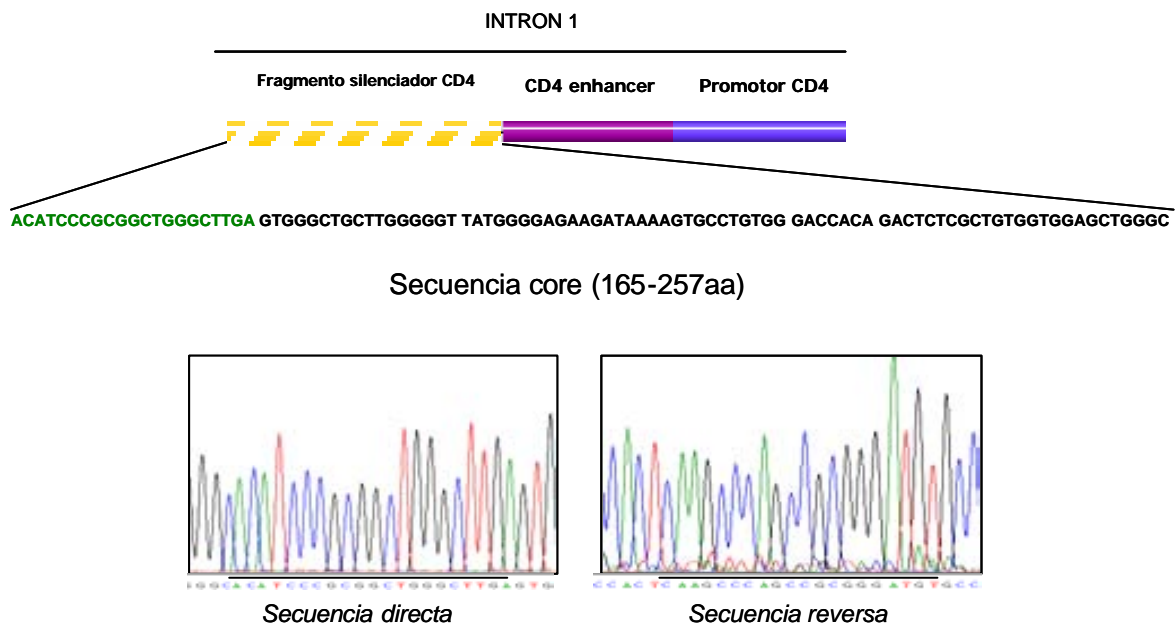


Figura 6.33. **Análisis de la secuencia del silenciador del CD4.** Organización de la zona reguladora del CD4 en el intrón 1, compuesta por el fragmento silenciador del CD4, en enhancer del CD4 y su promotor. En el fragmento silenciador existe una secuencia central o core imprescindible para el silenciamiento del CD4. En la parte inferior se muestran los electroferogramas directo (izquierda) y reverso (derecha) correspondientes a la secuencia que codifica para el silenciador del CD4 del paciente.

DISCUSIÓN

Las IDP se definieron clásicamente como aquellas alteraciones genéticas del sistema inmune que producían un aumento en la frecuencia y gravedad de infecciones. En la actualidad, se ha flexibilizado esta definición dando cabida a un mayor espectro de enfermedades que afectan al sistema inmune, y que no siempre implican un mayor aumento en la frecuencia de las infecciones, como aquellas que afectan a la homeostasis del sistema inmune o los denominados Síndromes autoinflamatorios. A continuación discutimos individualmente cada uno de los casos estudiados en este trabajo.

Enfermedad granulomatosa crónica (EGC)

En el presente trabajo se describe la caracterización clínica y molecular de una paciente con Enfermedad Granulomatosa Crónica en la que se demostró que la mutación responsable del defecto en la fagocitosis era una delección del dinucleótido GT al inicio del exón 2 del gen *NCF1*, que codifica para la subunidad p47-*phox* de la NADPH-oxidasa.

La prueba de reducción del NBT por fagocitos activados fue el primer método universalmente aceptado para definir la normalidad en la producción de anión superóxido. En este sentido el estudio de los fagocitos de la paciente mostró una alteración severa de la capacidad bactericida, confirmándose el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica. En estudios anteriores (Vowells et al. 1996), en los que se midió la actividad de la oxidasa por citometría de flujo, se encontró una diferencia significativa en la producción de peróxido en neutrófilos de pacientes con EGC ligada a X y autosómica recesiva por deficiencia de p47-*phox*, lo que indicaría que la mutación de la p47-*phox* no impide completamente la oxidación a pesar del severo defecto en la generación de superóxido, caracterizándose por una clínica más leve que la ligada al X. Estudios preliminares sugerían que a través del uso de la citometría de flujo se podía efectuar una medición cuantitativa y por tanto la detección de portadores (Crockard et al. 1997), no obstante en nuestra experiencia y en la de otros autores esta aproximación ha resultado bastante inespecífica. Es posible que esta técnica sólo sirva para el diagnóstico de portadoras de las formas ligadas al sexo, en las que es particularmente útil, ya que con frecuencia las portadoras de mutaciones en *CYBB* presentan clínica asociada.

Aunque este caso no se separa de lo habitual en la presentación clínica en cuanto a las típicas infecciones en la infancia y en la pubertad, la paciente mostró una complicación tardía de tuberculosis pulmonar. Por lo que una de las implicaciones prácticas del presente trabajo es que el diagnóstico de EGC debe considerarse en personas adultas que presentan una infección o infecciones sugestivas de defecto en la función de las células fagocíticas. Es probable que el uso generalizado de terapia antibiótica, que es muy efectivo en los pacientes con infecciones menos severas, sea también una causa que retarde el diagnóstico de EGC por déficit de p47-*phox*.

DISCUSIÓN

La mutación encontrada en estos pacientes (delección homocigota del dinucleótido GT en el exón 2) es la misma descrita en pacientes con deficiencia de p47-*phox* en (Iwata et al. 1994) (Casimir et al. 1991) y parece ser responsable de la mayoría de los casos publicados en el mundo, a diferencia de la deficiencia de gp91-*phox*, p22-*phox* y p67-*phox*, que pueden deberse a gran variedad de mutaciones. La alta frecuencia de esta mutación en pacientes con deficiencia de p47-*phox* no emparentados se explica por la presencia de dos pseudogenes (ψ NCF1) altamente homólogos, que por medio de fenómenos de recombinación meiótica hacen que el gen normal sea eliminado o convertido en la secuencia anormal (Gorlach et al. 1997), fenómeno similar al encontrado en otras IDP como en el Síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS).

Por otro lado, el método desarrollado por Dekker para detectar los genes que portaban la delección y los que eran activos, basado en la intensidad de fluorescencia de los productos de PCR marcados, mostraba limitaciones ya que solo determina el ratio entre el número de genes NCF1 y el de pseudogenes ψ NCF1, siendo útil para la determinar la presencia de genes con la duplicación pero no completamente fidedigno para la detección de portadores (Dekker et al. 2001).

Por lo que la detección de defectos parciales requiere incluir métodos más sensibles, como los recientemente publicados en familias con la delección GT en el exón dos. En los que a través de una amplificación específica para el gen *NCF1* y no para el pseudogen, se han detectado diferentes mutaciones en otras partes del gen, lo que ha permitido incluso el diagnóstico prenatal (Roos et al. 2006).

La caracterización molecular de la ECG autosómica recesiva es importante para la clasificación diagnóstica, lo cual permite entregar un pronóstico al paciente, un adecuado consejo genético y una eventual terapia futura, que a diferencia de otras formas de ECG excluye el TPH.

Agammaglobulinemia ligada al X (XLA)

En el caso descrito, con los antecedentes clínicos del paciente, el hallazgo de todos los isotipos de inmunoglobulinas disminuidos y la ausencia de linfocitos B se estableció el diagnóstico de presunción de agammaglobulinemia ligada al sexo. La respuesta exitosa al tratamiento con IVIG reafirmó este diagnóstico. Desde el comienzo de la terapia, la frecuencia y severidad de sus infecciones ha disminuido significativamente y la calidad de vida del paciente ha mejorado de forma considerable.

La alta heterogeneidad de las mutaciones descritas en el gen *BTK* y el grado de expresión de la proteína, son responsables de la gran variabilidad fenotípica de la enfermedad, de modo que algunos casos de XLA han sido catalogados como Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV). En el caso estudiado existe una completa correlación entre la gravedad de los síntomas, el fenotipo proteico y el genotipo, debido a que la mutación genera una parada temprana en la pauta de lectura que abole la expresión de la proteína Btk. La mutación, descrita (C439T) en hemicigosis en el paciente y en heterocigosis en su madre, se encuentra en el dominio PH, el cual es responsable de la localización de la proteína en la membrana citoplasmática. Las mutaciones en este dominio pertenecen a la categoría de mutaciones estructurales produciendo cambios conformacionales que afectan a su expresión y consecuente funcionalidad. Las mutaciones en *BTK* se distribuyen a lo largo de todo el gen, no obstante se agrupan más de lo que se debería esperar en la región SH1, no siendo llamativamente frecuentes las mutaciones en el exón 4 (Valiaho et al. 2006). La mutación aquí descrita (Q103X) pertenece al grupo de mutaciones puntuales, el cual es el más frecuente dentro de las alteraciones descritas en el gen de la Btk con una frecuencia aproximada del 65%, de las cuales las nonsense son el 33% (Kristufek et al. 2007). El codon 103 está altamente conservado en vertebrados y no existen polimorfismos descritos en su secuencia (Ver **Figura D.1.**). En la base de datos mundial de mutaciones en *BTK* (<http://bioinf.uta.fi/BTKbase/>) solo se ha descrito una mutación implicando al mismo codon (Nº de acceso del Genbank A0812) (Lopez-Granados et al. 2005), en la que se da un cambio de aminoácido Q103R. En el paciente con esta mutación el diagnóstico fue tardío, ya que se realizó a los 20 años de edad con niveles de inmunoglobulinas menos reducidos que en el caso descrito en este trabajo. Por lo que cambios que afectan al mismo aminoácido dan lugar a diferentes fenotipos, la generación de un codon de parada no permite la expresión de la proteína, mientras que un cambio de aminoácido afecta a las interacciones entre dominios conservando la actividad enzimática y disminuyendo la gravedad de la enfermedad.

El método usado comúnmente para selección de mutaciones en XLA ha sido SSCP (Single-strand conformational polymorphism), el cual tiene una sensibilidad de detección de mutaciones de solo un ~70%, existiendo un riesgo considerable de resultados falsos positivos, que requieren finalmente el estudio mediante secuenciación (Weston et al. 2001).

Por lo que únicamente el análisis de expresión proteica y el análisis molecular de DNA genómico y transcritos de RNA provee de una adecuada herramienta para el diagnóstico definitivo y

DISCUSIÓN

la determinación de portadores, lo que es esencial para el subsiguiente consejo genético y la prevención de nuevos casos. En este caso el consejo genético fue una selección de sexo.

Según publicaciones recientes, el 93% de las madres son portadoras de las mutaciones en XLA, como ocurre en este caso. (Fiorini et al. 2004).

	1	
8	0	
1	3	
RRGEESSEMEQISIIERFPYPF	X	Paciente
RRGEESSEMEQISIIERFPYPF	R	Familia Madrid (Ac N°: A0812)
RRGEESSEMEQISIIERFPYPF	Q	<i>Homo sapiens</i>
RRGEESSEMEQISIIERFPYPF	Q	<i>Mus musculus</i>
RRGEESSEMEQISIIERFPYPF	Q	<i>Rattus norvegicus</i>

Figura D.1. **Alineamiento de la secuencia peptídica correspondiente al producto del exón 4 de la proteína Btk del paciente, dentro del dominio PH.** Alineamiento de la secuencia de un paciente descrito en Madrid (n° de acceso del Genbank A0812), *Homo sapiens* (n° de acceso del Genbank NM_000061), *Mus musculus* (n° de acceso del Genbank NM_013482), *Rattus norvegicus* (n° de acceso del Genbank NM_001007798).

HIPER IgM no ligada al X

Entre las inmunodeficiencias con hiper IgM se pueden distinguir dos grupos dependiendo de su patrón de herencia, las que son ligadas al X y las que se heredan de forma autosómica recesiva. Al primer grupo pertenecen la deficiencia en CD40L y la deficiencia en NEMO, en cambio en el segundo se ha descrito deficiencias en tres genes (*CD40*, *AID*, y *UNG*) (Bhushan et al. 2001). El desorden humoral resultante de los defectos en CD40 y CD40L se ha considerado un defecto combinado más que una inmunodeficiencia humoral, ya que la comunicación entre células T y B es esencial para la proliferación de las células B, el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y la formación de centros germinales (Foy et al. 1994).

En los dos casos estudiados con Síndrome de hiper IgM lo primero que se descartó es que fuesen formas debidas a alteraciones en alguna de las dos moléculas principales del eje CD40-CD40L. Ambos casos mostraron una expresión correcta de CD40L tras la estimulación de las células T, así como la ausencia de alteraciones genéticas en dicha molécula. Hasta ahora todos los pacientes afectados con síndrome de hiper IgM debidos a un defecto en CD40 han sido diagnosticados por análisis citofluorimétrico basándose en la pérdida de expresión de CD40 en la superficie de células B y una posterior confirmación por métodos moleculares. Analizamos su expresión en la superficie de células B en ambos pacientes sin encontrar alteraciones. No obstante, considerando que CD40 es expresado como un trímero, no podemos descartar que mutaciones heterocigotas puedan dar un mal funcionamiento del receptor (Ferrari et al. 2001). De todos modos la clínica de ambos pacientes no era tan severa como la que presentan los pacientes con déficit de CD40.

