

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Búsqueda de mutaciones en LRBA en
pacientes con Inmunodeficiencia Común
Variable (CVID)”**

TESIS

Que presenta

NIDIA CAROLINA MORENO CORONA

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de Tesis:

Tutor: Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Co-tutora: Dra. Gabriela López Herrera

México, D.F.

AGOSTO, 2015

El presente trabajo se realizó en el laboratorio no1 del departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Leopoldo Santos Argumedo y en la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría bajo la dirección de la Dra. Gabriela López Herrera.

Durante el desarrollo de este trabajo la alumna recibió beca CONACYT, con número de registro 557862 y el apoyo del CONACYT con el proyecto #161089 y #154472.

DEDICATORIAS

A mi **FAMILIA**

A mi Padre **Eduardo Moreno Peñaloza** por su guía, su apoyo incondicional, por su ejemplo de perseverancia.

A mi hermana **Magali Moreno Corona** por ser mi cómplice, mi esperanza, por su ayuda incondicional.

A mi hermana **Karina Aylin Moreno Sánchez** por su cariño y ánimo todos los días.

A mi hermano **Eduardo Moreno Sansores** por su cariño y apoyo.

A **Rosalina Sánchez Romero** por su apoyo y sus consejos cada que los necesite.

A mi Madre...

Por ser mi motivación, mi fuente de inspiración en todo momento, mi ejemplo a seguir a lo largo de todo el camino.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Leopoldo Santos Argumedo** por su ejemplo, su paciencia, su guía y sus enseñanzas, por siempre motivarme a seguir adelante.

A la **Dra. Gabriela López Herrera** por sus enseñanzas, consejos, su infinita paciencia y su apoyo.

A la **Dra. Laura Berrón Ruíz** por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A mis asesores **el Dr. Vianney Ortiz Navarrete y el Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda** por los consejos y comentarios de mi proyecto.

Al **Dr. Héctor Romero** quien es el responsable de que todo se encuentre en orden en el laboratorio y quién siempre estuvo dispuesto a colaborar en el proyecto

A mis compañeros de generación, Rosalía, Sandra, Korina, Luz, Marcos, Alfredo, Eduardo, Omar y Samuel, porque sin su apoyo, su historia y sus consejos no lo hubiera logrado.

A mis compañeros del Laboratorio, Orestes, Daniel, Cesar, Julio por sus consejos, sus enseñanzas, su paciencia y apoyo; a Selene, Zayda, Ale, Brittany, Mitzy por su apoyo.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| ÍNDICE DE TABLAS | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vi |
| Lista de abreviaturas | vii |
| Resumen..... | ix |
| ABSTRACT | x |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Inmunodeficiencias primarias..... | 1 |
| 1.2 Inmunodeficiencias primarias con defectos predominantemente de anticuerpos | 5 |
| 1.3 Desarrollo de células B en órganos linfoides periféricos | 7 |
| 1.4 Inmunodeficiencia Común Variable (CVID)..... | 9 |
| 1.4.2 Defectos genéticos asociados a CVID | 13 |
| 1.5 Proteína de anclaje tipo beige que responde a lipopolisacárido (LRBA, por sus siglas en inglés)..... | 19 |
| 1.5.1 Estructura de la proteína | 20 |
| II. JUSTIFICACIÓN | 23 |
| III. HIPÓTESIS..... | 23 |
| IV. OBJETIVOS..... | 23 |
| 4.1 General..... | 23 |
| 4.2 Particulares | 23 |
| V. METODOLOGÍA | 24 |
| 5.1 Selección de pacientes..... | 24 |
| 5.2 Obtención de células mononucleares y líneas celulares de linfocitos B inmortalizados | 24 |
| 5.3 Obtención de líneas celulares de linfocitos B inmortalizados | 24 |
| 5.4 Determinación de LRBA | 25 |
| 5.5 Análisis de la expresión de CD69 en células T en PBMC's: | 26 |
| 5.6 Extracción de RNA..... | 26 |
| 5.7 Síntesis de cDNA | 27 |
| 5.8 Amplificación de LRBA por reacción en cadena de la polimerasa | 27 |
| 5.9 Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa..... | 29 |
| 5.10 Clonación de productos de PCR | 29 |
| 5.11 Transformación de los productos de ligación en <i>Escherichia coli</i> DH5 α | 30 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 5.12 Secuenciación y análisis | 32 |
| VI. Resultados..... | 32 |
| VII Discusión | 43 |
| VIII Conclusiones | 46 |
| IX BIBLIOGRAFÍA..... | 47 |
| Anexo 1 | 52 |
| Anexo 2 | 53 |
| ANEXO 3 | 57 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Las nueve categorías de Inmunodeficiencias primarias según IUIS (International Union of Immunological Societies) modificada de Tang, 2014 | 2 |
| Tabla 2. Clasificación de las inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos. Tabla modificada (Tang, 2014)..... | 6 |
| Tabla 3 Defectos genéticos asociados a CVID | 14 |
| Tabla 4. Oligos para amplificar todo el cDNA de LRBA. | 28 |
| Tabla 5. Poblaciones leucocitarias de los pacientes | 33 |
| Tabla 6 Características clínicas de los pacientes..... | 34 |
| Tabla 7 Características clínicas de los pacientes que no tienen expresión de LRBA.. | 39 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Distribución de Inmunodeficiencias primarias en Europa de acuerdo al registro de pacientes 2014 de la ESID..... | 4 |
| Figura 2 Esquema de diferenciación de célula B y defectos asociados a CVID | 17 |
| Figura 3 Representación esquemática de los dominios de LRBA modificada de Wang, 2014 | 20 |
| Figura 4 Expresión de LRBA en células mononucleares de sangre periférica..... | 35 |
| Figura 5 Expresión de LRBA en pacientes con CVID. | 36 |
| Figura 6 Expresión de CD69 en PBMCs. | 37 |
| Figura 7 Expresión de CD69 en PBMCs. | 38 |
| Figura 8 Esquema de mRNA de LRBA..... | 40 |
| Figura 9 Amplificados del mRNA de LRBA con los 16 pares de oligos de un testigo.40 | |
| Figura 10 Amplificado de GAPDH del cDNA del paciente 2 y un testigo..... | 41 |
| Figura 11 Amplificados del cDNA de LRBA del paciente 2 y un testigo..... | 41 |
| Figura 12 Amplificados del cDNA de LRBA del paciente 2 y un testigo. | 42 |
| Figura 13 Amplificado de los exones 31-56 de LRBA en gDNA de la paciente 2..... | 42 |

Lista de abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| PID | Inmunodeficiencias primarias |
| ESID | Sociedad Europea de Inmunodeficiencias por sus siglas en inglés: European Society for immunodeficiencies |
| SCID | Inmunodeficiencia combinada severa por sus siglas en inglés: Severe Combined Immunodeficiency |
| IUIIS | Unión internacional de Sociedades Inmunológicas por sus siglas en inglés: International union for immunological societies |
| CVID | Inmunodeficiencia común variable por sus siglas en inglés: Common Variable Immunodeficiency |
| LRBA | Proteína de anclaje tipo beige que responde a LPS por sus siglas en inglés: LPS responsive beige-like protein |
| GC | Centro germinal por sus siglas en inglés: Germinal Center |
| SHM | Hipermutación somática por sus siglas en inglés: Somatic hypermutation |
| PBMC's | Células mononucleares de sangre periférica por sus siglas en inglés: Peripheral blood mononuclear cells |
| Ig | Inmunoglobulinas |
| XL | Herencia ligada al X |
| BTK | Tirosina cinasa de Bruton por sus siglas en inglés: Bruton Tyrosine kinase |
| AR | Herencia autosómica recesiva |
| ICOS | Co-estimulador inducible de células T |
| TACI | Activador transmembranal y modulador de calcio por sus siglas en inglés: Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand activator. |
| Ag | Antígeno |
| MZ | Zona Marginal por sus siglas en inglés Marginal zone |

| | |
|---------------|---|
| MHC | Complejo principal de histocompatibilidad por sus siglas en inglés: Mayor histocompatibility complex |
| LNH | Linfoma no Hodgkin |
| LES | Lupus Eritematoso Sistémico |
| PAGID | Grupo Pan-americano de Inmunodeficiencias |
| Ab | Anticuerpo |
| HLA | Antígeno leucocitario humano por sus siglas en inglés: Human leucocitary antigen |
| SAC | <i>Cowan sthaphilococcus aureus</i> |
| PBL | Linfocitos de sangre periférica sus siglas en inglés: Peripheral Blood lymphocytes |
| TNFRSF | Receptor del factor de necrosis tumoral por sus siglas en inglés: Tumor necrosis factor receptor super family |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos por sus siglas en inglés: Phosphate buffer solution |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| PerCp | Peridinin chlorophyll protein |
| PHA | Fitohemaglutinina |
| | |
| GEPI | Gastroenteritis por infección |
| BAFF-R | Receptor del factor de activación de células B por sus siglas en inglés: B-cell activating factor receptor |

Resumen

Las inmunodeficiencias primarias (IDP's) son un grupo heterogéneo de desórdenes que afectan distintos componentes del sistema inmune innato y adquirido. Las Inmunodeficiencias humorales son las más comúnmente reportadas en el mundo; dentro de estas la inmunodeficiencia común variable (CVID) es la más frecuente. La CVID es una enfermedad con heterogeneidad clínica y alta frecuencia de enfermedades autoinmunes y neoplasias malignas, únicamente el 20% de estos pacientes han sido asociado con un defecto genético (Xiao, 2014).

En el 2012, López-Herrera y colaboradores describieron defectos genéticos en el gen de LRBA (LPS responsive beige-like anchor protein) en pacientes con CVID. *LRBA* codifica para una proteína de 319 KDa, compuesta de múltiples dominios y podría servir como andamio para múltiples proteínas. LRBA está relacionada con el tráfico vesicular, también tiene un papel en la regulación de la autofagia y la apoptosis (López-Herrera, 2012); sin embargo, el mecanismo por el cuál regula estas funciones, es desconocido.

En la cohorte de pacientes mexicanos del Instituto Nacional de Pediatría se desconoce el defecto genético, por lo que la búsqueda de mutaciones de una nueva molécula como LRBA en pacientes con CVID, nos permitirá asociar esta enfermedad con una causa. En este trabajo se analizaron 17 pacientes previamente diagnosticados con CVID según los criterios establecidos por la ESID, (ESID, 2014) pertenecientes a la unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría, Centro Médico Nacional "La Raza" y Centro Médico Nacional "Siglo XXI". Se encontraron 5 pacientes con deficiencia en la expresión de LRBA. Estos pacientes presentaban pocas células B de memoria y uno de los siguientes síntomas: autoinmunidad y/o problemas gastrointestinales; así mismo presentaron síntomas clínicos a una edad más temprana y un fenotipo clínico más severo comparado con otros pacientes que presentan síntomas a edades más tardías, aparte de las infecciones recurrentes características de estos pacientes, en particular en pacientes que presenten autoinmunidad.

ABSTRACT

Primary immunodeficiencies (IDPs) is a heterogeneous group of disorders that affect several components of the innate and acquired immune system. Humoral immunodeficiencies are the most commonly IDPs reported in the world, among this, Common variable Immunodeficiency (CVID) is the most frequent. CVID has heterogeneous clinical manifestations and present high frequency of malignancies and autoimmune diseases, only 20% of these patients have been associated with a genetic defect (Xiao, 2014).

In 2012, Lopez-Herrera et al described a genetic defect in the LRBA gene (LPS responsive beige-like anchor protein) in patients with CVID. LRBA encodes a protein of 319 kDa, is composed of multiple domains and could serve as an scaffold for multiple proteins. LRBA is related to vesicular trafficking, also has a role in regulation of autophagy and apoptosis (Lopez-Herrera, 2012); however, the mechanism by which it regulates these functions is currently unknown.

In Mexican database of patients with CVID the genetic defect is unknown, so the search for mutations of a new molecule such as LRBA in Patients with CVID, will allow us to associate this disease with a cause. In this work we analyzed 17 patients previously diagnosed with CVID according to diagnosis criteria established by ESID (ESID, 2014), the patients are under care of the immunodeficiency Research Unit of the National Institute of Pediatrics, National Medical Center "La Raza" and National Medical Center "XXI century ". Five patients with deficient expression LRBA were found. These patients had fewer memory B cells and one of the following symptoms: autoimmunity and/ or gastrointestinal problems; also they presented clinical symptoms such as earliest age onset and more severe clinical phenotype compared with patients with late onset of the symptoms apart from recurrent infections characteristics of these patients, particularly autoimmunity.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Inmunodeficiencias primarias.

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) se caracterizan por defectos congénitos en el desarrollo y función del sistema inmunológico, como resultado, hay una mayor susceptibilidad a las infecciones. Hasta la fecha, se han encontrado más de 150 defectos moleculares y este número está aumentando rápidamente. En la mayoría de los casos las IDPs son desordenes monogénicos que siguen una herencia mendeliana, sin embargo, algunas IDPs tienen un origen poligénico complejo (Notarangelo, 2011).

Las IDPs se pueden separar en ocho categorías, dependiendo de qué componente del sistema inmunológico este afectado. Los defectos en el sistema inmune adaptativo, incluyen síndromes de deficiencias de anticuerpos e inmunodeficiencias combinadas. Los defectos en el sistema inmune innato, comprenden desórdenes de la fagocitosis, desórdenes en la señalización mediada por los receptores tipo-toll (TLR) y en el complemento. Actualmente la unión internacional de la sociedad de inmunología (IUIS, por sus siglas en inglés) agregó una nueva categoría a la clasificación “Fenocopias de IDPs” (Tabla 1), las cuales resultan de mecanismos adquiridos y no de mutaciones somáticas (Tang, 2014). Una visión general de la frecuencia de diagnósticos de IDPs en la base de datos de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) muestra que las deficiencias primarias de anticuerpos constituyen más de la mitad de los diagnósticos reportados (Figura 1). La prevalencia estimada varía considerablemente en el diagnóstico individual de IDPs, de aproximadamente 1:500 para la deficiencia de IgA, siendo la más frecuente, pero a menudo asintomática a $> 1:100,000$ para las formas muy graves como la inmunodeficiencia combinada severa (SCID), síndromes de desregulación inmune, y deficiencias del complemento (de Vries, 2011).

Todas estas formas se caracterizan por una susceptibilidad aumentada a infecciones recurrentes, infecciones severas o ambas, con una susceptibilidad

distintiva de varios tipos de patógenos, dependiendo de la naturaleza del defecto inmune (Notarangelo, 2011). Además, algunas formas de IDPs se presentan con desregulación inmune; en particular se ha visto que los defectos genéticos que afectan el desarrollo de células B y T comprometen no solo la habilidad de estas para generar una diversidad de linfocitos capaces de reconocer múltiples patógenos, también afecta mecanismos de tolerancia central y periférica, lo que favorece manifestaciones inflamatorias y autoinmunes (Bacchetta, 2013).

Tabla 1. Las nueve categorías de Inmunodeficiencias primarias según IUIS (International Union of Immunological Societies) modificada de Tang, 2014

| Categoría | Inmunodeficiencias |
|--|---|
| <p>Inmunodeficiencias combinadas de células B y T</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Inmunodeficiencia Combinada (Severa), (S)CID por sus siglas en inglés Severe Combined Immunodeficiency • Deficiencia <i>CD40LG</i> • Deficiencia de <i>CD40</i> • Deficiencia de la nucleosidasa purina fosforilasa (<i>PNP</i>) • Deficiencia de <i>CD3G</i> • Deficiencia de <i>CD8A</i> • Deficiencia de <i>ZAP70</i> • Deficiencia de MHC clase I: Mutaciones en <i>TAP1</i>, <i>TAP2</i> O <i>TAPBP</i> • Deficiencia de MHC clase II: Mutaciones en <i>ITK</i> |
| <p>Síndromes de inmunodeficiencias bien definidos</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome Wiskott-Aldrich • Desórdenes de reparación de DNA: Ataxia-telangiectasia, Síndrome Bloom, Deficiencia <i>MCM4</i>, entre otros. • Defectos tímicos: Síndrome DiGeorge y Síndrome CHARGE. • Displasias inmuno-óseas: Hipoplasia del cartílago, Síndrome Schimke. • Síndrome Hiper IgE • Disqueratosis congénita • Defectos en la vitamina B12 y el metabolismo de folatos • Síndrome Cornell-Netherton • Deficiencia de Winged-helix • Deficiencia de <i>ORAI1</i> |

| | |
|--|---|
| <p>Deficiencias predominantemente de anticuerpos</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Agammaglobulinemia ligada al X o autosómica recesiva • Inmunodeficiencia común variable (CVID) por sus siglas en inglés: Common Variable Immunodeficiency • Deficiencias específicas de anticuerpos • Deficiencias de subclases de IgG • Deficiencia selectiva de IgA • Hipogamaglobulinemia transitoria de la infancia |
| <p>Desregulación Inmune</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Síndromes familiares hemofagocíticos linfohistiocíticos: Deficiencia de perforina, síndrome con hipopigmentación, Síndrome Chediak-Higashi , Síndrome de Griscelli • Síndromes linfoproliferativos • Defectos genéticos de las células T reguladoras • Autoinmunidad sin linfoproliferación • Síndrome autoinmune linfoproliferativo (ALPS) |
| <p>Defectos en la inmunidad innata</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Displasia ectodérmica anhidrótica con inmunodeficiencia • Deficiencia de la cinasa-4 asociado al receptor de interleucina-1 • Candidiasis mucocutánea crónica |
| <p>Defectos congénito del número de fagocitos, de la función o ambos</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Neutropenia congénita severa • Neutropenia cíclica • Enfermedad granulomatosa crónica ligada al X o autosómica recesiva |
| <p>Desórdenes autoinflamatorios</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Fiebre mediterránea familiar • Fiebres periódicas asociadas al receptor TNF • Síndrome Hiper-IgD • Síndromes periódicos asociados a criopirina |
| <p>Deficiencias del complemento</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Angiodema hereditario • Espectro amplio de inmunodeficiencias de factores de la vía clásica y alterna del complemento |
| <p>Fenocopias de inmunodeficiencias primarias</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome linfoproliferaivo autoinmune (ALPS-SFAS) mutación somática en <i>FADD</i> • Enfermedad leucoproliferativa autoinmunes asociada con RAS, mutación asociada en <i>KRAS</i> • Asociadas con autoanticuerpos |
| <p>^a Existen más de 150 inmunodeficiencias primarias, para ver la lista completa de inmunodeficiencias consultar: Primary immunodeficiency diseases: an update on the clasfication from the Internationa Union of Immunological Societies Expert Comitee for primary Immunodeficiency, Froniters in Immunology, 2014.</p> | |

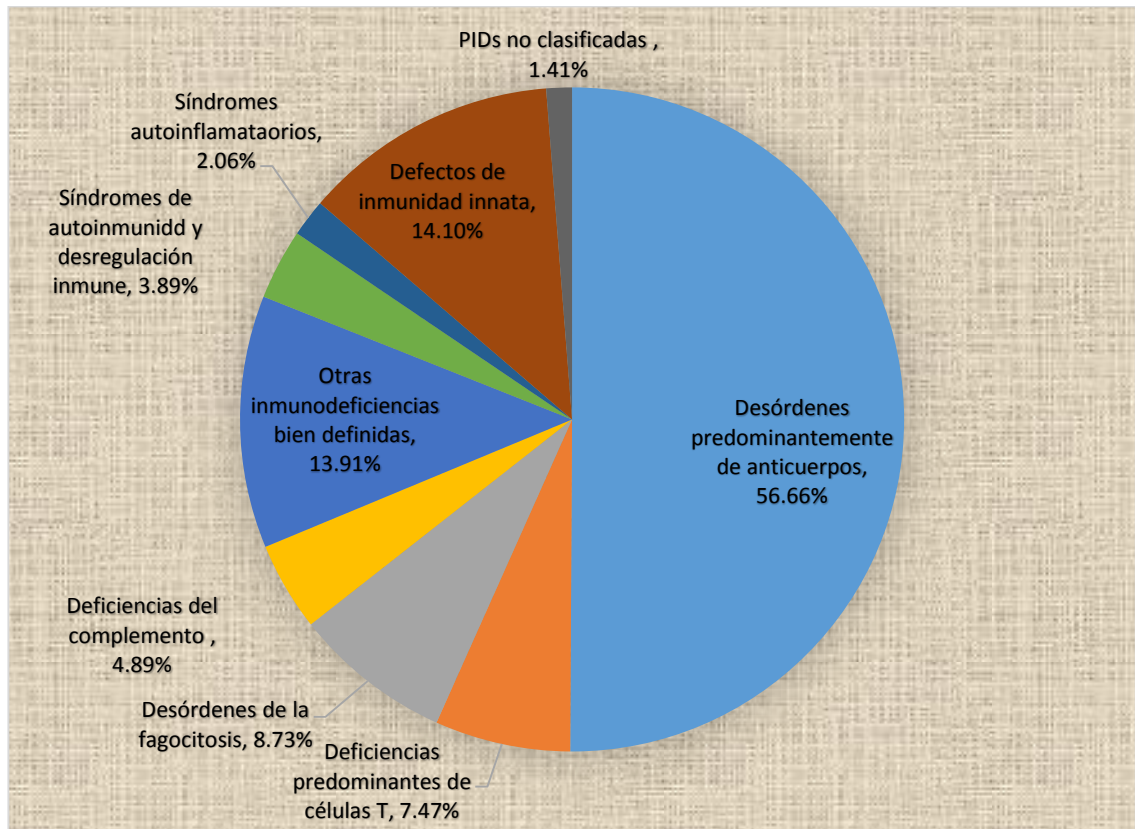


Figura 1 Distribución de Inmunodeficiencias primarias en Europa de acuerdo al registro de pacientes 2014 de la ESID (consultada en <http://www.esid.org/statistics.php?sub=2> 10 de julio de 2015)

1.2 Inmunodeficiencias primarias con defectos predominantemente de anticuerpos

Como se mencionó, las deficiencias primarias de anticuerpos son el tipo más común de IDPs, abarcando poco más del 50% del total de estos padecimientos. El espectro de las deficiencias de anticuerpos abarca desde pacientes con una reducción severa de todos los tipos de inmunoglobulinas séricas con una ausencia total de células B hasta pacientes con una deficiencia selectiva de anticuerpos con niveles normales de inmunoglobulinas y presencia de linfocitos B en periferia, como se observa en la tabla 2 (Aghamohammadi y cols., 2012; Tang, 2014).