La forma de hiper IgM por mutaciones en *NEMO* fue descartada inicialmente por que los pacientes analizados no muestran la clínica que acompaña a esta deficiencia (Jain et al. 2001).

El resto de síndromes de hiper IgM son causa de defectos en dos enzimas, *AID* y *UNG*, las cuales son de crucial importancia para los procesos de cambio de clase de inmunoglobulinas y de hipermutación somática. Excluimos la posibilidad de un defecto en *AID* tras no encontrar alteraciones en el estudio molecular y la ausencia de células B de memoria, ya que los pacientes con deficiencia en *AID* muestran un número normal de células B CD27+ (Revy et al. 2000). Descartamos también la posibilidad de que un defecto en *UNG* fuese la causa de hiper-IgM en estos pacientes, debido a la poca frecuencia con la que se ha encontrado este defecto y a la gran cantidad de infecciones que tienen los individuos que la portan, junto a la presencia de adenopatías gigantes ausentes en los casos aquí estudiados. Además los pacientes deficientes en *UNG* tienen un número normal de células B CD27+ (Imai et al. 2003). La mayoría de los casos con síndrome de hiper-IgM, que no son debidos a la deficiencia en *AID* o *UNG* y que muestran una expresión normal de CD40 y CD40 ligando se deben a defectos intrínsecos de las células B.

Dentro de las deficiencias predominantes de anticuerpos, con severa reducción de varios isotipos de las inmunoglobulinas, se encuentra la inmunodeficiencia común variable. En estos casos

DISCUSIÓN

los niveles normales o elevados de IgM excluyeron este diagnóstico, el cual se caracteriza por una disminución de la concentración en suero de todos los isotipos de inmunoglobulinas, incluida la IgM (Cunningham-Rundles et al. 1999). También se evaluaron otros receptores de superficie implicados en defectos en el CSR, como es el caso de la deficiencia en ICOS, en la que se encuentra una disminución de los linfocitos B y una reducción severa de IgG e IgA, con niveles de IgM que pueden estar reducidos, normales o incluso incrementados en algún caso. En algunos de los pacientes con deficiencia en ICOS se han encontrado niveles normales de IgG3 con concentraciones muy disminuidas del resto de las subclases (Warnatz et al. 2006), dato que tenía cierta similitud con el perfil de inmunoglobulinas que mostraba la paciente P2 al comienzo de los síntomas. Descartamos este defecto tras comprobar la expresión normal de ICOS en células T activadas en ambos pacientes, células en las que se encuentra exclusivamente. Han sido descritas deficiencias en receptores de las células B que dan lugar a hipogammaglobulinemia asociada con fenómenos autoinmunes como la deficiencia en TACI, o con gran incidencia de infecciones recurrentes por bacterias como la deficiencia en CD19, en las cuales no existe un aumento en la concentración de IgM (Salzer et al. 2005).

A continuación discutimos cada uno de los casos con hiper IgM estudiados en este trabajo.

En el paciente P1 llama la atención la falta de infecciones en ausencia de terapia sustitutoria de inmunoglobulinas y el desarrollo de nodulosis erosiva. Los datos bibliográficos muestran que alrededor de un 9% de los pacientes con síndrome de hiper-IgM han sido asociados con el desarrollo de rasgos clínicos de artritis reumatoide, y aunque no se han descrito las manifestaciones precisas (Webster et al. 1999), existen descripciones más concretas en un caso de hiper-IgM ligado al cromosoma X asociado a una forma agresiva de artritis y en otro con deficiencia en CD40 asociado con poliartritis con cambios erosivos, en ausencia de factor reumatoide (Sibilia et al. 1996). Junto con estos casos, el caso aquí descrito muestra un síndrome de hiper IgM, en ausencia de un defecto molecular conocido que desarrolla artritis erosiva. Aunque no está claro de que manera, defectos en la señalización CD40-CD40 ligando, podrían contribuir a un aumento de la susceptibilidad a desarrollar clínica de artritis inflamatoria. Algunos autores han barajado la posibilidad de que la clínica de artritis en estos casos sea el resultado de una infección pasada, ya que existe variedad de agentes infecciosos asociados con manifestaciones similares a AR, incluidos micobacterias, clamidias, EBV, etc (Ho 1992; Naides 1995).

Los hallazgos presentes en la sinovia de este paciente son similares a los encontrados en artritis reumatoide, con infiltrados linfocitarios de células T, B y células plasmáticas, donde las células T CD4 prevalecen sobre las T CD8. Esto junto con la expresión un alelo, particularmente asociado a AR, HLA-DRB1*0404 y el desarrollo de una artritis erosiva confirma que además de los mecanismos implicados en la colaboración normal de células T y células B, otros mecanismos independientes de esta colaboración podrían participar en la etiopatogénesis de la AR (Gaston 1993).

En la paciente P2, la primera hipótesis de estudio fue una hipogammaglobulinemia transitoria secundaria al tratamiento con carbamacepina. Este diagnóstico fue apoyado por las bajas concentraciones de IgG e IgA, junto con presencia de un pequeño componente monoclonal de la subclase IgG3 y la presencia de la IgA1 en suero.

No obstante, el cese del tratamiento anti-epiléptico y la consiguiente evolución de la concentración de los distintos isotipos de inmunoglobulinas mostraron un aumento de IgM en ausencia del resto de isotipos y características clínicas de Síndrome de Hiper IgM que requirieron finalmente el tratamiento con IVIG.

Además de las deleciones en los genes de las inmunoglobulinas que fueron descartadas en esta paciente, moléculas como el TGF-beta y AID que tienen un importante papel en el cambio de isotipo o en la diferenciación terminal a células plasmáticas han sido postulados como causa de deficiencias primarias de inmunoglobulinas (van Ginkel et al. 1999). Las anomalías asociadas con drogas anti-epilépticas, particularmente las transitorias, pueden deberse a una inhibición de estas moléculas (Muramatsu et al. 1999). No obstante, el aumento de la concentración de IgM y su estabilidad a lo largo del tiempo hizo que excluyéramos el carácter transitorio del defecto inmunológico en esta paciente, catalogándolo como hiper IgM y no como Inmunodeficiencia Común Variable. No obstante, la falta de datos sobre los niveles de inmunoglobulinas previos al tratamiento con CBZ, deja sin resolver si el Síndrome de hiper IgM que sufre esta paciente ha sido secundario al tratamiento o existía previamente pero no había tenido consecuencias clínicas.

Aunque aun se desconocen las bases moleculares en los dos casos de Hiper IgM aquí presentados, los hallazgos clínicos e inmunológicos están bien caracterizados. Dentro del grupo de Síndromes de Hiper IgM sin defecto molecular conocido han sido reconocidas dos formas en base a los hallazgos inmunológicos y moleculares. En ambos, el fenotipo clínico es semejante al de la deficiencia en AID, con infecciones sinopulmonares e intestinales. En la primera de estas dos formas el defecto en CSR parece estar localizado después de la transcripción de la región S, pero antes de la rotura del DNA. El número de células B CD27+ memoria en estos casos es normal. La segunda forma de Hiper IgM causada por un defecto en el CSR indefinido e intrínseco a la célula B, está caracterizada por un número normal de células B y se ha postulado que la alteración podría encontrarse tras la rotura del DNA (Notarangelo et al. 2006). El hecho de no encontrar células memoria B CD27+ en ninguno de los casos aquí estudiados, nos indica que el defecto que da lugar a un CSR alterado podría encontrarse en este proceso tras la rotura del DNA, lo que sugeriría que podrían estar implicadas en estos defectos proteínas reparadoras del DNA, como Msh2, Mlh1 y Pms2, exonucleasas, u otras moléculas que intervienen en este proceso. Asimismo, la presencia o ausencia de células B de memoria permite subdividir las IDCv en diferentes subgrupos con distinto pronóstico clínico (Detkova et al. 2007). No es inusual la falta de caracterización molecular dentro de los Síndromes de hiper IgM, de hecho en una de las series más amplias analizadas en el 23% de los pacientes, no se determinó el defecto genético tras haber descartado los genes habituales (Lee et al. 2005).

DISCUSIÓN

Deficiencia en adenosín deaminasa (ADA).

Las características clínicas en este caso fueron sugestivas de una Inmunodeficiencia Severa Combinada, lo que sumado a una profunda linfopenia que afectaba a linfocitos T y B sugirió un posible defecto en adenosín deaminasa (ADA) o en purín nucleósido fosforilasa (PNP). A pesar de las similitudes con otras formas de SCID, existen rasgos específicos como la toxicidad metabólica sistémica reflejada en los altos niveles de transaminasas y fosfatasa alcalina encontrados en este paciente desde el inicio de los síntomas, que indican un diagnóstico atribuible a la deficiencia en ADA o en PNP. Ambas deficiencias se presentan por igual en ambos sexos y tienen un tipo de herencia autosómica recesiva. A diferencia de la deficiencia en ADA, la deficiencia PNP es aún más infrecuente y de presentación más variable. Respecto a la deficiencia en PNP, pueden pasar varios años antes de que se inicien las infecciones de repetición, que frecuentemente son virales (parainfluenza, virus respiratorio sincitial, enterovirus). En la deficiencia en PNP las cifras de linfocitos, inmunoglobulinas y las pruebas funcionales de linfocitos pueden fluctuar en el tiempo y algunos pacientes presentan anomalías neurológicas. A diferencia de los pacientes con deficiencia ADA, los pacientes con deficiencia de PNP tienen niveles de ácido úrico sérico bajo (<1 g/dL), dato ausente en el caso estudiado (Blackburn et al. 2005).

La prueba diagnóstica de estas inmunodeficiencias es un ensayo enzimático para la determinación de la actividad de ADA y de PNP. Se lleva a cabo en glóbulos rojos, lo que permitió en este caso confirmar el diagnóstico definitivo de deficiencia en ADA y descartar la deficiencia en PNP. En este caso el diagnóstico se realizó en base a la actividad ADA, apoyado por los hallazgos inmunológicos, el diagnóstico genético no siempre es necesario o imprescindible para realizar un tratamiento efectivo que lleve a una recuperación inmunológica total.

El tratamiento de elección en la mayoría de los casos de déficit de ADA es el trasplante de precursores hematopoyéticos de un donante emparentado histocompatible, como el que se llevó a cabo en este caso de déficit de ADA. No obstante, los trastornos linfoproliferativos producidos por el virus de Epstein-Barr pueden resultar en serias complicaciones causando una significativa morbilidad y mortalidad en receptores de trasplante de médula ósea. Estas linfoproliferaciones pueden estar rodeadas de un extenso espectro de entidades clinicopatológicas dependiendo del lugar de implicación, como son tumores con distinta localización (tracto intestinal, hígado, páncreas) (Monforte-Munoz et al. 2003). Aunque el tratamiento en este caso fue el TMO de un donante emparentado, sin fallos de injerto, el hecho de que la donante no fuera completamente idéntica (haplo idéntico) y la incidencia de linfoproliferación asociada al virus de Epstein Barr pudieron ser los desencadenantes de la aparición del linfoma cerebral. Por otro lado, en recuperaciones a largo plazo de pacientes con déficit de ADA trasplantados se ha observado un alto riesgo de padecer complicaciones neurológicas, ya que los niveles de ADA generados por el injerto pueden no ser suficientes para eliminar metabolitos tóxicos en ciertos tejidos profundos, como es el sistema nervioso central (Honig et al. 2007).

Síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS)

Las alteraciones en la homeostasis del linfocito causadas por defectos en las vías de señalización de la apoptosis generan cuadros clínicos de linfoproliferación autoinmune, como el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (ALPS) (Rieux-Laucat et al. 1995). En este trabajo se describen los rasgos clínicos, inmunológicos y genéticos de once pacientes con una afectación linfoproliferativa autoinmune. Los pacientes fueron seleccionados por sus rasgos clínicos o por ser parientes de alguno de los seleccionados.

El Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune consiste en un cuadro crónico con un alto grado de variabilidad en su expresión clínica. No obstante, han sido definidos los rasgos clínicos de ALPS e incluyen linfadenopatías/esplenomegalia, autoinmunidad, así como una susceptibilidad incrementada a sufrir neoplasias linfoides (Sneller et al. 1997). El mecanismo fisiopatogénico que justifica este cuadro consiste en un acumulo de linfocitos T debido al fallo en la apoptosis mediada por Fas. Junto a este rasgo, el fallo en la apoptosis de los linfocitos B podría ser responsable de los fenómenos autoinmunitarios humorales que completan el síndrome (Worth et al. 2006).