Muchos de estos desórdenes comparten un fenotipo clínico con características comunes como: infecciones recurrentes, inflamación crónica y autoinmunidad (Aghamohammadi y cols, 2012). Los pacientes en estas condiciones se encuentran libres de enfermedades infecciosas durante su primer año de vida, debido, a las IgG adquiridas pasivamente de la madre. La mayoría de los pacientes con inmunodeficiencias humorales pueden vivir normalmente si se les da una terapia de reemplazo con inmunoglobulina junto con antibióticos profilácticos (Aghamohammadi y cols., 2012). Un diagnóstico temprano y una terapia adecuada, son la clave para la supervivencia y una mejor calidad de vida. Retrasos en el diagnóstico o un mal tratamiento pueden llevar a un daño permanente en los órganos (ej. bronquiectasias) o muerte por infección.

Es importante realizar un diagnóstico diferencial dentro del grupo de las inmunodeficiencias primarias con defectos predominantes de anticuerpos, ya que algunas de ellas tienen un pronóstico y un tratamiento diferente. La identificación de los genes relacionados con las inmunodeficiencias predominantes de anticuerpos permite un diagnóstico definitivo, incluyendo un diagnóstico parental y un manejo apropiado de los pacientes (Aghamohammadi y cols., 2012).

Tabla 2. Clasificación de las inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos. Tabla modificada (Tang, 2014)

| Enfermedad | Ig en suero | Características | Herencia | Defectos genéticos o patogénesis |
|--|--|--|----------|--|
| Agammaglobulinemia ligada al x | Todos los isotipos disminuidos | Infecciones bacterianas serias. | XL | Mutaciones en <i>BTK</i> |
| Agammaglobulinemia autosómica recesiva | Todos los isotipos disminuidos | Infecciones bacterianas serias. | AR | Mutaciones en la cadena pesada μ , en $\lambda 5$, $Ig\alpha$, $Ig\beta$ y en <i>BLNK</i> |
| Inmunodeficiencia común variable | IgG e IgA y/o IgM disminuidas | Infecciones bacterianas recurrentes, algunos presentan autoinmunidad, linfoproliferación o enfermedad granulomatosa. | Variable | La mayoría desconocidos, en algunos casos mutaciones en <i>ICOS, CD19, CD81, CR 2, TNFRSF13B, LRBA</i> |
| Síndrome de Hiper IgM | Elevación de IgM con IgA e IgG disminuidas | Infecciones oportunistas, neutropenia, enfermedades autoinmunes. | XL, AR | Mutaciones en <i>CD40LG, CD40, AICDA</i> y <i>UNG</i> |
| Deficiencias de isotipo o de cadena pesada con números normales de células B | Una o más subclases de IgG y/o IgA e IgE probablemente ausente | En algunos casos asintomática o puede presentar infecciones virales/ bacterianas recurrentes. | Variabes | Mutaciones o eliminaciones en el cromosoma 14q32, Mutaciones en el gen constante Kappa |
| Deficiencia de anticuerpos específicos con concentraciones normales de Ig y células B | Normales | Incapacidad de producir anticuerpos contra antígenos específicos. | Variable | Desconocida |
| Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia | IgG e IgA disminuidas | Infecciones bacterianas de recurrentes a moderadas. | Variable | Desconocida |

1.3 Desarrollo de células B en órganos linfoides periféricos

Para comprender los mecanismos moleculares que llevan a deficiencias primarias de anticuerpos es necesario revisar las bases de la maduración temprana y desarrollo terminal de linfocitos B, lo que permite un mejor entendimiento de su patogénesis.

El desarrollo temprano de células pro y pre B humanas a partir de células madre pluripotenciales tiene lugar en la médula ósea (Abbas, 2002). En el primer estadio de diferenciación, conocido con el nombre de estadio pro-B, los linfocitos poseen una capacidad limitada de auto-renovación (Gamberele, 2004). Las células Pro B ($CD19^- CD10^{+/-} CD20^- CD22^+ CD24^- vpreB^+ Ig\alpha^{-/+}$) se caracterizan por la expresión del primer marcador de superficie específico de las células B CD22 (Warnatz, 2008). Esta etapa se caracteriza por la reorganización de los loci de la cadena Ig H y L, el cual se lleva a cabo en dos etapas: primero se asocian los fragmentos D_H-J_H (pro-B temprano) y luego se une el fragmento V_H al D_HJ_H previamente re arreglado (pro-B tardío) (Gamberele, 2004) (Le Bien, 2008). El re arreglo completo de la cadena pesada junto con la cadena ligera sustituta en la superficie dan lugar al pre-BCR, lo que marca la etapa de célula preB. Las células Pre B ($CD19^+ CD10^+ CD20^- CD24^{++} vpreB^+ Ig\alpha^+ intracelular \mu^+$) que expresan correctamente el preBCR en la superficie son seleccionadas positivamente para proliferar y para una consiguiente diferenciación (Warnatz, 2008) (Abbas, 2002).

Después del ensamblaje exitoso del preBCR y una expansión de la cadena ligera Kappa o Lambda, esta reemplaza a la cadena provisional ligera, el acoplamiento de la cadena pesada μ y la cadena ligera finalmente llevan a la expresión de la IgM de superficie, el marcador de las células B inmaduras. Únicamente del 10-20% de células B inmaduras producidas en la médula ósea llegan al bazo, una gran proporción es eliminada debido a una expresión autoreactiva del BCR (Warnatz, 2008) (Suriyani, 2010). En este punto el desarrollo central de las células B está completo por lo que las células transicionales salen de

la médula ósea para su completa maduración en los órganos linfoides secundarios, principalmente el bazo (Driessen, 2011).

La activación del complejo BCR por antígenos (Ag) conformacionales que se lleva a cabo en tejidos linfoides, estimula una mayor diferenciación y maduración de las células B (Driessen, 2011). Esta maduración está mediada por cambios dinámicos en la expresión de genes que dan lugar a la reacción del centro germinal (GC). La reacción GC se caracteriza por la expansión clonal, la recombinación de cambio de isotipo (RSE) en el locus IgH, la hipermutación somática (SHM) de genes VH, y la selección de un BCR de alta afinidad. Es dentro de los GCs donde la SHM y la purificación selectiva producen los clones de células B de mayor afinidad que forman los compartimentos de memoria de la inmunidad humoral (Le Bien, 2008).

Las células B de memoria que han pasado por una hipermutación somática rápidamente generan todos los tipos de inmunoglobulinas durante la respuesta secundaria y pueden ser identificadas por la expresión de CD27⁺, (Ko, 2005). La expresión de CD27, miembro de la familia de TNFR, está limitada a linfocitos activados y células dendríticas. Las células B CD27⁺ se encuentran predominantemente en centros germinales y zonas marginales por lo que CD27 está considerado como el marcador de células B de memoria (Xiao, 2004). Hay dos tipos de células B de memoria: las células B de memoria sin cambio de isotipo (CD27⁺IgD⁺) que representan aproximadamente del 15-25% de las células B en circulación y las células B de memoria con cambio de isotipo (CD27⁺IgD⁻), (Warnatz, 2008) (Haymore, 2008).

Dependiendo de la fuerza de afinidad de la señal del BCR, la activación de receptores de co-estimulación y otros factores, la activación de células B maduras por antígenos lleva a su muerte o a una diferenciación en células B de memoria o células plasmáticas que son las responsables de la memoria inmunológica de larga duración y la producción de un gran número de moléculas de inmunoglobulinas (Warnatz, 2008).

Las células plasmáticas surgen de la zona extrafolicular así como de los CG. Durante un encuentro primario con el antígeno, los plasmablastos en la zona medular de los ganglios y en la pulpa roja del bazo son los primeros en iniciar la formación anticuerpos (Warntaz, 2008).

1.4 Inmunodeficiencia Común Variable (CVID)

La Inmunodeficiencia Común Variable (CVID) es un conjunto heterogéneo de condiciones, todas ellas caracterizadas por una deficiencia primaria de anticuerpos de al menos dos isotipos de inmunoglobulinas (Yong y cols, 2011). Es la más común de las inmunodeficiencias primarias con relevancia desde el punto de vista clínico, su incidencia se ha calculado alrededor de 1-10,000 a 1-50,000 afectando a hombres y mujeres por igual, estas se pueden establecer en diferentes periodos de la vida, desde la niñez a la etapa adulta, con una distribución bimodal, mostrando dos picos el primero entre 1 y 5 años de vida y el segundo entre los 18 y 25 años (Abolhassani, 2013).

El defecto inmunológico principal es la presencia de niveles bajos de inmunoglobulinas por parte de las células B, aunque se han descrito anormalidades en los demás compartimentos del sistema inmune, por ejemplo una disminución de células T. Clínicamente, los individuos con CVID son propensos a infecciones recurrentes, más frecuentemente de las vías respiratorias, pero pueden presentarse otro tipo de infecciones, incluyendo las del sistema gastrointestinal, piel y tejidos blandos. Sin embargo; también presentan complicaciones inflamatorias en diferentes proporciones que incluyen autoinmunidad (ej. citopenias autoinmunes), enfermedad crónica pulmonar, bronquiectasias, enfermedad gastrointestinal con o sin malabsorción, enfermedad granulomatosa sistémica o localizada, esplenomegalia, linfadenopatía con o sin linfomas y un mayor riesgo de malignidad (Yong y cols., 2011).

Los criterios diagnósticos de CVID fueron definidos originalmente por la ESID y el Grupo Panamericano de Inmunodeficiencias, el criterio actual de CVID de acuerdo a la ESID (Marzo, 2014) es el que sigue:

Probable (Diagnóstico clínico)

Paciente masculino o femenino que tiene una marcada disminución de IgG (al menos 2 desviaciones estándar por debajo de la media para la edad) y una marcada disminución en al menos uno de los isotipos IgM o IgA, y que cumple todos los criterios siguientes:

- Pobre respuesta a vacunas (y/o hemaglutininas ausentes)
- Disminución de células B de memoria con cambio de isotipo (menos 70% de los valores normales de acuerdo a la edad)
- Deben excluirse causas secundarias de hipogammaglobulinemia (ver Anexo 1)
- El diagnóstico debe ser establecido después del 4 año de vida (aunque los síntomas se pueden presentar antes)
- No debe haber evidencia de una profunda deficiencia de células T, definida como dos de las siguiente: (a= año de vida)
- Números de CD4/microlitro:
2-6 a <300,
6-12a <250,
>12a <200
- % células naive CD4: 2-6a <25%, 6-16a <20%, >16a <10%
- Proliferación de T ausente

1.4.1 Manifestaciones clínicas de la CVID

Pacientes con CVID pueden presentar diversas manifestaciones clínicas las más comunes se pueden dividir en seis categorías principales que incluyen: infecciones, complicaciones pulmonares, enfermedades granulomatosas o infiltraciones policlonales linfocíticas, autoinmunidad, enfermedades gastrointestinales y neoplasias. No todos los pacientes con diagnóstico clínico de CVID presentan todas las manifestaciones.

Las bacterias más frecuentemente asociadas con las infecciones en CVID son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Klebsiella pneumoniae*. Las infecciones sinopulmonares recurrentes pueden comenzar en cualquier momento después de la edad de dos años, pero con mayor frecuencia son precedidas por un período de tiempo prolongado (por ejemplo, décadas) en el que la frecuencia y severidad de las infecciones son normales o casi normales. Algunas personas con CVID también pueden presentar mayor susceptibilidad a infecciones por micoplasma. Variablemente, los pacientes con CVID pueden también tener meningitis u otras infecciones bacterianas sistémicas oculares recurrentes o infecciones de la piel o gastrointestinales (GI) síntomas relacionados con homeostasis intestinal, como diarrea crónica, mala absorción, o inflamación (Yong y cols., 2011).

Además de la disfunción inmune humoral, en los individuos con CVID también puede haber síntomas de función anormal de células T y desregulación inmune, incluyendo hiperplasia linfocítica, inflamación gastrointestinal, una variedad de fenómenos autoinmunes, y una mayor susceptibilidad al cáncer, especialmente a la generación de linfomas (Scharenberg y cols., 2006).

Dentro de la patología gastrointestinal se ha reportado, en aproximadamente 20% de los individuos con CVID, infecciones e inflamación asociados con síntomas de mala absorción (Scharenberg y cols., 2006), así como infecciones gastrointestinales por *Salmonella*, *Campylobacter* y *Giardia* que se producen en aproximadamente el 10% de los individuos (Piqueras y cols., 2003). La inflamación gastrointestinal en algunos

de los pacientes con CVID puede parecerse a la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa (Scharenberg y cols., 2006).

Los fenómenos autoinmunes que experimentan los pacientes con CVID, se atribuyen a la desregulación inmune que ocurre como efecto secundario del defecto molecular subyacente. El inicio y la gravedad de los fenómenos autoinmunes en cualquier individuo con CVID son por lo tanto fuertemente influenciados por otros modificadores genéticos inmunes; tales como, el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), así como; por influencias ambientales, incluyendo virus, la exposición a patógenos gastrointestinales y la presencia o ausencia de inflamación crónica (Scharenberg y cols., 2006). Del 20% a 25% de los individuos con CVID presentan una o más tipos de fenómenos autoinmunes que van desde trastornos semejantes a la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico, a citopenias, hepatitis y alopecia areata. (Scharenberg y cols., 2006). La trombocitopenia autoinmune y anemia son los más comúnmente reportadas (~ 4% -5% y el 2% -4%, respectivamente) (Scharenberg y cols., 2006).

Como se mencionó, los pacientes con CVID son susceptibles a padecer enfermedades malignas, especialmente linfomas. En un estudio con 248 pacientes, Cunningham-Rundles y Bodian [1999] encontraron que casi el 8% desarrollaron linfoma no Hodgkin (LNH), otro 1% tenían linfoma de Hodgkin, y otros individuos presentaron 24 diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, melanoma y carcinoma de células basales.

En el pasado, el principal determinante del pronóstico a largo plazo para las personas con CVID era el número y gravedad de las infecciones bacterianas sinopulmonares, lo que contribuye a una mortalidad global del 23% -30% durante aproximadamente diez años de período de seguimiento (Scharenberg y cols., 2006).

1.4.2 Defectos genéticos asociados a CVID

Los pacientes con CVID no producen cantidades suficientes de Abs Ag-específicos, lo que puede ser causado por defectos en cualquier etapa crítica de la diferenciación y maduración de las células B (Driessen y cols., 2011); por lo que la heterogeneidad inmunológica y clínica de la CVID dificulta el descubrimiento de los mecanismos subyacentes que causan esta enfermedad (Driessen y cols., 2011), (Yong y cols., 2011), (Xiao. 2014).

Fue hasta el 2003 que las mutaciones en *ICOS* fueron identificadas como el primer trastorno genético que resulta en un fenotipo CVID (Castigli y cols., 2005). El ritmo de avance en el descubrimiento de la base genética de la CVID ha progresado desde entonces. Se han encontrado mutaciones en genes relacionados con la súper familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF) como son *TNFRSF13B* y *TNFRSF13C* (los cuáles codifican para TACI y BAFFR, respectivamente), así mismo se han encontrado mutaciones en genes relacionados con los miembros del complejo co-receptor del BCR como son: *CD19*, *CR2* y *CD81* y con el antígeno de diferenciación de células B, *MS4A1* (el cual codifica para CD20), (Park y cols. 2011).

Los defectos genéticos asociados a CVID hasta el momento son los siguientes:

Tabla 3 Defectos genéticos asociados a CVID

| Defecto Genético | Tipo de herencia | Manifestaciones clínicas | Edad al diagnóstico | Ref. |
|-------------------|------------------|---|----------------------|-------|
| <i>ICOS</i> | AR | Hipogammaglobulinemia; reducción de células B de memoria y células B "naive" | Entre 19 y 28 años | 3 |
| <i>TNFRSF 13B</i> | AD | Enfermedades sinopulmonares, porcentaje normal de células B, Niveles reducidos de IgG e IgA | Entre 8 y 51 años | 12 |
| <i>CD19</i> | AR | CD19 tienen un desarrollo relativamente normal de células B y la formación de centros germinales, pero el número de las células B CD27 positivas esta reducido, tienen defectos en el flujo de calcio seguido de estimulación con IgM | Entre 10 y 49 años | 43 |
| <i>TNFRSF 13C</i> | AR | Desarrollo alterado de las células B foliculares, disminución: de las células B memoria, células B de memoria de zona marginal y de memoria con cambio de isotipo | 57 años | 51 |
| <i>CD81</i> | AR | Enfermedades sinopulmonares, glomerulonefritis, artralgia | 6 años | 42 |
| <i>CR2</i> | AR | Mialgias, hipogammaglobulinemia, esplenomegalía. Células B de memoria con cambio de isotipo disminuidas. | 28 años | 44 |
| <i>MSA41</i> | AR | Enfermedades sinopulmonares, hipogammaglobulinemia, números normales de células B, células B de memoria disminuidas | 4 años | 20 |
| <i>LRBA</i> | AR | Hipogammaglobulinemia temprana con autoinmunidad y enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedades gastrointestinales | Entre 4 y 29 años | 32 |
| <i>PRKCD</i> | AD | Gastroenteritis, infecciones sinopulmonares, síndrome nefrótico, reducción de células B | 12 años | 36 |
| <i>NF-KB2</i> | AD | Enfermedades autoinmunes variable, insuficiencia adrenal, hipogammaglobulinemia, número reducido de células B de memoria y de zona marginal | Entre los 2 y 9 años | 14,30 |

Como ya se mencionó anteriormente, todos los receptores antes mencionados están relacionados con la estimulación, la supervivencia y el desarrollo de las células B en periferia.

ICOS (co-estimulador inducible). Esta proteína se expresa en células T activadas que se encuentran en órganos linfoides secundarios y en la zona clara de los centros germinales, su receptor ICOS-L, se encuentra en células B, células dendríticas; monocitos y células no linfoides. Al unirse ICOS con su ligando se promueve la secreción de citocinas como IL4, IL5, IL6 principalmente IL 10 la cual estimula la diferenciación terminal de células B a células de memoria y plasmáticas (Beiber y col. 2000).

La deficiencia de ICOS en humanos fue descrita por primera vez en 2003 por Gimbacher y colaboradores, encontraron cuatro pacientes adultos con diagnóstico clínico de CVID pertenecientes a dos familias no relacionadas, los cuales presentaban una eliminación que dio como resultado la ausencia en la expresión de ICOS.

TACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor, TNFRSF-13B) es un receptor transmembranal tipo III de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral, se expresa en células B y transduce señales importantes para la regulación de supervivencia, así como de apoptosis en estas células. Sus ligandos son: BAFF (B cell activating factor, *TNFSF13B*) y APRIL (Proliferation-inducing ligand, *TNFSF13A*).

En el 2005 se describieron 6 diferentes mutaciones en pacientes con CVID y con inmunodeficiencia de IgA (DIgA), las mutaciones descritas eran homocigotas y heterocigotas, en *TNFSF13B*. En este estudio se describieron dos “hotspots” (C104R y A181E); el primero corresponde a una cisteína muy conservada del dominio (CRD) y el segundo está en la región transmembranal de TACI. Los pacientes no presentan manifestaciones autoinmunes graves, ni linfoproliferación, ni expansión de las células B en sangre periférica (Castigli y col., 2005).

BAFFR (B cell activating factor receptor, *TNFRSF13C*), se expresa en linfocitos B y en una sub-población de linfocitos activados. Las células plasmáticas presentan una baja expresión de BAFFR en la membrana. Además de su papel como factores de supervivencia de células B, BAFF/BAFFR interaccionan en la regulación de la expresión de CD21 y CD23 y en la diferenciación de las células B en zonas marginales.

En el 2009, Warnatz y colaboradores reportaron un hombre de 57 años hijo de padres consanguíneos, este presentaba una delección homocigota en BAFFR, que causaba una delección de 8 aminoácidos de la región transmembranal de la proteína.

CD20 Es uno de los primeros antígenos de diferenciación específico encontrado en células B, pertenece a la familia de MS4A, familia de moléculas con múltiples dominios membranales y se expresa en células pre-B y células B maduras, se pierde en células B diferenciadas a células plasmáticas, (Kujipers, 2010).

En el 2010 Kujipers y colaboradores reportaron a una niña, hija de padres consanguíneos, con una mutación homocigota en MS4AI.

CD19, CD21 y CD81 son proteínas membranales que se expresa en células B, forman el complejo receptor que regula la señalización del BCR después de su entrecruzamiento con el antígeno. Los co-receptores asociados al BCR pueden modular la señal de transducción del BCR positiva o negativamente e influenciar la diferenciación del linfocito B.

CD19, tiene dos dominios extracelulares parecidos a inmunoglobulinas y un tallo citoplasmático con motivos capaces de unir tirosinas cinasas como Lyn o la cinasa PI3K (Bacchelli y col 2007). En el 2006 se reportó deficiencia de CD19 en pacientes con CVID (Van Zelm y col., 2006).

CD81 es un miembro de la familia de las tetraspaninas, se encuentra en linfocitos B y T.

En el 2010 identificaron a una niña Marroquí, de padres consanguíneos con una deficiencia en CD19, la deficiencia de CD19 era causada por una mutación homocigota en el gen de CD81 (van Zelm, 2010).

CD21 facilita la internalización de complejos inmunes por las células B, lo que favorece la presentación antigénica (Wang, 2014). Se expresa principalmente en células B maduras y células dendríticas foliculares.

Thiel y colaboradores reportaron en el 2012, un hombre 28 años con una mutación en CR2, el análisis de la secuencia mostro que se trataba de un heterocigoto compuesto, en donde un alelo tenía un error de corte y empalme que eliminaba el exón 6; el otro alelo tenía un codón de paro prematuro en el exón 6, lo que resultaba en la ausencia de expresión de CD21.