La hipergammaglobulinemia es una característica del síndrome, y aunque no todos los pacientes muestran elevados los niveles de uno o varios isotipos de inmunoglobulinas, en general se observa que los que las tienen aumentadas también muestran un alto número de células B. A pesar de todo, existe una alta heterogeneidad en ambos rasgos, incluso entre individuos que portan la misma mutación, lo que es consistente con la influencia de otros factores que puedan contribuir a la patogénesis de la enfermedad (Rieux-Laucat et al. 2003).

Los datos bibliográficos describen un aumento de subpoblaciones linfocitarias en ALPS, entre ellas expansiones de células T doble negativas (CD4-CD8-) (DNTs), tanto $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$, de células T CD8 y de células B (Bleesing et al. 2001). Estas características son comunes en los pacientes con ALPS sugiriendo que un defecto en la apoptosis vía Fas asociado con una disminución en la apoptosis *in vitro* (a pesar de no haber mutaciones en *TNFRSF6*) sería suficiente para una expansión de estas subpoblaciones linfocitarias. En la literatura se describe una fuerte asociación entre el exceso de células DNTs y un defecto en la apoptosis mediada por Fas (Rieux-Laucat et al. 2003). Nuestros resultados únicamente muestran esta asociación en la familia A. En el resto de los pacientes existe gran variabilidad en el porcentaje de dicha población, el cual no se correlaciona con el porcentaje de muerte celular tras el ensayo funcional de inducción de la apoptosis. Encontramos esta variabilidad incluso entre pacientes de la misma familia que tienen una mutación en el dominio intracelular de Fas, como es el caso de la familia B.

Las mutaciones heterocigotas en Fas conllevan anomalías de la apoptosis tanto de linfocitos normales como autoreactivos, lo que hace que se acumulen y produzcan fenómenos autoinmunes en este síndrome. Dos tercios de las mutaciones ocurren en el dominio intracelular, la gran mayoría son heterocigotas, muestran un efecto negativo en las señales vía Fas, y se comportan como mutaciones de herencia dominante (Jackson et al. 1999). La demostración de la preasociación del receptor Fas en la superficie celular vía el dominio PLAD (Siegel et al. 2000) proporciona una explicación para este

DISCUSIÓN

efecto dominante negativo, ya que una sola proteína mutante dentro del trímero es suficiente para inhibir el cambio estructural en Fas que permita una unión cooperativa con FADD para formar el DISC y la consecuente señalización intracelular de la apoptosis.

Las mutaciones presentes en dos de las familias estudiadas (A y B) tienen su localización en el exon 9 dentro del dominio muerte de Fas, y ambas se encuentran en el codon 234, afectando al mismo residuo aminoacídico. En estudios de mutagénesis dirigida se demostró que la mutación R234A localizada en la hélice $\alpha 2$ de la molécula Fas reduce considerablemente su asociación con otras moléculas de Fas a la hora de formar trímeros y en su unión a FADD (Huang et al. 1996). En el caso de la familia A el cambio aminoacídico R234Q sustituye un aminoácido catiónico por uno polar sin carga, este hecho posiblemente impida la trimerización. El aminoácido 234 en la proteína Fas está altamente conservado en vertebrados lo que refuerza la importancia de este residuo para la función de la proteína como se observa en el alineamiento de secuencias en la Figura D.2. Mutaciones en esta posición han sido reportadas en varios pacientes en la base de datos NIH ALPSBase (<http://research.nhgri.nih.gov/alps/>) por lo que se le ha considerado un punto de alta frecuencia de mutaciones o hot spot (Rieux-Laucat et al. 1999). El análisis mediante fragmentos de restricción de mutaciones en el codon 234 nos permite de forma rápida y fidedigna el análisis de familiares de los miembros afectados en las familias A y B.

2	2	2
2	3	4
4	4	6
MTLSQVKGFVQKNGVNEAKIDEI	familia A	
MTLSQVKGFVX	familia B	
MTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEI	<i>Homo sapiens</i>	
MTIQEAKKFARENNIKEGKIDEI	<i>Mus musculus</i>	
MKICDAKKFARQH KIPESKIDEI	<i>Rattus norvegicus</i>	

Figura D.2. **Alineamiento de la secuencia peptídica producto del exón 9 de la proteína Fas de las familias A y B.** Alineamiento de las secuencias de Fas en *Homo sapiens* (nº de acceso del Genbank AY450925), *Mus musculus* (nº de acceso del Genbank NM_007987), *Rattus norvegicus* (nº de acceso del Genbank NM_139194).

En la bibliografía se describe una alta penetrancia clínica en las mutaciones que afectan al dominio intracelular de Fas (Vaishnav et al. 1999). En los casos aquí estudiados encontramos una penetrancia variable en la familia A, ya que el padre (A-II) con la misma mutación, una expansión similar de células DNTs y una apoptosis extremadamente alterada carece de clínica, mientras que su hija (A-I) con las mismas características tiene manifestaciones de la enfermedad, por lo que en este caso la penetrancia es incompleta. En el caso de la familia B, una mutación en el dominio intracelular de Fas generando una proteína truncada, todos los pacientes analizados manifiestan un fenotipo patológico. No obstante, solo el análisis del resto de la familia que no muestra patología nos permitirá decir si la penetrancia de la enfermedad es completa o incompleta.

La más frecuente de las formas de ALPS es la de tipo Ia, la cual esta causada por una gran variedad de mutaciones en el gen que codifica para Fas (*TNFRSF6*). Teniendo en cuenta los parámetros analizados, los pacientes de las familias A y B pertenecen al grupo de ALPS Ia.

Los pacientes en los que no hemos encontrado defectos moleculares en Fas, sugieren por su clínica y rasgos de laboratorio un defecto en la señalización intracelular de la vía de la apoptosis. Ya entre las primeras descripciones de ALPS se observaban pacientes sin mutaciones identificables en la cascada de señalización vía Fas, sin alteraciones en la apoptosis *in vitro*, pero con rasgos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos indistinguibles del ALPS tipo Ia (Sneller et al. 1997). Hemos comparado su presentación con la que muestran los pacientes con defectos moleculares en la cascada de las caspasas, defectos en caspasa 10 y en la caspasa 8 (Chun et al. 2002). La clínica que muestran los casos con defecto en caspasa 10 tiene manifestaciones autoinmunes desde el primer año de vida y niveles de DNTs superiores incluso a los que muestran los pacientes ALPS tipo Ia, lo que nos hizo descartar el estudio molecular de este enzima debido a la diferente presentación clínica (Wang et al. 1999). También excluimos la posibilidad de que fuera un defecto en caspasa 8, ya que los pacientes afectados de ALPS IIb presentan hipogammaglobulinemia e inmunodeficiencia con infecciones frecuentes por el virus herpes simple con falta de autoinmunidad (Chun et al. 2002).

Los pacientes con ALPS tipo III pueden no cumplir los cuatro rasgos clásicos del síndrome; linfoproliferación, alto número de DNTs, apoptosis defectuosa, y manifestaciones autoinmunes, por lo que los pacientes C, D, E, F-I y F-II los clasificaríamos en este grupo. Es posible que la heterogeneidad en la presentación en este grupo de pacientes sea fruto de la implicación de otras proteínas, que intervengan o regulen la apoptosis linfocitaria. Las publicaciones más recientes incluyen defectos en proteínas implicadas en proliferación o reorganización del citoesqueleto, entre otras funciones, como responsables de ALPS. Este es el caso de la proteína N-RAS, también relacionada con mutaciones generadoras de cancer (Oliveira et al. 2007). El paciente con este defecto no muestra una apoptosis *in vitro* alterada. Esto determina que no podamos excluir del diagnóstico de ALPS a pacientes con una clínica de linfoproliferación y autoinmunidad a pesar de mantener una apoptosis *in vitro* conservada.

De alguna forma, cabe llamar la atención en dos de estos pacientes, el C y el D, debido al florido cuadro de infecciones severas, que pudiendo ser secundario a la neutropenia crónica consecuencia de la esplenectomía, muestran una susceptibilidad superior a la habitual en este tipo de complicaciones.

A través del creciente conocimiento de la clínica de los defectos genéticos que generan el Síndrome ALPS y de la presencia de un aumento en fenotipos similares, parece probable que se incluyan otras condiciones que fueron inicialmente clasificadas independientemente, como el síndrome de Evans, la enfermedad de Rosai-Dorfman, ect, en este grupo.

DISCUSIÓN

Linfoproliferación doble positiva

En el último caso analizado una extensa población T DP en sangre periférica en un varón adulto, presenta una relación causal con una patología pulmonar autorreactiva. Como en otras IDP, la presencia de poblaciones linfocitarias anormales, como es el caso de las células DNT en ALPS, o las células infiltrantes en el Síndrome de Omenn que generan fenómenos autorreactivos es habitual, por lo que el hallazgo de una población T DP nos llevó a su estudio con profundidad.

En el estudio de las distintas expansiones persistentes de células DP descritas en la literatura se han distinguido varios fenotipos dependiendo de la intensidad de expresión de los correceptores CD4, CD8 α y CD8 β (Sala et al. 1993) (Tonutti et al. 1994). También se han distinguido dependiendo de su porcentaje en sangre periférica, del grado de activación o por el tipo de patología en el que aparecen (Parel et al. 2004).

Aproximadamente el 75% de las células tímicas muestran un fenotipo doble positivo expresando CD4 y las subunidades α y β del CD8 (Germain 2002). La presencia de los dos correceptores mutuamente excluyentes CD4 y CD8 en esta población celular, nos hizo pensar inicialmente en un fallo en el proceso de selección positiva y/o un origen tímico. Por ello comparamos la intensidad de fluorescencia de los linfocitos DP del paciente con la de timocitos DP de individuos sin patología aparente, observando que la población DP del paciente difería de los timocitos DP, ya que los timocitos expresan los correceptores con menor intensidad que los linfocitos simples positivos de sangre periférica.

Una revisión bibliográfica sobre la presencia de células DP en periferia mostró la existencia de dos modelos experimentales murinos con este tipo de expansiones. En el primer modelo, por la delección del "connecting peptide motif" (CPM) y en el segundo por la falta de la secuencia silenciadora del CD4, los cuales generan linfocitos T DP en periferia (Backstrom et al. 1998) (Leung et al. 2001). La evaluación de ambas posibilidades se realizó sin encontrar alteraciones, lo que sumado al fenotipo de memoria de la población DP del paciente (inusual en los linfocitos que abandonan recientemente el timo), y unos valores disminuidos de TRECS sugirió una expansión post-tímica de origen periférico.

En la clasificación de este tipo de expansiones en periferia en ausencia de linfocitosis, como es el caso que nos ocupa, se han descrito tres subgrupos; Células CD4^{hi}CD8^{lo}($\alpha\alpha$) que han sido definidas como una subpoblación de células T CD4+ completamente diferenciadas. Células CD8^{hi}($\alpha\beta$) capaces de expresar bajas cantidades de CD4. Y por último células CD4^{hi}CD8^{hi}($\alpha\beta$). La población linfocitaria aquí estudiada tiene características similares a las del último grupo, no obstante su origen es controvertido.

Desde el punto de vista del porcentaje de células DP en periferia y de la patología en la que se encuentran, han sido referidos individuos con expansiones persistentes de células doble positivas que oscilan entre un 11% y un 43% con patologías que van desde enfermedades autoinmunes, infecciones recurrentes hasta cáncer de mama e incluso sin patología aparente, como la expansión de células DP descrita en un individuo sano por Dalmaso (Kay et al. 1990). Además, infecciones por virus, como los virus linfotrópicos humanos (HTLVI-I y II), el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus Herpes simple tipo 6 son capaces de promover este tipo de expansiones en periferia (Lusso et

al. 1991). Por último, el fenotipo DP es relativamente común en la leucemia prolinfocítica T (T-PLL) encontrándose entre un 21% y un 38% de este tipo de leucemia, con expansiones de células DP que van de un 50% a un 96% de las células T. En donantes sanos existe la descripción un pequeño porcentaje de células DP, entre un 1 y un 3% (Blue et al. 1985).

La patología que presentaba el paciente en estudio difiere claramente de cualquiera de las anteriormente mencionadas. Esto junto al hecho de encontrar células DP en el órgano diana de la patología, el pulmón, nos sugería que su presencia debía de estar involucrada en el mecanismo patogénico de la enfermedad. El reclutamiento de leucocitos circulantes hacia los tejidos depende de tres procesos distintos, que son: el acoplamiento vascular de los leucocitos a la cara luminal de los vasos sanguíneos, la extravasación y la migración celular. Este mecanismo es complejo y el contacto inicial entre los leucocitos y las células endoteliales implica la unión de las integrinas a sus ligandos vasculares (Butcher et al. 1999).

Se ha descrito un aumento de expresión de la integrina CD103 en linfocitos de pacientes con ciertas patologías respiratorias, como asma y enfermedad pulmonar obstructiva, marcador que está pobremente expresado en linfocitos T de donantes sanos (Leckie et al. 2003). Por esta razón evaluamos su expresión en la población DP observando que el 45% de las células DP la expresaban en niveles intermedios y que todas las células de LBA eran positivas para el marcador. La mayor expresión de este marcador, característico de linfocitos de mucosa podría indicar una mayor tasa de recirculación de la población linfocitaria periférica hacia mucosas.