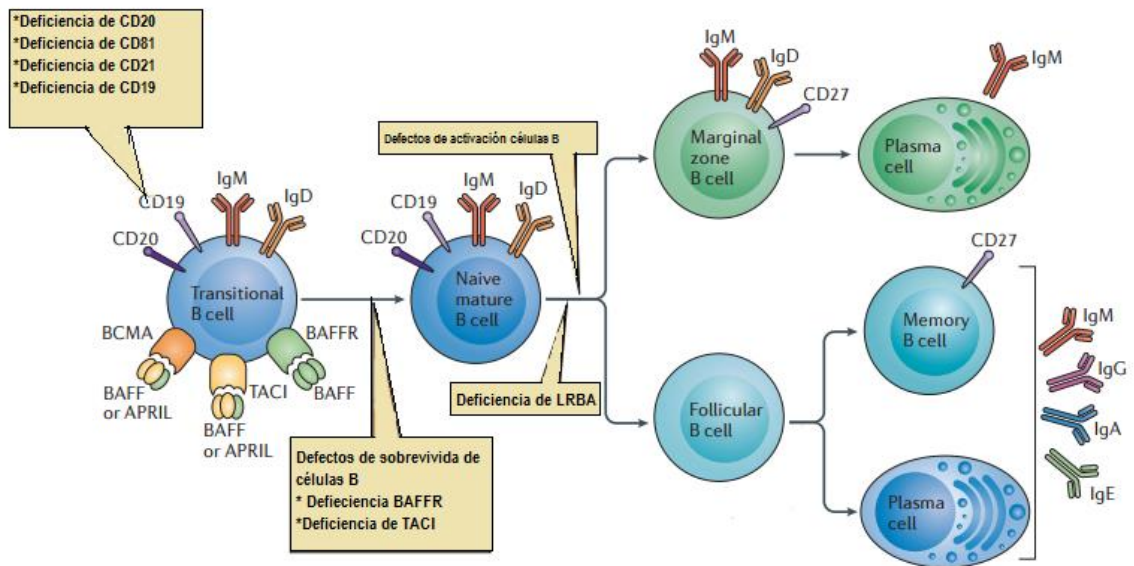


Figura 2 Esquema de diferenciación de célula B y defectos asociados a CVID

NF-KB ha sido detectado en diferentes tipos celulares que expresan citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular. NF-kappa-B se activa con una gran variedad de estímulos, una activación inapropiada ha sido relacionada con eventos inflamatorios, artritis autoinmune, asma y shock

séptico. Por el contrario una inhibición persistente de NF-kappa-B está relacionado con apoptosis, desarrollo celular inapropiado y un retraso en el crecimiento celular.

NFKB1 y *NFKB2* codifican para las proteínas p105 y p100, las cuales al ser procesadas producen las subunidades activas p50 y p52, (Chen, 2013).

En el 2013 Chen y colaboradores identificaron en 4 pacientes de 2 familias no relacionadas 2 diferentes mutaciones heterocigotas en el gen de *NFKB2*. Ambas mutaciones causan que el extremo c-terminal de la proteína este truncado, removiendo la zona conservada para los sitios de fosforilación requeridos para la activación de p100 a p52.

En el 2014 Liu y colaboradores identificaron una delección heterocigota en el gen de *NFKB2*, que afecta el sitio de fosforilación, mencionado anteriormente.

PRKCD La proteína cinasa C delta, pertenece a la familia de las proteínas cinasa, las cuales son críticas para la regulación de la supervivencia celular, proliferación y la apoptosis. En los linfocitos B, *PRKCD* está involucrada en la señalización mediada por el BCR (Salzer, 2013).

En el 2013 Salzer y colaboradores describieron una mutación en el gen de *PRKCD* en una niña turca de 12 años de edad, de padres consanguíneos.

LRBA, en el 2012 López-Herrera y cols describieron mutaciones homocigotas en el gen de *LRBA*, las cuales causan un síndrome caracterizado por hipogammaglobulinemia temprana con autoinmunidad y enfermedad inflamatoria del intestino. Los individuos afectados mostraban niveles reducidos de al menos dos tipos de inmunoglobulinas (IgM, IgG o IgA) y sufrían de infecciones recurrentes, autoinmunidad y desordenes gastrointestinales. Se identificaron cinco individuos, presentando cuatro mutaciones diferentes en *LRBA*. Tres de las mutaciones

encontradas son probablemente no funcionales, ya que codificaron para un codón de paro prematuro.

Los individuos afectados son pertenecientes a familias consanguíneas, provenientes de Arabia, Israel, Bélgica e Irán, presentaban un desarrollo de células B alterado, una deficiente activación *in vitro* de las células B, formación deficiente de plasmablastos, una baja secreción de inmunoglobulinas y bajas respuestas proliferativas.

En el 2012, Alangari y cols describieron una delección de 2pb en *LRBA*, provocando un cambio en el marco de lectura y una nula expresión de la proteína en 5 individuos de una familia consanguínea, estos presentaban un fenotipo caracterizado por una inmunodeficiencia con características de CVID, desregulación inmune o ambas; presentado enfermedad inflamatoria del intestino con diarrea crónica y citopenia autoinmune. Así mismo Burns y cols; en el 2012 reportaron una delección homocigota de los exones 1 al 30 en *LRBA*, en un paciente proveniente de una familia consanguínea, la paciente presentaba linfadenopatía, esplenomegalia, neutrocitopenia, trombocitopenia y diarrea crónica asociada con enteropatía autoinmune.

1.5 Proteína de anclaje tipo beige que responde a lipopolisacárido (LRBA, por sus siglas en inglés)

LRBA fue parcialmente clonada en 1992 (Feuchter, 1992) y completamente clonada en ratón en el 2001(Wang, 2001), una búsqueda en GenBank señaló que *LRBA* murino presenta homología con una secuencia parcial de cDNA de 7.3-kb, llamada proteína tipo Beige (Beige like-protein), que pertenece a *LRBA* humano.

El resto de la secuencia de *LRBA* fue obtenida de pulmón, hígado y timo humano (Wang, 2002). *LRBA* humano y de ratón son idénticos en un 90% y la proteína presenta un homología del 94%. El mRNA de *LRBA* se expresa en casi todos los tipos

celulares, con una elevada expresión en células del sistema inmune (Wang, 2001). En ratón se encuentran tres isoformas, mientras que en humanos, de acuerdo a NCBI existen dos isoformas la primera de 9899pb y la segunda 10032pb. *LRBA* humano se encuentra en el cromosoma 4q31.3, tiene 58 exones distribuidos en 752, 397 pb (Wang, 2001).

1.5.1 Estructura de la proteína

El gen de *LRBA* codifica para una proteína de 319 KDa. *LRBA* pertenece a una familia de proteínas que comparten un dominio WBW, el nombre proviene de los dominios (**W**DL (WD-like)-**B**EACH-**W**D40). El dominio BEACH fue originalmente identificado como una región muy conservada dentro de la proteína reguladora del tráfico lisosomal (*LYST*), la cual se encuentra mutada en el síndrome de Chediak-Higashi (*CHS*). El nombre BEACH fue tomado a partir de 'Beige y Chediak-Higashi', del cual Beige es el nombre del modelo murino de *CHS* (Gebauer, 2004).

LRBA está constituida por varios dominios (Figura 1): El dominio semejante al dominio de unión a concanavalina A (Con A-like), motivos de unión a la subunidad reguladora RII de PKA (proteína cinasa dependiente de AMPc, PKARIII) y el dominio WBW (Wang, 2014).

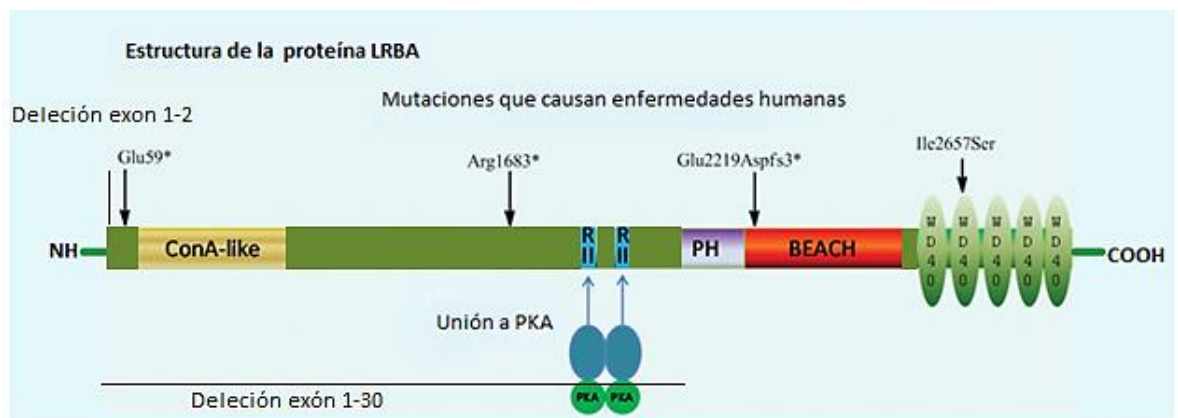


Figura 3 Representación esquemática de los dominios de LRBA modificada de Wang, 2014

En el 2009 Callebaut y cols; por medio de herramientas bioinformáticas predijeron el dominio semejante a Concanavalina A en LRBA y en otros cuatro parálogos.

LRBA tiene dos sitios potenciales de unión para la PKARII, a la cual se le denomina AKAP (por sus siglas en inglés de A-kinase anchor protein) (Hou, 2011). Las AKAPs tienen afinidad por la subunidad reguladora de la proteína cinasa A y otras enzimas de señalización como PKC. Su principal función es compartimentalizar estas moléculas en distintas membranas u organelos (López-Herrera, 2012).

Finalmente el súper dominio WBW, que se encuentra en la región carboxilo terminal, la cual está compuesta a su vez del dominio WDL el cual es similar en estructura al dominio homólogo a pleckstrina (PH). Este se encuentra poco conservado y constituye alrededor de 100 aa, precediendo al dominio BEACH. Estudios cristalográficos del dominio WBW en LRBA sugerían que el dominio PH no se unía a fosfolípidos debido a que el sitio de unión se encuentra bloqueado por una alfa hélice en la estructura, así mismo no se encontraba cargado negativamente, lo anterior fue confirmado por estudios bioquímicos realizados a un panel de fosfolípidos, donde se demostró que no se une a ellos (Gebauer, 2004); sin embargo, interacciona fuertemente con el dominio BEACH (Wang, 2014).

El dominio WD40 (también conocido como WD o repetido β -transducina) es un dominio estructural corto de alrededor de 40 aminoácidos, terminando frecuentemente en un di péptido de triptófano y ácido aspártico (WD). Varios de estos repetidos son combinados para formar un dominio proteico WD. Las proteínas con dominios WD están implicadas en una variedad de funciones, desde el control del ciclo celular, regulación de la transcripción, transducción de señales, autofagia y apoptosis. Se cree que estas proteínas son capaces de coordinar el ensamblaje de complejos multi proteicos (Gebauer, 2004).

La función de ninguno de estos dominios ha sido determinada exactamente y la función de LRBA hasta el momento es desconocida; la localización subcelular puede ayudar a entender mejor la función y los mecanismos moleculares que regulan a LRBA

en la célula. En el 2014 Reiser y colaboradores identificaron en la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 por medio de estudios de microscopia confocal, que LRBA está ampliamente asociada al aparato de Golgi, membranas plasmáticas, pseudopodia y microtúbulos en respuesta a una estimulación con LPS; así mismo vieron que esta se co-localiza con la unidad catalítica RII β y RII α de PKA.