Las quimiocinas y sus receptores representan un elemento crítico en el control de la extravasación leucocitaria, ya que los leucocitos responden al gradiente quimiotáctico tras cruzar la barrera endotelial permitiendo una localización precisa de los leucocitos en el tejido (Ebert et al. 2005). En el estudio de los receptores de quimiocinas en esta población DP llamó la atención el aumento de expresión de CCR6. Su ligando (CCL20) es secretado tanto por el epitelio atípico como por el basolateral en respuesta a un estímulo inflamatorio, mostrando actividad antimicrobica contra un gran espectro de bacterias principalmente Gram negativas y respondiendo a través del sistema inmune adaptativo con la generación de un gradiente que favorece la migración de células B, T y dendríticas inmaduras al lugar de la invasión. La expresión de CCR4 y CXCR4 ligeramente aumentada en esta población nos sugería un mecanismo menos específico, ya que ambos receptores se han visto implicados en el reclutamiento de linfocitos a lugares de inflamación (Kallinich et al. 2005).

La expresión de la integrina CD103 y del receptor de quimiocinas CCR6 en la población linfoide DP y la presencia de dichas células en tejido pulmonar y en sangre periférica explicaría el tropismo de las células DP hacia el pulmón. CCR6 se expresa en subpoblaciones memoria de células T con una potencial predilección para migrar a mucosa. (Liao et al. 1999)

La expresión de las diferentes isoformas CD45RA+ y CD45RO+ de la tirosin fosfatasa CD45 en células T normales de sangre periférica, es bastante equitativa, existiendo un estado transicional CD45RA+RO+ (Clement et al. 1988). En la serie de expansiones DP descrita por Sala y colaboradores en donantes sanos, se encuentra un rango de expresión que va de una alta expresión

DISCUSIÓN

de CD45RA con una intermedia de CD45RO hasta una expresión intermedia de CD45RA con una expresión alta de CD45RO sugiriendo que estas poblaciones linfoides DP podrían quedarse “congeladas” en la transición de *naive* a memoria (Sala et al. 1993). No obstante, en una publicación posterior del mismo grupo (Tonutti et al. 1994), se concluye que las expansiones de células DP que no coexpresan CD45RA y CD45RO, tienen una alta densidad de CD45RO y nada o muy poca expresión de CD45RA.

Por otro lado, la expresión de las isoformas de CD45 en T-PLL es heterogénea. Según algunos autores esta heterogeneidad se correlaciona con la agresividad de la enfermedad encontrándose en la forma progresiva un fenotipo “memory” CD45RO+, el cual está presente raramente en el curso indolente (Matutes et al. 1991). Encontramos que el fenotipo de las células DP analizadas en este trabajo muestran exclusivamente la isoforma de memoria CD45RO. Respecto al diagnóstico diferencial de T-PLL, el presente caso no se correlacionaría con lo publicado hasta el momento, ya que en no se ha delatado una presentación leucémica.

La fracción DP de las células T en donantes sanos expresan HLA-DR, CD38 y CD71, en cambio las expansiones persistentes DP no muestran la expresión de HLA-DR, CD38, CD71 ni CD25 (Sala et al. 1993). En la serie de Tonutti se muestra que las células DP que expresan únicamente la cadena α del CD8 también expresan los marcadores de células NKs, CD56 y CD57, antígenos que pueden ser expresados por las células CD8 pero no por las CD4. Las células DP que expresan ambas cadenas del CD8 son negativas para CD56 y CD57. La expresión de los marcadores de activación (CD69, CD25, CD71, y HLA-DR) y de células NK estaba ausente en la población DP, descartando así su pertenencia a expansiones similares a las encontradas en donantes sanos. Cuando comparamos las anteriores con las poblaciones de células DP de pacientes con T-PLL y la que analizamos en este trabajo no encontramos ningún marcador que nos diferencie entre ellas, como se observa en **Tabla D-1**.

A pesar del fenotipo DP de las células T de este paciente y de la desaparición progresiva de las células simples positivas T CD4 y CD8, no ha existido evidencia clínica alguna de inmunodeficiencia durante su evolución, demostrado por la falta de infecciones oportunistas o convencionales. No obstante, conocer su funcionalidad y patrón de proliferación ante diferentes estímulos podría revelar la naturaleza y competencia de estas células.

El hecho de que las células proliferen en niveles similares o incluso superiores a un control tras ser estimuladas con anti-CD3 nos indica que no tendría porque existir anomalía alguna en las cascadas intracelulares responsables de esta proliferación. PHA y ConA son estímulos mitogénicos que hacen que su unión a N-acetilgalactosamina y a azúcares que contienen residuos a-D-mannosa o a-D-glucosa respectivamente de la célula T, den lugar a la proliferación linfocitaria (Saveriano et al. 1981). La falta de proliferación observada frente a PHA y no frente a ConA, cuando ambos son estímulos mitogénicos inespecíficos policlonales nos sugirió que un posible defecto en la glicosilación en estas células podría impedir la unión de PHA a N-acetylgalactosamina y no la unión de ConA a residuos a-D-mannosa o a- D-glucosa. Por lo que evaluamos por citometría la unión de dichos mitógenos a las células del paciente encontrando que esta unión era idéntica a la mostrada por donantes sanos. Respecto a la falta de proliferación frente a PHA no podemos considerar a esta

población completamente competente, dato similar al encontrado por Dalmaso en una expansión DP de un individuo normal (Kay et al. 1990).

	<i>LEUKEMIA 1998 M. Mizuki</i>			<i>Clinical imm and immunopatho 1994 E. Tonutti</i>		
	<i>T-PLL (SM)</i>	<i>T-PLL (ST)</i>	<i>T-PLL (RT)</i>	<i>DP Z.D.</i>	<i>DP D.W.E.</i>	<i>Paciente</i>
CD1a	1,8	10,5	<1	0	0	<1
CD2	ND	83,1	98,7	100	100	98
CD3	96,1	70,4	97,2	100	100	100
CD5	ND	ND	ND	100	100	100
CD4	91,3	55,3	85,8	100	100	93
CD8a	96	73,9	88	100	100	98,8
CD8b	83,4	55,9	79,9	100	100	98
CD7	58,6	90,1	91,5	62	86	90
CD25	87,2	32	0,1	0,5	0,8	0,6
CD11	1	30,8	9,9	16	30	99
CD16	1,5	24,9	6,5	0	2	1
CD56	0,6	29	5,7	90	12	1,3
CD57	1,9	29,2	2,3	79	8	1,9
CD45RA	82,2	41,7	8,3	95	1	2
CD45RO	97,3	65,9	87,9	46	99	97
HLA-DR	4,1	14,6	2,3	9	7	0,6
CD103	58,5	6,8	33,2	ND	ND	45
TdT	NO	NO	ND	ND	ND	NO
CD71	ND	ND	ND	0	0	10

Tabla D.1. **Tabla donde se comparan el fenotipo de superficie de poblaciones T-DP** de pacientes con T-PLL (Mizuki et al. 1998), poblaciones DP pertenecientes a expansiones persistentes (Tonutti et al. 1994) y la población del paciente objeto de estudio en nuestro trabajo. ND. No determinado.

La ausencia de proliferación frente a PHA e IL-2 recombinante sería consistente con una expresión deficiente de la cadena α del receptor de la IL-2, no obstante este requisito no se daba en estas células. Este fenómeno ya ha sido referido en células neoplásicas. Curiosamente, la primera publicación en la que se asocia un fenotipo DP con leucemia T-PLL refiere a bibliografía en la que las células neoplásicas fallan en la proliferación tras una estimulación con PHA (Kluin-Nelemans et al. 1987).

Uno de los elementos más llamativos que nos hizo considerar que la enfermedad tenía un origen inmunológico fue la dramática respuesta clínica a esteroides. No obstante, se ha constatado una resistencia de la población DP del paciente al tratamiento corticoideo, que coexiste con una estricta dependencia entre los síntomas y la dosis de corticoides. La evaluación *in vitro* de la dinámica de muerte de las células mononucleares del paciente frente a corticoides, mostró una cinética semejante a la de los DS, excepto a dosis intermedias en las que se observaba una mayor tasa de muerte en los linfocitos del paciente, efecto que podría ser debido al tratamiento que mantenía el paciente. La necesidad de un aumento en la dosis de corticoide *in vivo* se debe a un aumento en los

DISCUSIÓN

síntomas, que responde a una expansión de la población DP y no a una respuesta anómala al corticoide. De hecho, los corticoides parecen tener controlada a esta clona evitando una expansión maligna.

Funcionalmente las capacidades de esta población respondían a las características de una población CD4 debido a la expresión de CD40 ligando tras su activación, una característica de la respuesta de las células T helper (Roy 1993).

El estudio de la expresión de perforina, proteína característica de los gránulos citotóxicos de células CD8 y células NK, mostró que la población DP no tenía capacidad citotóxica lo que sugiere que esta población de células DP actúa funcionalmente como células CD4 T helper.

Existen dos estudios realizados por el grupo de Colombatti de series de pacientes con expansiones persistentes de células DP en ausencia de linfocitosis o de un desorden linfoproliferativo abierto. En ellos el análisis del reordenamiento de la cadena $V\beta$ del TCR muestra la presencia tanto de poblaciones monoclonales, oligoclonales, como policlonales. En este caso se realizó el análisis del reordenamiento de la cadena β y γ del TCR encontrándose un componente clonal mayoritario, que no había sido detectado previamente y que mayoritariamente pertenecía a la familia $V\beta 13.1$, junto a otros dos minoritarios de las familias $V\beta 6.1$ y $V\beta 6.3$. Este hallazgo nos hizo contemplar otras posibilidades de diagnóstico diferencial como es la leucemia pro-linfocítica T (T-PLL), sin tener la evidencia clínica de un proceso neoplásico en el paciente, por la falta de organomegalia y linfadenopatías, sin una marcada linfocitosis, que a menudo excede las 100×10^9 células/L en T-PLL, y con una morfología citológica normal (Dearden 2006).

Lo que nos llevó a hacer un estudio citogenético convencional en esta población linfocitaria sin obtener datos conclusivos, por lo que realizamos un cariotipo espectral multicolor (SKY) que permite caracterizar correctamente translocaciones complejas, mostrando el cromosoma anómalo con los colores de los cromosomas que intervienen en la translocación. Entre las alteraciones que se muestran en el cariotipo del paciente en estudio llama la atención la presencia del punto de rotura 11q23, aberración que se encuentra típicamente en pacientes con Ataxia Telangiectasia que tienen inactivación bi-alélica del gen mutado (ATM) localizado en este (Yuille et al. 1998). Algunos de estos pacientes tienen proliferaciones clonales anormales de células T, con morfología, rasgos inmunológicos, citogenéticos y moleculares similares a T-PLL pero sin linfocitosis u otros rasgos de malignidad. Llamativamente, una proporción elevada de estos casos desarrolla T-PLL, sugiriendo que los rasgos descritos anteriormente representan una fase pre-leucémica (Taylor et al. 1996).

Translocaciones cromosómicas implicando la región 14q32.1 y ocasionalmente Xq28 se encuentran también en T-PLL (Krishnan et al. 2006). Se han observado translocaciones idénticas en pacientes con A-T y T-PLL, en pacientes con A-T y proliferaciones clonales no leucémicas y en pacientes con T-PLL sin A-T, lo cual sugiere que debe existir un mecanismo común para los estados de iniciación de esta forma de leucemia.

Existen tres genes vinculados a estas regiones de rotura cromosómica, los sitios de rotura 11q23 y Xq28 donde están localizados los genes ATM y MTC1-1 respectivamente y el 14q32 donde está localizado el gen TCL1 y su homólogo TML1 (Chun et al. 2002). Los puntos de rotura 11q23 y Xq28 están presentes en esta población y son idénticos a los que se observan en pacientes con A-T y

T-PLL. El 10% de los pacientes con A-T homocigotos en ATM con proliferaciones clonales no leucémicas posteriormente desarrollan una proliferación maligna (Taylor et al. 1996). Por todo ello, se considera que ATM es un gen supresor de tumores implicado en la patogénesis de proliferaciones no leucémicas que desarrollan finalmente una leucemia T-PLL franca.

La población analizada muestra puntos de rotura cromosómica implicando al cromosoma 14q11.2. No obstante, la falta del punto de rotura 14q32, el cual se encuentra ligado al gen TCL-1 y a su homólogo TML-1 podría justificar la falta de malignidad en las células DP, ya que ha sido implicado en la generación de malignidad en presencia de mutaciones en ATM (Chun et al. 2002). Por lo que lo más probable es que exista un grupo de oncogenes y genes supresores de tumores que en distintas combinaciones puedan generar una T-PLL. El hallazgo de anomalías cromosómicas similares en las células de este paciente nos sugiere una predisposición a desarrollar un proceso neoplásico en el futuro.

La coexpresión de los receptores CD4 y CD8 en las células T de este paciente, las anomalías cromosómicas implicando al cromosoma 11, X y la presencia del isocromosoma 8q10 son altamente sugestiva de T-PLL. Se han distinguido dos tipos de presentación de T-PLL, la típicamente progresiva con un curso agresivo y la que es precedida por un curso clínico indolente con moderada leucocitosis y que tras esta fase que tiene una media de 33 meses de duración progresa a un estado agresivo similar a la primera (Garand et al. 1998). Lo que ha sugerido que un estado silente preleucémico podría preceder a muchos casos de T-PLL esporádica, similar a lo que ocurre en los casos de AT. No obstante, no existe ninguna asociación entre la presentación de la enfermedad y el fenotipo concreto de la expansión sea CD4, CD8 o DP.