La inmunodeficiencia común variable, aún tiene que ser satisfactoriamente definida y subclasificada de acuerdo a anormalidades moleculares o funcionales; por lo que es necesario la búsqueda de mutaciones en estos pacientes. LRBA juega un papel importante dentro de esta inmunodeficiencia, ya que, LRBA es ligeramente diferente de los otros genes identificados en pacientes con CVID, primero codifica para una proteína de 319 KDa, compuesta de múltiples dominios y podría servir como andamio para múltiples proteínas. LRBA está relacionada con el tráfico vesicular, por lo cual podría ser requerida para la homeostasis y la activación de la membrana celular. Por lo tanto, LRBA podría regular a los otros genes afectados en CVID, por ejemplo, CD19, CD20 y BAFFR, (Wang, 2014). Además de lo anterior, LRBA también tiene un papel en la regulación de la autofagia y la apoptosis (López-Herrera, 2012), sin embargo, el mecanismo por el cuál regula estas funciones, es desconocido.

En México Berrón Ruiz y cols se han dedicado a caracterizar múltiples parámetros inmunológicos en pacientes con diagnóstico clínico de CVID; entre ellos las diferentes poblaciones de linfocitos y la expresión de moléculas importantes para la proliferación y diferenciación de células B como lo son TACI, ICOS, BAFF-R, CD154 Y CD40 (Berrón-Ruiz, 2013). En el Instituto Nacional de Pediatría se cuenta con un registro de 70 pacientes con diagnóstico clínico de CVID, quienes son atendidos en diferentes centros de salud, entre ellos destaca el CMN Siglo XXI y el CMN “La Raza” y el CMN “Siglo XX1”, en estos pacientes no se ha detectado una posible deficiencia en la expresión de las moléculas antes mencionadas; sin embargo a la fecha, no se ha buscado la deficiencia de LRBA en estos pacientes, lo cual es el objetivo principal del presente trabajo.

II. JUSTIFICACIÓN

La CVID es una enfermedad con heterogeneidad clínica y alta frecuencia de enfermedades autoinmunes y neoplasias malignas, únicamente el 20% de estos pacientes han sido asociado con un defecto genético (Xiao, 2014). En la base de datos de pacientes mexicanos se desconoce el defecto genético, por lo que la búsqueda de mutaciones de una nueva molécula como LRBA en pacientes con CVID, nos permitirá asociar esta enfermedad con una causa.

III. HIPÓTESIS

Pacientes con diagnóstico clínico de CVID, que presenten: hipogammaglobulinemia, autoinmunidad y/o alteraciones gastrointestinales son candidatos a tener una mutación en el gen de LRBA.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Determinar la deficiencia de LRBA, en pacientes mexicanos con diagnóstico de inmunodeficiencia común variable.

4.2 Particulares

Determinar la expresión de LRBA en PBMCs, de los pacientes con diagnóstico clínico de CVID y donadores sanos.

Determinar la activación de células T en pacientes con ausencia en la expresión de LRBA y en donadores sanos.

Búsqueda de mutaciones en pacientes que no expresen LRBA.

V. METODOLOGÍA

5.1 Selección de pacientes

Criterios de inclusión

Pacientes previamente diagnosticados con CVID según los criterios establecidos por la ESID, (ESID, 2014) que asistan para su evaluación a la Clínica de Inmunodeficiencias primarias o a la unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría, Centro Médico Nacional “La Raza” y Centro Médico Nacional “Siglo XXI”. Todos los pacientes consintieron la toma de muestra para el estudio. El proyecto está aprobado por el comité de ética del INP.

Criterios de exclusión

Pacientes con menos de 1% de células B, o pacientes con causas secundarias de hipogammaglobulinemia (Anexo 1).

5.2 Obtención de células mononucleares y líneas celulares de linfocitos B inmortalizados

Obtención de células mononucleares (PBMCs)

Se obtuvo una muestra de 10 a 20 ml sangre periférica de los pacientes y donadores sanos, utilizando heparina como anticoagulante. A partir de la cual, se aislaron células mononucleares (PBMCs) por medio de un gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque).

5.3 Obtención de líneas celulares de linfocitos B inmortalizados

Se cultivaron 1×10^6 PBMCs con 10 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich), y una dilución en una proporción 1:2 del sobrenadante de del virus Epstein Bar (EBV) cepa B958. Se incubaron a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂, se mantuvieron las células en cultivo por un mes en medio RPMI-1640 suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (Gibco), 2mM glutamina, 100U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycinan y 1nM de piruvato de sodio (Todos adquiridos de Gibco).

5.4 Determinación de LRBA

Se analizó la expresión de LRBA Western Blot, a partir de PBMCs activadas con PHA o líneas celulares de linfocitos B inmortalizados.

Western blot

Obtención de proteínas

Las células obtenidas, fueron centrifugadas durante 5 min a 1500 rpm y se concentraron en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Al botón de células obtenido, se le agregó 100 µL de buffer de lisis (Signaling Technologies), se incubó durante 30 min en hielo y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min. Posteriormente se transfirió el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y se cuantificó con el kit DC™ Protein assay cat. # 500-0114, la proteína obtenida. Por último, se desnaturalizó la proteína utilizando una proporción 1:6 de buffer de Laemmli calentándose a 95 °C durante 5 min.

Preparación del gel y Transferencia

Se realizó un gel de poliacrilamida en gradiente del 9% - 18%. La electroforesis se realizó a 60v toda la noche. La transferencia se realizó en una membrana de Polivinildifluorido (Milipore), la cual se activó con etanol por 1 min, con las siguientes condiciones 60 V durante 4 horas.

Posteriormente se bloqueó la membrana con leche sin grasa al 3% por una hora. Se incubó con el anticuerpo policlonal de conejo anti-LRBA (Sigma-Aldrich), toda la noche. Se utilizó como anticuerpo secundario un anti-IgG de conejo acoplado a HRP, el cual se incubó 90min. Se reveló con femto west luminol (Thermo-Scientific). Se observó en el Chemidoc XRS, (BioRad).

5.5 Análisis de la expresión de CD69 en células T en PBMC's:

Citometría de flujo

La expresión de CD69 se evaluó en células T activadas. Para la determinación de CD69 las PBMC's fueron cultivadas por 12 horas a una densidad de 2×10^6 células bajo condiciones estándar (37°C, 5% CO₂) en medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 10% SFB (PAA; Australia), 1mM L-glutamina, penicilina en 100 unidades/ml y estreptomocina a 10µg/ml (GIBCO) en presencia de 10 PHA 10 µg/ml de ionomicina (Sigma, St Louis MO). Después, los PBMC's se tiñeron con una mezcla de anti-CD3 PerCP(BD) y anti-CD69 FITC (BD), se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con PBA y fijadas con PBS conteniendo 1% de formaldehído.

Adquisición y análisis

Se adquirieron 10,000 eventos las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACS aria (BD). Los datos se analizaron con el software Flow. Jo versión 8.7.

5.6 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó a partir de 3×10^6 células mononucleares (PBMCs) o de células B inmortalizadas con EBV, se lisaron con 500µl de Trizol. Se adiciono cloroformo- alcohol isoamílico en una relación 4:9:1; recuperándose la fase acuosa, la cual se mezcló con un volumen de isopropanol para realizar la precipitación del RNA. La pastilla de RNA se lavó con etanol al 75%, se determinó la concentración y pureza de RNA por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

5.7 Síntesis de cDNA

La síntesis de DNA complementario se realizó a partir del RNA extraído utilizando la siguiente mezcla: Oligo (dT), dNTPs, RNA (adquiridos de Thermo Scientific) y agua inyectable c.b.p. en un volumen final de 17 μ l, esta mezcla se sometió a una temperatura de 70 grados celsius durante 5 minutos para después ponerla en hielo y adicionar la enzima (Transcriptasa reversa MuLV, New England BioLabs) y el buffer de esta enzima. Se utilizó en el termociclador con un ciclo de 42°C por 60 min y después 90°C 10 min.

5.8 Amplificación de LRBA por reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación de LRBA se llevara a cabo a partir de las muestras de cDNA, con la siguiente mezcla de reacción, en un volumen final de 25 μ l:

| Componente | Volumen |
|--------------------------------------|----------------|
| Buffer de reacción 10x | 2.5 μ l |
| MgCl₂ 25mM | 1.5 μ l |
| dNTPs 10mM | 0.5 μ l |
| Primer Fw 25mM | 0.2 μ l |
| Primer Rv 25mM | 0.2 μ l |
| cDNA | 1 μ l |
| Taq pol (New England biolabs) | 0.125 μ l |
| H₂O inyectable | 19.225 μ l |

Tabla 4. Oligos para amplificar todo el cDNA de LRBA.

| Par Oligos | Forward | Reverse | Tamaño del producto | Tm° | Tiempo de extensión | Extras |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|-----|---------------------|---------|
| 1 | ACTTTCCACATCAACTG CTTTGG | AAATTATAGCTAGCCA GCACTCC | 635 | 57 | 1' | |
| 2 | TCTTCAAGTCTGCACTG AAGTAG | GTTTCTGATGAGCCCA GGAAAC | 678 | 57 | 1' | |
| 3 | ATGTGAATGGTGAGCT GGCTTC | CCTTACAGGCAAGCAT CTGTTC | 609 | 57 | 1' | |
| 4 | GACTATATGTTCAACCT TGCTGG | GGAATCATAGAGTTAG GGTGTC | 646 | 57 | 1' | |
| P5 | GATGAAGGATTCTGGA GTAAAGG | CAGAGAGAAAGCATCC ATTCTTG | 624 | 57 | 1' | |
| 6 | AACAGTAGAGAAAACA GGAGGAG | CTGACAGTCATTGAAT CTTTGCC | 672 | 57 | 1' | |
| 7 | AATCAGGAGTTACCAG ATGAAGG | TCCAACCTCGCAATCTT TTGCTC | 662 | 57 | 1' | |
| 8 | ACCTTGGTCAGATGCT GGAGG | CCGCAAAATTCCTCCA GATGAC | 713 | 60 | 2' | Betaína |
| 9 | ACATCGGCTACACATG AACTGG | TCCACATGGCTTCTAA ACCAG | 718 | 60 | 2' | Betaína |
| 10 | ATCACTCTCTGAAATCA CACCAG | TGAATCAACTGTTGGA ACTGA | 634 | 57 | 1' | |
| 11 | ATGCTGTCAAGTGTGGT TTCCTC | AGAACTCAAGAGGAC GACTCAC | 699 | 60 | 2' | Betaína |
| 12 | GTATTCTGCAGACAAA CGAGAAG | AAGATCTCCAGGGCTG TATTTTG | 699 | 57 | 1' | |
| 13 | TGGATGAAGAGGATCC TAACTTC | CGATCTGCATGATCAA ATTTGCC | 691 | 57 | 1' | |
| 14 | TGAGCGTTATGAATCAT GGGAAG | TTGAGGACCATGATAA CATCCTG | 684 | 57 | 1' | |
| 15 | AGCTCAAATCCGAAGT TTTGGAC | ACTGCCTGGGTTATCT CCAATC | 650 | 57 | 1' | |
| 16 | ATTCTCTCAGGGTCACG TGATG | TGTGGTAGAAGAGAAT GATGCTC | 697 | 61 | 1' | |

5.9 Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa

Los productos de PCR se prepararon con regulador de carga para DNA y se utilizó 5µL de cada muestra para correr la electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados en TAE 1x (Tris-ácido acético-EDTA) y conteniendo de 0.1 a 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 100V durante 45 minutos, para finalmente visualizar los productos amplificados en un transiluminador de luz ultravioleta (Kodak). El tamaño de los amplificados obtenidos se determinó por medio del uso de un marcador de DNA.

5.10 Clonación de productos de PCR

Reacción de corte para extremos romos

Los productos de PCR generados por la polimerasa Taq DNA que tienen un extremo 3´dA serán cortados con la enzima DNA Blunting Enzyme para obtener productos de extremos romos de acuerdo al protocolo descrito para el kit de clonación CloneJET PCR Cloning kit (Thermo Scientific) en las siguientes condiciones:

| Componente | Volumen |
|--------------------------------|----------------|
| Buffer reacción 2x | 10 µl |
| Producto de PCR | 1µL o 0.15pmol |
| Agua libre de nucleasas | Aforar a 17 µl |
| Enzima DNA blunting | 1 µl |
| Volumen total | 18 µl |

Mezclar por 3-5s en vortex

Incubar la mezcla 15min TA

Incubar 70°C 5 min, enfriar en hielo

Reacción de ligación

El producto de la reacción anterior ligara con el vector pJET de acuerdo a la siguiente reacción:

| Componente | Volumen |
|------------------------------|---------|
| Vector de clonación pJET 1.2 | 1 µl |
| Ligasa T4 | 1µL |
| Volumen total | 20 µl |

Las reacciones de ligación se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente

Incubar a 16°C por 30 min

5.11 Transformación de los productos de ligación en *Escherichia coli* DH5α

La transformación se realizó utilizando 5 µL del producto de ligación con 100-200 µl de bacterias competentes, se incubó por 30 minutos a 4°C, seguido por un choque térmico a 42°C por un minutos y a 4°C por un minuto más.

Las bacterias transformadas se cultivaron por una hora en 1 mL de medio LB a 37°C en agitación, finalmente se sembraran en una placa de agar LB conteniendo 150 µg/ml de ampicilina preparada recientemente. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Selección de colonias positivas por PCR

Se seleccionaron un promedio de 10 colonias blancas por placa, y se resembraron en una placa de LB-ampicilina, así mismo, se resuspendieron en 6 µl de agua inyectable y se realizó una reacción de PCR utilizando los iniciadores pJET

(ver apéndice del kit de clonación CloneJET PCR) que reconocen una secuencia del vector pJET. La reacción de PCR se llevó bajo las siguientes condiciones:

| Componente | Volumen |
|-------------------------|----------------|
| Buffer 10x | 1 µl |
| MgCl₂ | 0.6 µL |
| dNTPs | 0.2 µl |
| Primer Fw 25 µm | 0.08 µl |
| Primer Rv 25 µm | 0.08 µl |
| Taq | 0.05 µl |
| H₂O | 1.99 µl |
| Bacteria | 6.0 µl |

Las colonias positivas son aquellas que den un producto de PCR del tamaño del inserto, que correspondan a la secuencia del vector.

Purificación de plásmidos a partir de las colonias positivas

Las colonias seleccionadas se sembraron en 5 mL de medio LB + ampicilina a 37°C durante toda la noche. La purificación del vector bacteriano se realizó siguiendo el protocolo establecido para el kit AxyPrep DNA Gel Extraction Kit.

5.12 Secuenciación y análisis

La Reacción de secuenciación se llevó bajo las siguientes condiciones:

| Componente | Volumen |
|----------------------------------|----------------|
| Buffer 5x | 1.5 µl |
| Muestra | 1 µL o 100ng |
| Big Dye | 0.8 µl |
| Primer 25 µm | 0.4 µl |
| H₂O inyectable | 10 µl |

Se utilizó la temperatura de alineación del primer utilizado, con una extensión de 4 min.

La lectura de los productos de secuenciación se realizó en la unidad de secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica INMEGEN. Los resultados de la secuencia se analizaron comparando con las secuencias reportadas en la página electrónica del GeneBank con el número de acceso NM 006726

VI. Resultados

6.1 Características clínicas de los pacientes

Se analizaron 17 pacientes con diagnóstico clínico de CVID procedentes de Centro Médico “Siglo XXI”, así como del Instituto Nacional de Pediatría y del Centro Médico Nacional “La Raza”. Son pacientes de edades desde 9 años hasta los 56, de sexo indistinto.

A estos pacientes previamente se les realizó por medio de citometría de flujo la cuantificación en porcentaje y en números totales de las poblaciones de linfocitos, así como las subpoblaciones de las células B de memoria (Tabla 5).

Tabla 5. Poblaciones leucocitarias de los pacientes

| No. Paciente | Sexo | Edad | % Células T ¹ | % Células B | % Células B de memoria total |
|--------------|------|------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| | | | V.R.>18a(48-84) V.R.<18a(50-90) | V.R.<18a (9-23) V.R >18a(7-23) | V.R <18a (13-48) V.R >18a (18-47) |
| 1 | F | 9 | 62 | 12 | 10 |
| 2 | F | 9 | 90 | 3 | 5 |
| 3 | F | 54 | 75 | 20 | 5 |
| 4 | F | 30 | 51 | 27 | 2 |
| 5 | F | 35 | 88 | 3 | 8 |
| 6 | F | 35 | 71 | 17 | 3 |
| 7 | M | 41 | 89 | 6 | 7 |
| 8 | F | 56 | 79 | 3 | 6 |
| 9 | F | 46 | 46 | 33 | 4 |
| 10 | M | 46 | 70 | 21 | 22 |
| 11 | M | 43 | 54 | 19 | 19 |
| 12 | F | 21 | 93 | 0.9 | 12 |
| 13 | M | 17 | 69 | 8 | 5 |
| 14 | F | 57 | 56 | 15 | 38 |
| 15 | F | 36 | 46 | 2 | 5 |
| 16 | F | 21 | 81 | 9 | 84 |
| 17 | F | 10 | 85 | 15 | 25 |

También se analizaron las características clínicas de estos pacientes como se puede ver en la tabla 6, se observa que estos pacientes tienen un amplio espectro de enfermedades principalmente, enfermedades sinopulmonares, gastrointestinales, en algunos casos enfermedades autoinmunes; como es característico de los pacientes con esta inmunodeficiencia. Como se mencionó anteriormente, estos pacientes se han analizado de manera previa para la determinación de algunas proteínas asociadas con CVID, como sin ICOS, TACI, CD19, BAFFR y CD40 sin encontrarse deficiencias por lo que procedimos a analizar LRBA.

¹ Valores de referencia en pacientes mexicanos. Datos obtenidos por Berrón-Ruíz y cols. Datos sin publicar

Tabla 6 Características clínicas de los pacientes

| No Paciente | Edad | Genero | Esplenomegalia | Linfadenopatía | Neumonías | Otitis | Sinusitis | Bronquiectasias | Diarrea Crónica | Enfermedades vías urinarias | Granulomas | Autoinmunidad | PTI |
|-------------|------|--------|----------------|----------------|-----------|--------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------------------|------------|---------------|-----|
| 1 | 15 | F | - | - | + | - | + | + | + | + | - | - | - |
| 2 | 15 | F | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 3 | 54 | F | - | - | + | - | + | + | - | - | - | + | - |
| 4 | 30 | F | + | + | + | - | - | + | - | - | + | - | + |
| 5 | 41 | F | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 6 | 35 | F | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + | + |
| 7 | 66 | M | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 8 | 56 | M | + | - | - | - | + | + | - | + | - | + | - |
| 9 | 46 | F | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | - |
| 10 | 46 | M | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - | + |
| 11 | 43 | M | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - |
| 12 | 21 | F | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 13 | 19 | M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 14 | 57 | F | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - |
| 15 | 36 | F | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 16 | 21 | F | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 17 | 10 | F | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |

PTI (Purpura trombocitopenica idiopática)

6.2 Análisis de la expresión de LRBA en PBMCs

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica las cuales fueron cultivadas en RPMI a 37° CO2 5% y estimuladas con fitohemaglutinina PHA (10µg/ml) por 72H. Posteriormente se obtuvo un lisado total de células y se realizó un western blot para identificar la expresión de LRBA en los 17 pacientes.

Como se mencionó anteriormente LRBA, es una proteína inducible, para comprobar esto se realizó la detección de LRBA en PBMCs obtenidas de un individuo sano estimuladas con PHA y no estimuladas con PHA como se observa en la fig. 4.

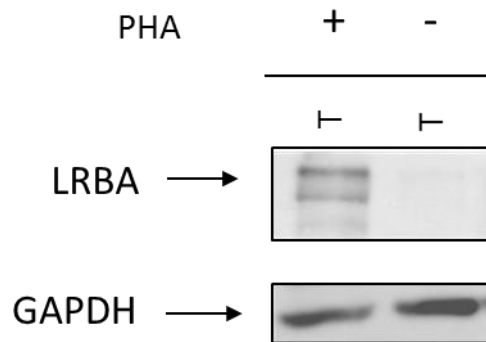


Figura 4 Expresión de LRBA en células mononucleares de sangre periférica. En el carril 1 se muestra la expresión de LRBA de una muestra de PBMCs de un testigo estimulada con PHA 72h, el segundo carril de igual manera se utilizaron PBMCs de un testigo sin estímulo. Se usó GAPDH como control de carga.

Posteriormente se realizó un western blot a los 17 pacientes analizados, de los cuales se encontraron 5 pacientes que no expresan la proteína, (Figura 5). Para corroborar que la falta de expresión no se debiera a una falla en la activación de las células se realizó una tinción para el marcador de activación temprano CD69, en las figuras 6 y 7 se puede apreciar que las células de los pacientes en los que se detectó deficiencia en la expresión de LRBA son capaces de expresar CD69 tras la activación con PHA.

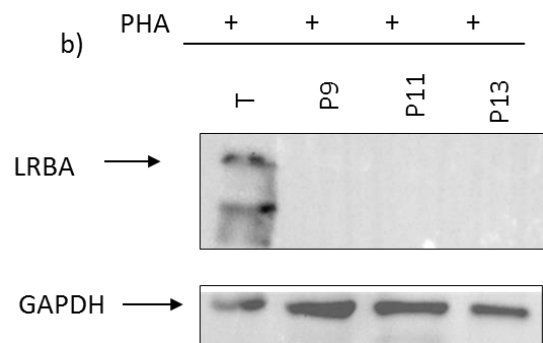
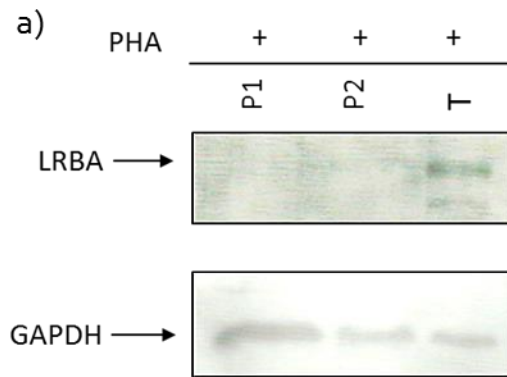


Figura 5 Expresión de LRBA en pacientes con CVID. En la figura 5a en el carril 1 y 2 se colocaron muestras de los pacientes 1 y 2 y en el carril 3 se observa la expresión de LRBA del testigo. En la figura 5b se observa en el carril 1 la expresión de LRBA en el testigo y en los carriles 2,3 y 4 las muestras de los pacientes en los que no se detectó la expresión de la proteína. Se usó GAPDH como control de carga, todas las muestras fueron estimuladas con PHA por 72h.