La afectación en epitelio es un dato muy llamativo en este paciente, ya que esta implicación cutánea se suma a la del epitelio respiratorio. Las manifestaciones en la piel no son infrecuentes en T-PLL encontrándose en el 20% de los pacientes, la histología de la piel en T-PLL es muy característica mostrando infiltración en dermis, preferencialmente alrededor de apéndices y epidermis descamativa (Krishnan et al. 2006). Demostrada la clonalidad de las células DP y con la presencia de lesiones descamativas generalizadas en la piel de las manos, quisimos descartar una posible variante linfoproliferativa cutánea. Las moléculas de adhesión y los receptores de quimiocinas están implicados en la atracción específica de células T hacia la piel mostrando un importante rol en la patofisiología de los linfomas cutáneos, es el caso de la expresión de CCR4, CCR10 y CCR7 en células clonales en el síndrome de Sézary (Sokolowska-Wojdylo et al. 2005). De la misma forma nuestros resultados confirman el concepto de que los receptores de quimiocinas tienen gran importancia en la patofisiología que ha desencadenado en este caso un síndrome de BOOP, sugiriendo que un clon de células en la sangre periférica con un determinado patrón de estos receptores puede generar una clínica determinada.

El síndrome BOOP es un hallazgo patológico caracterizado por la presencia de tejido de granulación dentro de la luz distal de los espacios aéreos. Este patrón patológico refleja un tipo de proceso inflamatorio generado por un daño en el pulmón (Ryu et al. 2003). Puede ser producido por una gran variedad de procesos inmunológicos y/o inflamatorios, incluidos los asociados con enfermedades autoinmunes, infecciones, reacciones de hipersensibilidad, síndromes mielodisplásicos

DISCUSIÓN

y los desencadenados por tratamientos con gran variedad de drogas o agentes físicos. Se han descrito asociaciones entre leucemia indolente secundaria a una infección por HTLV-1 y BOOP, en las cuales el proceso linfoproliferativo y/o leucémico previamente descrito genera un síndrome BOOP como una complicación tardía (Matsuo et al. 2000) (Battistini et al. 1997).

No obstante, el caso aquí estudiado se inicia con clínica y diagnóstico de BOOP y posteriormente se encuentra como probable agente causal una proliferación persistente de células DP. Como se ha resaltado previamente, el estudio de esta población presente en sangre periférica y en LBA muestra unas características fenotípicas similares a las de células leucémicas en T-PLL pero sin manifestaciones clínicas de malignidad.

Aunque en los estudios realizados sobre proliferaciones de células DP en periferia no se ha profundizado en el defecto molecular que lleva a la coexpresión de CD4 y CD8, pensamos que en el caso aquí analizado algunas de las aberraciones cromosómicas podría afectar a mecanismos implicados en selección de los correceptores CD4 y CD8 haciendo que finalmente se coexpresen en este tipo de linfoproliferaciones.

CONCLUSIONES

Las IDP han pasado de ser consideradas enfermedades inusuales, de mal pronóstico y típicamente infantiles, a cuadros clínicos relativamente comunes, que cuando se buscan surgen implicadas en procesos infecciosos crónicos, recidivantes o por gérmenes poco frecuentes. La aparición de las manifestaciones en edades adultas es cada vez más común y esto es posible a que la identificación de formas menos graves es cada vez más habitual.

Inmunodeficiencias primarias monogénicas

1- Hemos descrito una nueva mutación Gln-103-STOP (Q103X) en el dominio PH de la proteína Btk, con una correlación completa entre el genotipo, expresión proteica y fenotipo clínico. La aproximación por métodos bioquímicos y funcionales proporciona un diagnóstico rápido, imprescindible para aplicar un tratamiento precoz, como se ha llevado a cabo en los pacientes con XLA, Déficit de ADA y Enfermedad Granulomatosa Crónica estudiados en esta Tesis.

Síndrome de hiper IgM

2- El Síndrome de hiper IgM incluye una serie de defectos moleculares que afectan directa o indirectamente al linaje B. Los dos casos con hiper IgM descritos en esta Tesis muestran la ausencia de células B memoria IgM+CD27+, lo que nos permite caracterizarlos dentro del grupo HIGM4.

Síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS)

3- Hemos descrito dos familias (A y B) con diferentes mutaciones que afectan al residuo 234 de la proteína FAS, las cuales se correlacionan con una apoptosis vía Fas disminuida, con la presencia de células DNT y con una penetrancia clínica variable, lo que nos permite definir las como ALPS tipo Ia. El resto de los pacientes, sin mutaciones en Fas, muestran alteraciones funcionales en la apoptosis vía Fas, lo que sugiere que otros defectos en las vías implicadas en apoptosis pueden ser los responsables de la patología y los clasificamos en el grupo de ALPS III.

Población doble positiva en un paciente con patología respiratoria

4- Existen situaciones en las que grandes alteraciones en poblaciones linfocitarias no siempre conllevan una clínica de IDP. Las características de la población DP estudiada indican que fenotípicamente se trata de una población T CD3CD4CD $\alpha\beta$, que funcionalmente pertenecen a la estirpe de células T colaboradoras CD4. La expresión de la integrina CD103 y del receptor de quimiocinas CCR6 en la población DP y su presencia en

CONCLUSIONES

el órgano diana de la enfermedad, justifican su tropismo a mucosa pulmonar y relacionan dicha población con la patología respiratoria.

5- La clonalidad de las cadenas β y γ del TCR, junto a las alteraciones cromosómicas encontradas en la población DP sugieren un estado preleucémico en esta población, que requeriría alteraciones genéticas adicionales para desarrollar un proceso neoplásico franco. El distinto patrón citogenético en el cromosoma 14, respecto a las T-PLL sugiere que el punto de rotura 14q32 podría estar relacionado con el desarrollo de malignidad.

6- Los resultados de esta Tesis muestran que la complejidad de las patologías que afectan al sistema inmunológico, requiere técnicas cada vez más innovadoras y específicas para determinar los defectos responsables de un fenotipo concreto. El estudio genético, molecular y funcional sistemático de estas enfermedades permite diagnosticar y clasificar entidades ya descritas, así como abordar el diagnóstico de nuevas patologías.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- (1993). "Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP): use of vaccines and immune globulins for persons with altered immunocompetence." MMWR Recomm Rep **42**(RR-4): 1-18.
- (1999). "Primary immunodeficiency diseases. Report of an IUIS Scientific Committee. International Union of Immunological Societies." Clin Exp Immunol **118 Suppl 1**: 1-28.

A

- Acuto, O., et al. (2000). "T cell activation and the cytoskeleton." Annu Rev Immunol **18**: 165-84.
- Agematsu, K., et al. (1997). "B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production." Eur J Immunol **27**(8): 2073-9.
- Allen, J. N., et al. (1989). "HIV-associated bronchiolitis obliterans organizing pneumonia." Chest **96**(1): 197-8.
- Allen, R. C., et al. (1993). "CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome." Science **259**(5097): 990-3.
- Ambruso, D. R., et al. (2000). "Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4654-9.
- Anderson, W. F., et al. (1990). "The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol, July 6, 1990." Hum Gene Ther **1**(3): 331-62.
- Arkwright, P. D., et al. (1998). "X linked lymphoproliferative disease in a United Kingdom family." Arch Dis Child **79**(1): 52-5.
- Aruffo, A., et al. (1993). "The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome." Cell **72**(2): 291-300.
- Azzara, A., et al. (2003). "Lithium effects on neutrophil motility in Shwachman-Diamond syndrome: evaluation by computer-assisted image analysis." Br J Haematol **123**(2): 369-70.

B

- Backstrom, B. T., et al. (1998). "Positive selection through a motif in the alphabeta T cell receptor." Science **281**(5378): 835-8.
- Behrmann, I., et al. (1994). "Structure of the human APO-1 gene." Eur J Immunol **24**(12): 3057-62.
- Bell, D., et al. (1999). "Dendritic cells." Adv Immunol **72**: 255-324.
- Benkerrou, M., et al. (1997). "Correction of Fas (CD95) deficiency by haploidentical bone marrow transplantation." Eur J Immunol **27**(8): 2043-7.
- Bettinardi, A., et al. (1997). "Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis." Blood **89**(3): 902-9.
- Bhushan, A., et al. (2001). "CD40:CD40L interactions in X-linked and non-X-linked hyper-IgM syndromes." Immunol Res **24**(3): 311-24.
- Blackburn, M. R., et al. (2005). "Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation." Adv Immunol **86**: 1-41.
- Blaese, R. M. (1993). "Development of gene therapy for immunodeficiency: adenosine deaminase deficiency." Pediatr Res **33**(1 Suppl): S49-53; discussion S53-5.
- Bleesing, J. J., et al. (2001). "TcR-alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-glycan biosynthesis." Clin Immunol **100**(3): 314-24.
- Blue, M. L., et al. (1985). "Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry." J Immunol **134**(4): 2281-6.
- Bonilla, F. A., et al. (2003). "12. Primary immunodeficiency diseases." J Allergy Clin Immunol **111**(2 Suppl): S571-81.
- Boocock, G. R., et al. (2003). "Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome." Nat Genet **33**(1): 97-101.
- Bordigoni, P., et al. (1998). "Bone marrow transplantation as treatment for X-linked immunodeficiency with hyper-IgM." Bone Marrow Transplant **22**(11): 1111-4.
- Borriello, F., et al. (1997). "B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation." Immunity **6**(3): 303-13.

REFERENCIAS

- Brandau, O., et al. (1999). "Epstein-Barr virus-negative boys with non-Hodgkin lymphoma are mutated in the SH2D1A gene, as are patients with X-linked lymphoproliferative disease (XLP)." *Hum Mol Genet* **8**(13): 2407-13.
- Bromley, S. K., et al. (2001). "The immunological synapse and CD28-CD80 interactions." *Nat Immunol* **2**(12): 1159-66.
- Brunner, T., et al. (1995). "Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas." *Nature* **373**(6513): 441-4.
- Bruton, O. C. (1952). "Agammaglobulinemia." *Pediatrics* **9**(6): 722-8.
- Buckley, C. R. (1998). "Agammaglobulinemia, by Col. Ogden C. Bruton, MC, USA, Pediatrics, 1952;9:722-728." *Pediatrics* **102**(1 Pt 2): 213-5.
- Buckley, R. H., et al. (1968). "Serum immunoglobulins. I. Levels in normal children and in uncomplicated childhood allergy." *Pediatrics* **41**(3): 600-11.
- Buckley, R. H., et al. (1968). "Serum immunoglobulins. II. Levels in children subject to recurrent infection." *Pediatrics* **42**(1): 50-60.
- Buckley, R. H., et al. (1997). "Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants." *J Pediatr* **130**(3): 378-87.
- Buckley, R. H., et al. (1999). "Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency." *N Engl J Med* **340**(7): 508-16.
- Bunk, R., et al. (2006). "Rapid whole blood flow cytometric test to detect ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency." *Int Arch Allergy Immunol* **140**(4): 342-4.
- Butcher, E. C., et al. (1999). "Lymphocyte trafficking and regional immunity." *Adv Immunol* **72**: 209-53.

C

- Campana, D., et al. (1990). "Phenotypic features and proliferative activity of B cell progenitors in X-linked agammaglobulinemia." *J Immunol* **145**(6): 1675-80.
- Canale, V. C., et al. (1967). "Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma." *J Pediatr* **70**(6): 891-9.
- Casimir, C. M., et al. (1991). "Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by deletion at a dinucleotide repeat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(7): 2753-7.
- Catovsky, D., et al. (2004). "The WHO classification of mature T-cell leukemias." *Blood* **104**(9): 2989-90; author reply 2990.
- Chan, F. K. (2000). "The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function." *Ann Rheum Dis* **59** Suppl 1: i50-3.
- Chapel, H., et al. (2003). "Primary immunodeficiency diseases: an update." *Clin Exp Immunol* **132**(1): 9-15.
- Chen, L. (2004). "Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity." *Nat Rev Immunol* **4**(5): 336-47.
- Cheng, J., et al. (1995). "Characterization of human Fas gene. Exon/intron organization and promoter region." *J Immunol* **154**(3): 1239-45.
- Chien, J., et al. (1990). "Cytomegalovirus pneumonia in allogeneic bone marrow transplantation. An immunopathologic process?" *Chest* **98**(4): 1034-7.
- Chomczynski, P., et al. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Chun, H. H., et al. (2002). "TCL-1, MTC-1 and TML-1 gene expression profile in non-leukemic clonal proliferations associated with ataxia-telangiectasia." *Int J Cancer* **97**(6): 726-31.
- Chun, H. J., et al. (2001). "Autoimmune lymphoproliferative syndrome: types I, II and beyond." *Adv Exp Med Biol* **490**: 49-57.
- Chun, H. J., et al. (2002). "Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency." *Nature* **419**(6905): 395-9.
- Cigudosa, J. C., et al. (2003). "De novo erythroleukemia chromosome features include multiple rearrangements, with special involvement of chromosomes 11 and 19." *Genes Chromosomes Cancer* **36**(4): 406-12.
- Clement, L. T., et al. (1988). "The functionally distinct subpopulations of human CD4+ helper/inducer T lymphocytes defined by anti-CD45R antibodies derive sequentially from a differentiation pathway that is regulated by activation-dependent post-thymic differentiation." *J Immunol* **141**(5): 1464-70.
- Clevers, H., et al. (1988). "The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble." *Annu Rev Immunol* **6**: 629-62.

- Coffey, A. J., et al. (1998). "Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene." *Nat Genet* **20**(2): 129-35.
- Colby, T. V. (1992). "Pathologic aspects of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia." *Chest* **102**(1 Suppl): 38S-43S.
- Colombatti, A., et al. (1998). "Age-related persistent clonal expansions of CD28(-) cells: phenotypic and molecular TCR analysis reveals both CD4(+) and CD4(+)CD8(+) cells with identical CDR3 sequences." *Clin Immunol Immunopathol* **89**(1): 61-70.
- Conley, M. E. (1985). "B cells in patients with X-linked agammaglobulinemia." *J Immunol* **134**(5): 3070-4.
- Conley, M. E., et al. (1999). "Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies)." *Clin Immunol* **93**(3): 190-7.
- Cordier, J. F. (1993). "Cryptogenic organizing pneumonitis. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia." *Clin Chest Med* **14**(4): 677-92.
- Costabel, U., et al. (1991). "BOOP: what is old, what is new?" *Eur Respir J* **4**(7): 771-3.
- Costabel, U., et al. (1992). "Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP): the cytological and immunocytological profile of bronchoalveolar lavage." *Eur Respir J* **5**(7): 791-7.
- Costabel, U., et al. (1992). "BOOP in Europe." *Chest* **102**(1 Suppl): 14S-20S.
- Crockard, A. D., et al. (1997). "Diagnosis and carrier detection of chronic granulomatous disease in five families by flow cytometry." *Int Arch Allergy Immunol* **114**(2): 144-52.

D

- Davignon, J. L., et al. (1985). "Functional analysis of T cell subsets from mice bearing the lpr gene." *J Immunol* **135**(4): 2423-8.
- De La Calle-Martin, O., et al. (1997). "B cells and monocytes are not developmentally affected in a case of reticular dysgenesis." *Clin Exp Immunol* **110**(3): 392-6.
- De Meester, I., et al. (1994). "Binding of adenosine deaminase to the lymphocyte surface via CD26." *Eur J Immunol* **24**(3): 566-70.
- Dearden, C. E. (2006). "T-cell prolymphocytic leukemia." *Med Oncol* **23**(1): 17-22.
- Dekker, J., et al. (2001). "Gene-scan method for the recognition of carriers and patients with p47(phox)-deficient autosomal recessive chronic granulomatous disease." *Exp Hematol* **29**(11): 1319-25.
- Del-Rey, M., et al. (2006). "A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome." *Blood* **108**(4): 1306-12.
- Detkova, D., et al. (2007). "Common Variable Immunodeficiency: Association Between Memory B Cells and Lung Diseases." *Chest* **131**(6): 1883-1889.
- Dianzani, U., et al. (1997). "Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation." *Blood* **89**(8): 2871-9.
- Dianzani, U., et al. (2003). "Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity." *Life Sci* **72**(25): 2803-24.
- DiSanto, J. P., et al. (1993). "CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM." *Nature* **361**(6412): 541-3.
- Donda, A., et al. (1996). "Identification and characterization of a human CD4 silencer." *Eur J Immunol* **26**(2): 493-500.
- Drappa, J., et al. (1996). "Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity." *N Engl J Med* **335**(22): 1643-9.
- Dror, Y., et al. (2002). "Shwachman-diamond syndrome." *Br J Haematol* **118**(3): 701-13.
- Durandy, A., et al. (2001). "Human genetic defects in class-switch recombination (hyper-IgM syndromes)." *Curr Opin Immunol* **13**(5): 543-8.
- Durandy, A., et al. (1993). "Induction by anti-CD40 antibody or soluble CD40 ligand and cytokines of IgG, IgA and IgE production by B cells from patients with X-linked hyper IgM syndrome." *Eur J Immunol* **23**(9): 2294-9.

E

- Ebert, L. M., et al. (2005). "Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues." *Mol Immunol* **42**(7): 799-809.

REFERENCIAS

- Ebisu, K., et al. (2001). "Fused p47phox and p67phox truncations efficiently reconstitute NADPH oxidase with higher activity and stability than the individual components." J Biol Chem **276**(27): 24498-505.
- Ellmeier, W., et al. (1999). "The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development." Annu Rev Immunol **17**: 523-54.

F

- Facchetti, F., et al. (1995). "Immunohistologic analysis of ineffective CD40-CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Abortive germinal center cell reaction and severe depletion of follicular dendritic cells." J Immunol **154**(12): 6624-33.
- Ferguson, T. A., et al. (2006). "A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later." Immunol Rev **213**: 228-38.
- Ferrari, G., et al. (1992). "Transfer of the ADA gene into human ADA-deficient T lymphocytes reconstitutes specific immune functions." Blood **80**(5): 1120-4.
- Ferrari, S., et al. (2001). "Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12614-9.
- Fiorini, M., et al. (2004). "BTK: 22 novel and 25 recurrent mutations in European patients with X-linked agammaglobulinemia." Hum Mutat **23**(3): 286.
- Fischer, M. B., et al. (1998). "Dependence of germinal center B cells on expression of CD21/CD35 for survival." Science **280**(5363): 582-5.
- Fisher, G. H., et al. (1995). "Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome." Cell **81**(6): 935-46.
- Foster, C. B., et al. (1998). "Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease." J Clin Invest **102**(12): 2146-55.
- Fraser, J. D., et al. (1991). "Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28." Science **251**(4991): 313-6.
- Fudenberg, H., et al. (1971). "Primary immunodeficiencies. Report of a World Health Organization Committee." Pediatrics **47**(5): 927-46.
- Fuleihan, R., et al. (1994). "Decreased expression of the ligand for CD40 in newborn lymphocytes." Eur J Immunol **24**(8): 1925-8.
- Fuleihan, R., et al. (1994). "Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes." J Clin Invest **93**(3): 1315-20.
- Fuleihan, R., et al. (1993). "Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2170-3.
- Fuss, I. J., et al. (1997). "Characteristic T helper 2 T cell cytokine abnormalities in autoimmune lymphoproliferative syndrome, a syndrome marked by defective apoptosis and humoral autoimmunity." J Immunol **158**(4): 1912-8.
- Futatani, T., et al. (1998). "Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection." Blood **91**(2): 595-602.

G

- Garand, R., et al. (1998). "Indolent course as a relatively frequent presentation in T-prolymphocytic leukaemia. Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire." Br J Haematol **103**(2): 488-94.
- Gaston, H. (1993). "Synovial lymphocytes and the aetiology of synovitis." Ann Rheum Dis **52** **Suppl 1**: S17-21.
- Germain, R. N. (2002). "T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision." Nat Rev Immunol **2**(5): 309-22.
- Giblett, E. R., et al. (1972). "Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity." Lancet **2**(7786): 1067-9.
- Giese, T., et al. (1995). "In CD8+ T cell-deficient lpr/lpr mice, CD4+B220+ and CD4+B220- T cells replace B220+ double-negative T cells as the predominant populations in enlarged lymph nodes." J Immunol **154**(10): 4986-95.
- Ginzberg, H., et al. (1999). "Shwachman syndrome: phenotypic manifestations of sibling sets and isolated cases in a large patient cohort are similar." J Pediatr **135**(1): 81-8.

- Goldblatt, D. (2002). "Current treatment options for chronic granulomatous disease." Expert Opin Pharmacother **3**(7): 857-63.
- Gompels, M. M., et al. (2003). "Lymphoproliferative disease in antibody deficiency: a multi-centre study." Clin Exp Immunol **134**(2): 314-20.
- Gong, J. H., et al. (1994). "Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells." Leukemia **8**(4): 652-8.
- Goobie, S., et al. (2001). "Shwachman-Diamond syndrome with exocrine pancreatic dysfunction and bone marrow failure maps to the centromeric region of chromosome 7." Am J Hum Genet **68**(4): 1048-54.
- Gorlach, A., et al. (1997). "A p47-phox pseudogene carries the most common mutation causing p47-phox- deficient chronic granulomatous disease." J Clin Invest **100**(8): 1907-18.
- Green, S. P., et al. (2001). "Induction of gp91-phox, a component of the phagocyte NADPH oxidase, in microglial cells during central nervous system inflammation." J Cereb Blood Flow Metab **21**(4): 374-84.
- Grimbacher, B., et al. (2003). "Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency." Nat Immunol **4**(3): 261-8.
- Gross, T. G., et al. (1996). "Cure of X-linked lymphoproliferative disease (XLP) with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT): report from the XLP registry." Bone Marrow Transplant **17**(5): 741-4.
- Gu, Y., et al. (2001). "Biochemical and biological characterization of a human Rac2 GTPase mutant associated with phagocytic immunodeficiency." J Biol Chem **276**(19): 15929-38.
- Guillet, M., et al. (2002). "Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction." J Immunol **168**(10): 5088-95.

H

- Hadley, G. A., et al. (1999). "Regulation of the epithelial cell-specific integrin, CD103, by human CD8+ cytolytic T lymphocytes." Transplantation **67**(11): 1418-25.
- Hague, R. A., et al. (1994). "Early diagnosis of severe combined immunodeficiency syndrome." Arch Dis Child **70**(4): 260-3.
- Harbord, M., et al. (2003). "Association between p47phox pseudogenes and inflammatory bowel disease." Blood **101**(8): 3337.
- Harrington, D. S., et al. (1987). "Malignant lymphoma in the X-linked lymphoproliferative syndrome." Cancer **59**(8): 1419-29.
- Hashimoto, A., et al. (2000). "Cutting edge: essential role of phospholipase C-gamma 2 in B cell development and function." J Immunol **165**(4): 1738-42.
- Hashimoto, S., et al. (1996). "Identification of Bruton's tyrosine kinase (Btk) gene mutations and characterization of the derived proteins in 35 X-linked agammaglobulinemia families: a nationwide study of Btk deficiency in Japan." Blood **88**(2): 561-73.
- Heelan, B. T., et al. (2002). "Effect of anti-CD20 (rituximab) on resistant thrombocytopenia in autoimmune lymphoproliferative syndrome." Br J Haematol **118**(4): 1078-81.
- Hehner, S. P., et al. (2000). "Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool." J Immunol **165**(8): 4319-28.
- Heltzer, M., et al. (2002). "Diminished T cell numbers in patients with chronic granulomatous disease." Clin Immunol **105**(3): 273-8.
- Herling, M., et al. (2004). "A systematic approach to diagnosis of mature T-cell leukemias reveals heterogeneity among WHO categories." Blood **104**(2): 328-35.
- Hershfield, M. S. (1998). "Adenosine deaminase deficiency: clinical expression, molecular basis, and therapy." Semin Hematol **35**(4): 291-8.
- Hershfield, M. S. (2003). "Genotype is an important determinant of phenotype in adenosine deaminase deficiency." Curr Opin Immunol **15**(5): 571-7.
- Heyworth, P. G., et al. (2003). "Chronic granulomatous disease." Curr Opin Immunol **15**(5): 578-84.
- Heyworth, P. G., et al. (2001). "Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (second update)." Blood Cells Mol Dis **27**(1): 16-26.
- Heyworth, P. G., et al. (2002). "Identification of a novel NCF-1 (p47-phox) pseudogene not containing the signature GT deletion: significance for A47 degrees chronic granulomatous disease carrier detection." Blood **100**(5): 1845-51.
- Hirschhorn, R., et al. (1994). "An Asp8Asn substitution results in the adenosine deaminase (ADA) genetic polymorphism (ADA 2 allozyme): occurrence on different chromosomal backgrounds and apparent intragenic crossover." Ann Hum Genet **58**(Pt 1): 1-9.

REFERENCIAS

- Hirschhorn, R., et al. (1994). "Somatic mosaicism for a newly identified splice-site mutation in a patient with adenosine deaminase-deficient immunodeficiency and spontaneous clinical recovery." Am J Hum Genet **55**(1): 59-68.
- Ho, G., Jr. (1992). "Bacterial arthritis." Curr Opin Rheumatol **4**(4): 509-15.
- Hockenhull, E. L., et al. (1999). "A complete physical contig and partial transcript map of the Williams syndrome critical region." Genomics **58**(2): 138-45.
- Holland, S. M. (2003). "Update on phagocytic defects." Pediatr Infect Dis J **22**(1): 87-8.
- Holzelova, E., et al. (2004). "Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations." N Engl J Med **351**(14): 1409-18.
- Howard, V., et al. (2003). "Stem cell transplants for patients with X-linked agammaglobulinemia." Clin Immunol **107**(2): 98-102.
- Huang, B., et al. (1996). "NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain." Nature **384**(6610): 638-41.
- Hutchcroft, J. E., et al. (1995). "Phorbol ester treatment inhibits phosphatidylinositol 3-kinase activation by, and association with, CD28, a T-lymphocyte surface receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8808-12.

I

- Imai, K., et al. (2003). "Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination." Nat Immunol **4**(10): 1023-8.
- Inazawa, J., et al. (1992). "Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1." Genomics **14**(3): 821-2.
- Iwata, M., et al. (1994). "Homologous dinucleotide (GT or TG) deletion in Japanese patients with chronic granulomatous disease with p47-phox deficiency." Biochem Biophys Res Commun **199**(3): 1372-7.

J

- Jabara, H., et al. (2002). "The binding site for TRAF2 and TRAF3 but not for TRAF6 is essential for CD40-mediated immunoglobulin class switching." Immunity **17**(3): 265-76.
- Jackson, C. E., et al. (1999). "Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance." Am J Hum Genet **64**(4): 1002-14.
- Jackson, C. E., et al. (1999). "Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis." Curr Opin Pediatr **11**(6): 521-7.
- Jain, A., et al. (2001). "Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohydrotic ectodermal dysplasia." Nat Immunol **2**(3): 223-8.
- Jones, O. T. (1994). "The regulation of superoxide production by the NADPH oxidase of neutrophils and other mammalian cells." Bioessays **16**(12): 919-23.

K

- Kalman, L., et al. (2004). "Mutations in genes required for T-cell development: IL7R, CD45, IL2RG, JAK3, RAG1, RAG2, ARTEMIS, and ADA and severe combined immunodeficiency: HuGE review." Genet Med **6**(1): 16-26.
- Kasahara, Y., et al. (1998). "Novel Fas (CD95/APO-1) mutations in infants with a lymphoproliferative disorder." Int Immunol **10**(2): 195-202.
- Kato, Z., et al. (2003). "IgG2, IgG4 and IgA deficiency possibly associated with carbamazepine treatment." Eur J Pediatr **162**(3): 209-11.
- Kaufmann, W. K., et al. (1994). "G1 arrest and cell-cycle-dependent clastogenesis in UV-irradiated human fibroblasts." Mutat Res **314**(1): 67-76.
- Kavli, B., et al. (2005). "B cells from hyper-IgM patients carrying UNG mutations lack ability to remove uracil from ssDNA and have elevated genomic uracil." J Exp Med **201**(12): 2011-21.
- Kawakami, Y., et al. (1999). "Functions of Bruton's tyrosine kinase in mast and B cells." J Leukoc Biol **65**(3): 286-90.
- Kay, N. E., et al. (1990). "Expansion of a lymphocyte population co-expressing T4 (CD4) and T8 (CD8) antigens in the peripheral blood of a normal adult male." Blood **75**(10): 2024-9.
- Kellerer, K., et al. (1976). "[Chronic pseudomalignant immunoproliferation (Canale-Smith syndrome) (author's transl)]." Eur J Pediatr **121**(3): 203-13.

- Kitchen, S. G., et al. (2002). "Activation of CD8 T cells induces expression of CD4, which functions as a chemotactic receptor." Blood **99**(1): 207-12.
- Kluin-Nelemans, H. C., et al. (1987). "T-cell prolymphocytic leukemia with an unusual phenotype CD4+ CD8+." Cancer **60**(4): 794-803.
- Korthauer, U., et al. (1993). "Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM." Nature **361**(6412): 539-41.
- Krishnan, B., et al. (2006). "Prolymphocytic leukemias." Semin Oncol **33**(2): 257-63.
- Kristufek, D., et al. (2007). "Characterization of novel Bruton's tyrosine kinase gene mutations in Central European patients with agammaglobulinemia." Mol Immunol **44**(7): 1639-43.
- Kuhns, M. S., et al. (2006). "Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex." Immunity **24**(2): 133-9.
- Kurosaki, T., et al. (2000). "Regulation of the phospholipase C-gamma2 pathway in B cells." Immunol Rev **176**: 19-29.

L

- Lahdenpohja, N., et al. (1998). "Pre-exposure to oxidative stress decreases the nuclear factor-kappa B-dependent transcription in T lymphocytes." J Immunol **160**(3): 1354-8.
- Lane, P., et al. (1992). "Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes." Eur J Immunol **22**(10): 2573-8.
- Lee, W. I., et al. (2005). "Molecular analysis of a large cohort of patients with the hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome." Blood **105**(5): 1881-90.
- Leishman, A. J., et al. (2001). "T cell responses modulated through interaction between CD8alpha and the nonclassical MHC class I molecule, TL." Science **294**(5548): 1936-9.
- Lenardo, M., et al. (1999). "Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment." Annu Rev Immunol **17**: 221-53.
- Leung, R. K., et al. (2001). "Deletion of the CD4 silencer element supports a stochastic mechanism of thymocyte lineage commitment." Nat Immunol **2**(12): 1167-73.
- Lewin, S. R., et al. (2002). "Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations." Blood **100**(6): 2235-42.
- Liao, F., et al. (1999). "CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha." J Immunol **162**(1): 186-94.
- Lim, M. S., et al. (1998). "Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome." Am J Pathol **153**(5): 1541-50.
- Lindvall, J. M., et al. (2005). "Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling." Immunol Rev **203**: 200-15.
- Lopatin, U., et al. (2001). "Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with disease expression." Blood **97**(10): 3161-70.
- Lusso, P., et al. (1991). "Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6." Nature **349**(6309): 533-5.

M

- MacLennan, I. C. (1994). "Germinal centers." Annu Rev Immunol **12**: 117-39.
- Maizels, N. (2005). "Immunoglobulin gene diversification." Annu Rev Genet **39**: 23-46.
- Mamishi, S., et al. (2005). "A case of invasive aspergillosis in CGD patient successfully treated with Amphotericin B and INF-gamma." Ann Clin Microbiol Antimicrob **4**: 4.
- Markin, R. S., et al. (1987). "Hepatitis in fatal infectious mononucleosis." Gastroenterology **93**(6): 1210-7.
- Martinez-Lostao, L., et al. (2005). "Role of the STAT1 pathway in apoptosis induced by fludarabine and JAK kinase inhibitors in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Leuk Lymphoma **46**(3): 435-42.
- Matutes, E., et al. (1991). "Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia." Blood **78**(12): 3269-74.
- McFarland, R. D., et al. (2000). "Identification of a human recent thymic emigrant phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4215-20.

REFERENCIAS

- Meier, B., et al. (1991). "Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts." Biochem J **275** (Pt 1): 241-5.
- Meinl, E., et al. (2000). "Differential requirement of ZAP-70 for CD2-mediated activation pathways of mature human T cells." J Immunol **165**(7): 3578-83.
- Miyano, K., et al. (2001). "A fusion protein between rac and p67phox (1-210) reconstitutes NADPH oxidase with higher activity and stability than the individual components." Biochemistry **40**(46): 14089-97.
- Mizuki, M., et al. (1998). "Phenotypical heterogeneity of CD4+CD8+ double-positive chronic T lymphoid leukemia." Leukemia **12**(4): 499-504.
- Monforte-Munoz, H., et al. (2003). "Epstein-Barr virus-associated leiomyomatosis and posttransplant lymphoproliferative disorder in a child with severe combined immunodeficiency: case report and review of the literature." Pediatr Dev Pathol **6**(5): 449-57.
- Muramatsu, M., et al. (2000). "Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme." Cell **102**(5): 553-63.
- Muramatsu, M., et al. (1999). "Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells." J Biol Chem **274**(26): 18470-6.

N

- Nagata, K., et al. (1997). "The Ig alpha/Igbeta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation." Immunity **7**(4): 559-70.
- Nagata, S., et al. (1995). "The Fas death factor." Science **267**(5203): 1449-56.
- Naides, S. J. (1995). "Viral arthritis including HIV." Curr Opin Rheumatol **7**(4): 337-42.
- Nakashima, E., et al. (2004). "Novel SBDS mutations caused by gene conversion in Japanese patients with Shwachman-Diamond syndrome." Hum Genet **114**(4): 345-8.
- Nascimbeni, M., et al. (2004). "Peripheral CD4(+)/CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions." Blood **104**(2): 478-86.
- Niemela, J. E., et al. (2006). "Single nucleotide polymorphisms in the apoptosis receptor gene TNFRSF6." Mol Cell Probes **20**(1): 21-6.
- Nilsen, H., et al. (2000). "Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication." Mol Cell **5**(6): 1059-65.
- Noack, D., et al. (2001). "Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by defects in NCF-1, the gene encoding the phagocyte p47-phox: mutations not arising in the NCF-1 pseudogenes." Blood **97**(1): 305-11.
- Notarangelo, L., et al. (2006). "Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee Meeting in Budapest, 2005." J Allergy Clin Immunol **117**(4): 883-96.
- Notarangelo, L. D., et al. (2006). "Immunodeficiencies with autoimmune consequences." Adv Immunol **89**: 321-70.
- Notarangelo, L. D., et al. (2000). "X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (XHIM)." Clin Exp Immunol **120**(3): 399-405.
- Notarangelo, L. D., et al. (2006). "Defects of class-switch recombination." J Allergy Clin Immunol **117**(4): 855-64.

O

- Ochs, H. D., et al. (1996). "X-linked agammaglobulinemia. A clinical and molecular analysis." Medicine (Baltimore) **75**(6): 287-99.
- Oliveira, J. B., et al. (2007). "NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(21): 8953-8.
- O'Neil, K. M. (2000). "Complement deficiency." Clin Rev Allergy Immunol **19**(2): 83-108.
- Orange, J. S., et al. (2003). "Finding NEMO: genetic disorders of NF-[kappa]B activation." J Clin Invest **112**(7): 983-5.
- Orkin, S. H., et al. (1983). "Molecular cloning of human adenosine deaminase gene sequences." J Biol Chem **258**(21): 12753-6.

P

- Pan, Q., et al. (2000). "Molecular basis of IgG subclass deficiency." Immunol Rev **178**: 99-110.

- Papavasiliou, F. N., et al. (2000). "Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes." *Nature* **408**(6809): 216-21.
- Papavasiliou, F. N., et al. (2002). "The activation-induced deaminase functions in a postcleavage step of the somatic hypermutation process." *J Exp Med* **195**(9): 1193-8.
- Papavasiliou, F. N., et al. (2002). "Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity." *Cell* **109 Suppl**: S35-44.
- Parel, Y., et al. (2004). "CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease." *Autoimmun Rev* **3**(3): 215-20.
- Picard, C., et al. (2003). "Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency." *Science* **299**(5615): 2076-9.
- Puck, J. M. (1997). "Primary immunodeficiency diseases." *Jama* **278**(22): 1835-41.
- Purtilo, D. T., et al. (1975). "X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease)." *Lancet* **1**(7913): 935-40.

Q

- Quartier, P., et al. (2004). "Clinical, immunologic and genetic analysis of 29 patients with autosomal recessive hyper-IgM syndrome due to Activation-Induced Cytidine Deaminase deficiency." *Clin Immunol* **110**(1): 22-9.
- Quartier, P., et al. (1999). "Early and prolonged intravenous immunoglobulin replacement therapy in childhood agammaglobulinemia: a retrospective survey of 31 patients." *J Pediatr* **134**(5): 589-96.

R

- Ramenghi, U., et al. (2000). "Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer." *Blood* **95**(10): 3176-82.
- Renno, T., et al. (1998). "Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis." *Eur J Immunol* **28**(2): 540-7.
- Revy, P., et al. (2000). "Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2)." *Cell* **102**(5): 565-75.
- Rickinson, A. B., et al. (1996). "Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus." *Curr Opin Immunol* **8**(4): 492-7.
- Rieux-Laucat, F., et al. (1999). "Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: A possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations." *Blood* **94**(8): 2575-82.
- Rieux-Laucat, F., et al. (2003). "Cell-death signaling and human disease." *Curr Opin Immunol* **15**(3): 325-31.
- Rieux-Laucat, F., et al. (2003). "Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways." *Cell Death Differ* **10**(1): 124-33.
- Rieux-Laucat, F., et al. (1995). "Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity." *Science* **268**(5215): 1347-9.
- Rodrigo Mora, J., et al. (2006). "Specificity and plasticity of memory lymphocyte migration." *Curr Top Microbiol Immunol* **308**: 83-116.
- Roesler, J., et al. (2000). "Recombination events between the p47-phox gene and its highly homologous pseudogenes are the main cause of autosomal recessive chronic granulomatous disease." *Blood* **95**(6): 2150-6.
- Roos, D., et al. (2006). "Chronic granulomatous disease caused by mutations other than the common GT deletion in NCF1, the gene encoding the p47phox component of the phagocyte NADPH oxidase." *Hum Mutat* **27**(12): 1218-29.
- Rosen, F. S., et al. (1984). "The primary immunodeficiencies (1)." *N Engl J Med* **311**(4): 235-42.
- Rosen, F. S., et al. (1984). "The primary immunodeficiencies. (2)." *N Engl J Med* **311**(5): 300-10.
- Rosen, F. S., et al. (1995). "The primary immunodeficiencies." *N Engl J Med* **333**(7): 431-40.
- Rosenzweig, S. D., et al. (2004). "Phagocyte immunodeficiencies and their infections." *J Allergy Clin Immunol* **113**(4): 620-6.
- Roy, M., et al. (1993). "The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells." *J Immunol* **151**(5): 2497-510.

REFERENCIAS

S

- Sala, P., et al. (1993). "Persistent expansions of CD4+ CD8+ peripheral blood T cells." *Blood* **82**(5): 1546-52.
- Salzer, U., et al. (2005). "Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans." *Nat Genet* **37**(8): 820-8.
- Santagata, S., et al. (2000). "The genetic and biochemical basis of Omenn syndrome." *Immunol Rev* **178**: 64-74.
- Sarafova, S. D., et al. (2005). "Modulation of coreceptor transcription during positive selection dictates lineage fate independently of TCR/coreceptor specificity." *Immunity* **23**(1): 75-87.
- Sato, T., et al. (2005). "Dual functions of Runx proteins for reactivating CD8 and silencing CD4 at the commitment process into CD8 thymocytes." *Immunity* **22**(3): 317-28.
- Saveriano, N., et al. (1981). "Lectin-binding patterns of small lymphocytes in bone marrow, thymus and spleen: demonstration of lymphocyte subsets by quantitative radioautography." *Eur J Immunol* **11**(11): 870-6.
- Sawada, S., et al. (1994). "A lineage-specific transcriptional silencer regulates CD4 gene expression during T lymphocyte development." *Cell* **77**(6): 917-29.
- Sayos, J., et al. (1998). "The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM." *Nature* **395**(6701): 462-9.
- Scheibenbogen, C., et al. (1992). "The interleukin-2 receptor in human monocytes and macrophages: regulation of expression and release of the alpha and beta chains (p55 and p75)." *Res Immunol* **143**(1): 33-7.
- Schubert, L. A., et al. (1995). "The human gp39 promoter. Two distinct nuclear factors of activated T cell protein-binding elements contribute independently to transcriptional activation." *J Biol Chem* **270**(50): 29624-7.
- Schwarz, K., et al. (1996). "RAG mutations in human B cell-negative SCID." *Science* **274**(5284): 97-9.
- Scudeletti, M., et al. (1999). "Immune regulatory properties of corticosteroids: prednisone induces apoptosis of human T lymphocytes following the CD3 down-regulation." *Ann N Y Acad Sci* **876**: 164-79.
- Seemayer, T. A., et al. (1995). "X-linked lymphoproliferative disease: twenty-five years after the discovery." *Pediatr Res* **38**(4): 471-8.
- Segal, B. H., et al. (2000). "Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease." *Medicine (Baltimore)* **79**(3): 170-200.
- Shwachman, H., et al. (1964). "The Syndrome of Pancreatic Insufficiency and Bone Marrow Dysfunction." *J Pediatr* **65**: 645-63.
- Sibilia, J., et al. (1996). "Hyper-IgM syndrome associated with rheumatoid arthritis: report of RA in a patient with primary impaired CD40 pathway." *Br J Rheumatol* **35**(3): 282-4.
- Siegel, R. M., et al. (2000). "The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity." *Nat Immunol* **1**(6): 469-74.
- Singh, A., et al. (1998). "Death domain receptors and their role in cell demise." *J Interferon Cytokine Res* **18**(7): 439-50.
- Skare, J. C., et al. (1989). "Linkage analysis of seven kindreds with the X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) confirms that the XLP locus is near DXS42 and DXS37." *Hum Genet* **82**(4): 354-8.
- Sleight, B. J., et al. (1998). "Correction of autoimmune lymphoproliferative syndrome by bone marrow transplantation." *Bone Marrow Transplant* **22**(4): 375-80.
- Smith, O. P., et al. (1996). "Haematological abnormalities in Shwachman-Diamond syndrome." *Br J Haematol* **94**(2): 279-84.
- Sneller, M. C., et al. (1992). "A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine lpr/gld disease." *J Clin Invest* **90**(2): 334-41.
- Sneller, M. C., et al. (1997). "Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis." *Blood* **89**(4): 1341-8.
- Sneller, M. C., et al. (1997). "Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis." *Blood* **89**(4): 1341-8.
- Speletas, M., et al. (2001). "Analysis of Btk mutations in patients with X-linked agammaglobulinaemia (XLA) and determination of carrier status in normal female relatives: a nationwide study of Btk deficiency in Greece." *Scand J Immunol* **54**(3): 321-7.
- Spits, H., et al. (1995). "Development of human T and natural killer cells." *Blood* **85**(10): 2654-70.

- Stein-Gerlach, M., et al. (1998). "SHP-2, SH2-containing protein tyrosine phosphatase-2." Int J Biochem Cell Biol **30**(5): 559-66.
- Stemmelin, G. R., et al. (1991). "Bronchiolitis with leukemia." Ann Intern Med **114**(10): 912-3.
- Stewart, D. M., et al. (2001). "Linking cellular activation to cytoskeletal reorganization: Wiskott-Aldrich syndrome as a model." Curr Opin Allergy Clin Immunol **1**(6): 525-33.
- Straus, S. E., et al. (2001). "The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis." Blood **98**(1): 194-200.
- Sullivan, K. E. (2001). "DiGeorge syndrome/chromosome 22q11.2 deletion syndrome." Curr Allergy Asthma Rep **1**(5): 438-44.
- Sumegi, J., et al. (2000). "Correlation of mutations of the SH2D1A gene and Epstein-Barr virus infection with clinical phenotype and outcome in X-linked lymphoproliferative disease." Blood **96**(9): 3118-25.
- Suzuki, Y., et al. (1999). "Involvement of reactive oxygen species produced via NADPH oxidase in tyrosine phosphorylation in human B- and T-lineage lymphoid cells." Biochem Biophys Res Commun **255**(2): 262-7.
- Sylla, B. S., et al. (1989). "Multipoint linkage mapping of the Xq25-q26 region in a family affected by the X-linked lymphoproliferative syndrome." Clin Genet **36**(6): 459-62.

T

- Takada, H., et al. (2004). "Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation." Blood **103**(1): 185-7.
- Tangsinmankong, N., et al. (2001). "The immunologic workup of the child suspected of immunodeficiency." Ann Allergy Asthma Immunol **87**(5): 362-9; quiz 370, 423.
- Taniuchi, I., et al. (2002). "Evidence for distinct CD4 silencer functions at different stages of thymocyte differentiation." Mol Cell **10**(5): 1083-96.
- Taylor, A. M., et al. (1996). "Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia." Blood **87**(2): 423-38.
- Teachey, D. T., et al. (2005). "Unmasking Evans syndrome: T-cell phenotype and apoptotic response reveal autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS)." Blood **105**(6): 2443-8.
- Thomson, W., et al. (1999). "Quantifying the exact role of HLA-DRB1 alleles in susceptibility to inflammatory polyarthritis: results from a large, population-based study." Arthritis Rheum **42**(4): 757-62.
- Tonutti, E., et al. (1994). "Phenotypic heterogeneity of persistent expansions of CD4+ CD8+ T cells." Clin Immunol Immunopathol **73**(3): 312-20.
- Trowbridge, I. S., et al. (1981). "Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(5): 3039-43.
- Tsukada, S., et al. (1994). "Role of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficiency." Curr Opin Immunol **6**(4): 623-30.
- Tsukada, S., et al. (1993). "Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia." Cell **72**(2): 279-90.
- Tsukada, S., et al. (1994). "Binding of beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins to the PH domain of Bruton tyrosine kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11256-60.

U

- Uckun, F. M., et al. (1990). "Temporal association of CD40 antigen expression with discrete stages of human B-cell ontogeny and the efficacy of anti-CD40 immunotoxins against clonogenic B-lineage acute lymphoblastic leukemia as well as B-lineage non-Hodgkin's lymphoma cells." Blood **76**(12): 2449-56.
- Urban, J. A., et al. (2004). "Ikaros null mice display defects in T cell selection and CD4 versus CD8 lineage decisions." J Immunol **173**(7): 4470-8.

V

- Vaishnav, A. K., et al. (1999). "The molecular basis for apoptotic defects in patients with CD95 (Fas/Apo-1) mutations." J Clin Invest **103**(3): 355-63.
- Vaishnav, A. K., et al. (1999). "The spectrum of apoptotic defects and clinical manifestations, including systemic lupus erythematosus, in humans with CD95 (Fas/APO-1) mutations." Arthritis Rheum **42**(9): 1833-42.

REFERENCIAS

- Valiaho, J., et al. (2006). "BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia." *Hum Mutat* **27**(12): 1209-17.
- van der Werff ten Bosch, J. E., et al. (1998). "The use of the anti-malaria drug Fansidar (pyrimethamine and sulphadoxine) in the treatment of a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and Fas deficiency." *Br J Haematol* **102**(2): 578-81.
- van Dongen, J. J., et al. (2003). "Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936." *Leukemia* **17**(12): 2257-317.
- van Engeland, M., et al. (1998). "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." *Cytometry* **31**(1): 1-9.
- van Ginkel, F. W., et al. (1999). "Partial IgA-deficiency with increased Th2-type cytokines in TGF-beta 1 knockout mice." *J Immunol* **163**(4): 1951-7.
- Verbruggen, G., et al. (2005). "X linked agammaglobulinaemia and rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **64**(7): 1075-8.
- Vetrie, D. (1993). "Isolation of the defective gene in X linked agammaglobulinaemia." *J Med Genet* **30**(6): 452-3.
- Vetrie, D., et al. (1993). "The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases." *Nature* **361**(6409): 226-33.
- Vignais, P. V. (2002). "The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism." *Cell Mol Life Sci* **59**(9): 1428-59.
- Vihinen, M., et al. (2001). "Primary immunodeficiency mutation databases." *Adv Genet* **43**: 103-88.
- Villa, A., et al. (1998). "Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome." *Cell* **93**(5): 885-96.
- Voskoboinik, I., et al. (2006). "Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis." *Nat Rev Immunol* **6**(12): 940-52.
- Vowells, S. J., et al. (1996). "Testing for chronic granulomatous disease." *Lancet* **347**(9007): 1048-9.
- Vowells, S. J., et al. (1996). "Genotype-dependent variability in flow cytometric evaluation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase function in patients with chronic granulomatous disease." *J Pediatr* **128**(1): 104-7.

W

- Walport, M. J. (2001). "Complement. First of two parts." *N Engl J Med* **344**(14): 1058-66.
- Walport, M. J. (2001). "Complement. Second of two parts." *N Engl J Med* **344**(15): 1140-4.
- Wang, J., et al. (1999). "Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II." *Cell* **98**(1):47-58.
- Wang, L. H., et al. (1999). "Autoimmune manifestations in patients with primary immunodeficiency." *Acta Paediatr Taiwan* **40**(4): 243-9.
- Warnatz, K., et al. (2006). "Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency." *Blood* **107**(8): 3045-52.
- Watanabe-Fukunaga, R., et al. (1992). "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis." *Nature* **356**(6367): 314-7.
- Webster, E. A., et al. (1999). "An aggressive form of polyarticular arthritis in a man with CD154 mutation (X-linked hyper-IgM syndrome)." *Arthritis Rheum* **42**(6): 1291-6.
- Weiss, L., et al. (1998). "Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V beta-restricted CD4+CD8+ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha." *J Infect Dis* **178**(4): 1158-62.
- Weston, S. A., et al. (2001). "Assessment of male CVID patients for mutations in the Btk gene: how many have been misdiagnosed?" *Clin Exp Immunol* **124**(3): 465-9.
- Wiginton, D. A., et al. (1986). "Complete sequence and structure of the gene for human adenosine deaminase." *Biochemistry* **25**(25): 8234-44.
- Winkelstein, J. A., et al. (2000). "Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients." *Medicine (Baltimore)* **79**(3): 155-69.
- Winkelstein, J. A., et al. (2003). "The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients." *Medicine (Baltimore)* **82**(6): 373-84.
- Woloszynek, J. R., et al. (2004). "Mutations of the SBDS gene are present in most patients with Shwachman-Diamond syndrome." *Blood* **104**(12): 3588-90.

- Worth, A., et al. (2006). "Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype." Br J Haematol **133**(2): 124-40.
- Wu, J., et al. (1996). "Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease." J Clin Invest **98**(5): 1107-13.
- Wu, X., et al. (2000). "ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response." Nature **405**(6785): 477-82.
- Yonehara, S. (1999). "Effects of anti-Fas antibodies on lymphocytes and other organs: preparation of original and new monoclonal antibodies and amelioration of systemic autoimmune disease." Int Rev Immunol **18**(4): 329-45.

Y

- Yu, P. W., et al. (2004). "Sustained correction of B-cell development and function in a murine model of X-linked agammaglobulinemia (XLA) using retroviral-mediated gene transfer." Blood **104**(5): 1281-90.

Z

- Zamoyska, R. (2003). "T-cell differentiation: chromatin remodelling in CD4/CD8 regulation." Curr Biol **13**(5): R189-91.
- Zan, H., et al. (2001). "The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation." Immunity **14**(5): 643-53.
- Zou, Y. R., et al. (2001). "Epigenetic silencing of CD4 in T cells committed to the cytotoxic lineage." Nat Genet **29**(3): 332-6.
- Zuckermann, F. A. (1999). "Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells." Vet Immunol Immunopathol **72**(1-2): 55-66.