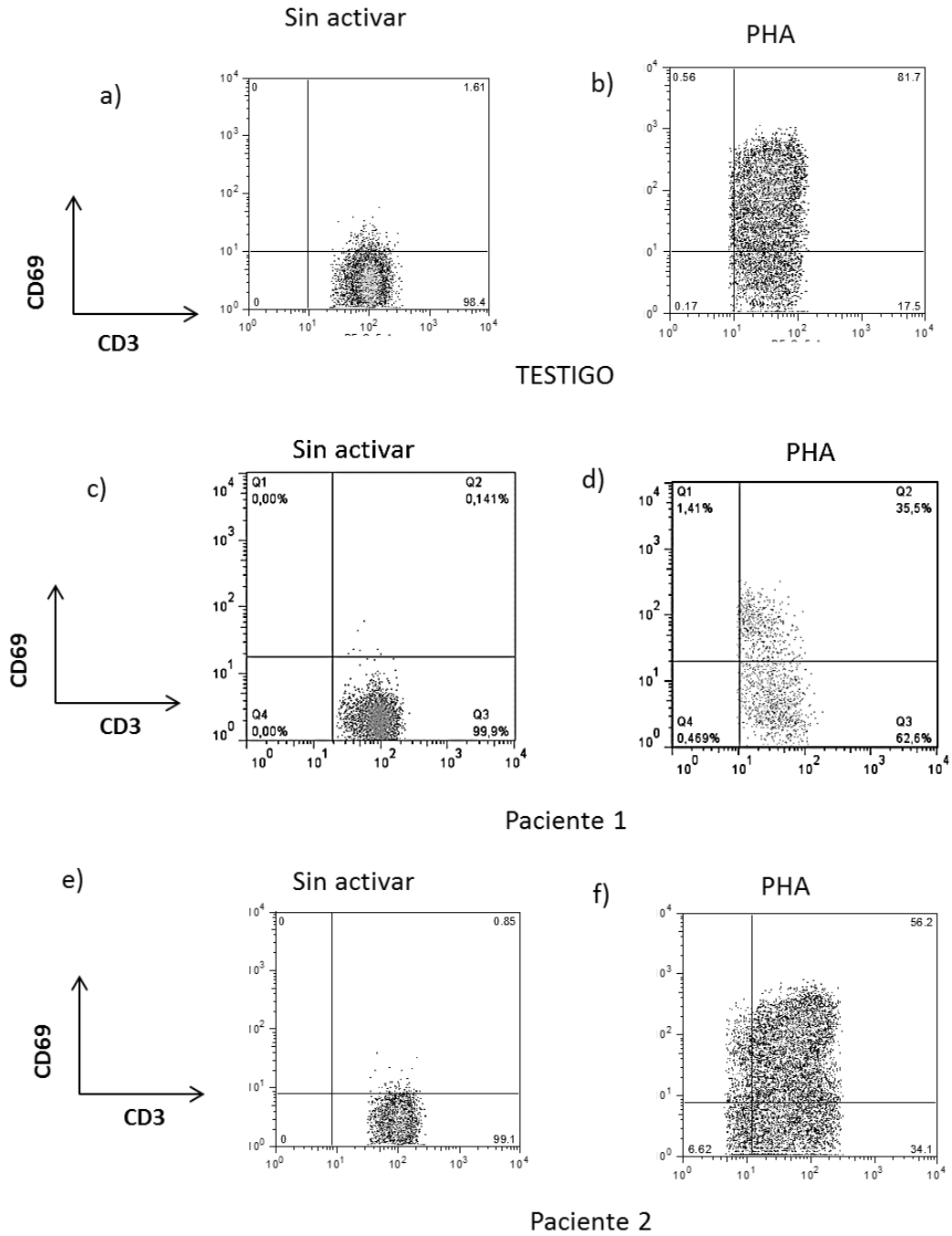


Figura 6 Expresión de CD69 en PBMCs. En el inciso a, c y e se muestran las células T del testigo y del paciente 1 y 2 respectivamente sin estímulos y las fig. b, c y f muestran la expresión de CD69 del testigo, del paciente 1 y 2 respectivamente estimuladas 12h con PHA.

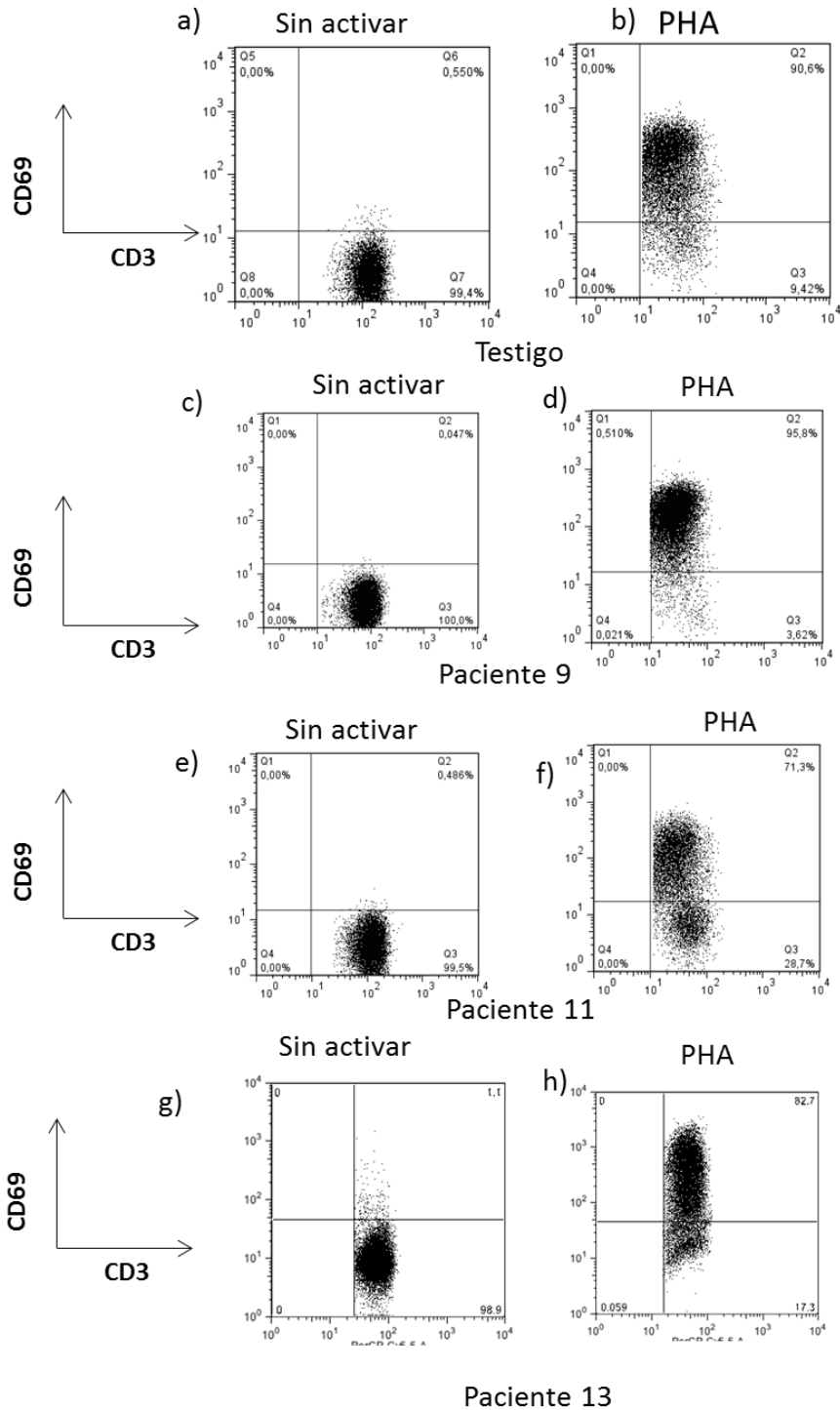


Figura 7 Expresión de CD69 en PBMCs. En el inciso a, c, e y g se muestran las células T del testigo y del paciente 9, 11 y 13 respectivamente sin estímulo y las fig. b, d, f y h muestran la expresión de CD69 del testigo, del paciente 9, 11 y 13 respectivamente estimuladas 12h con PHA.

Una vez que comprobamos que los 5 pacientes con ausencia en la expresión de LRBA activaban correctamente sus células, se procedió a analizar las características clínicas de estos, observándose que los pacientes presentan principalmente enfermedades autoinmunes y gastrointestinales (tabla 7).

Tabla 7 Características clínicas de los pacientes que no tienen expresión de LRBA

| No. Paciente | Células B de memoria % | Consanguineidad /Historia Familiar | Enfermedades gastrointestinales | Autoinmunidad |
|--------------|------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------|
| 1 | 10 | Si | Si | No |
| 2 | 5 | Si | No | Si |
| 9 | 4 | No | Si | Hematológica |
| 11 | 19 | No | Si | si |
| 13 | 5 | No | No | Hematológica |

De estos 5 pacientes, la paciente 1 no reporto historia de consanguineidad, sin embargo los padres hicieron referencia a familiares con antecedentes de deficiencia de IgA. La paciente 2 es la única que tiene un reporte de consanguineidad en segundo grado.

Las mutaciones hasta el momento reportadas de LRBA, han sido mutaciones heredadas de forma autosómica recesiva, y al ser la consanguineidad un factor importante de este tipo de herencia, comenzamos por analizar a la paciente 2. La proteína no fue detectada con el anticuerpo empleado, por lo que se procedió a amplificar el mRNA.

Análisis del mRNA de LRBA

Para amplificar el mRNA de LRBA se cuentan con 16 pares de oligos que se sobrelapan y abarcan toda la región codificante del mensajero como se observa en la figura 8.

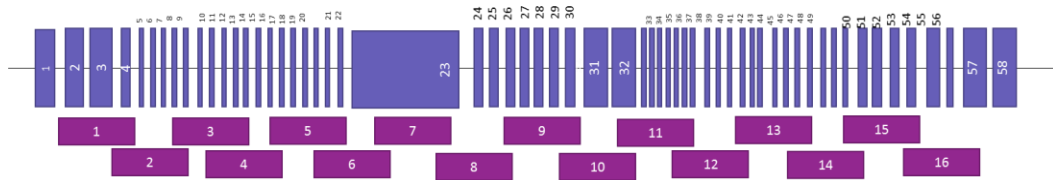


Figura 8 Esquema de mRNA de LRBA. En azul claro se representan los 58 exones, y los cuadros morados representan los 16 pares de oligos para amplificar el mRNA.

La fig. 9 muestra que los 16 pares de oligonucleótidos son útiles para amplificar el mensajero completo de LRBA.

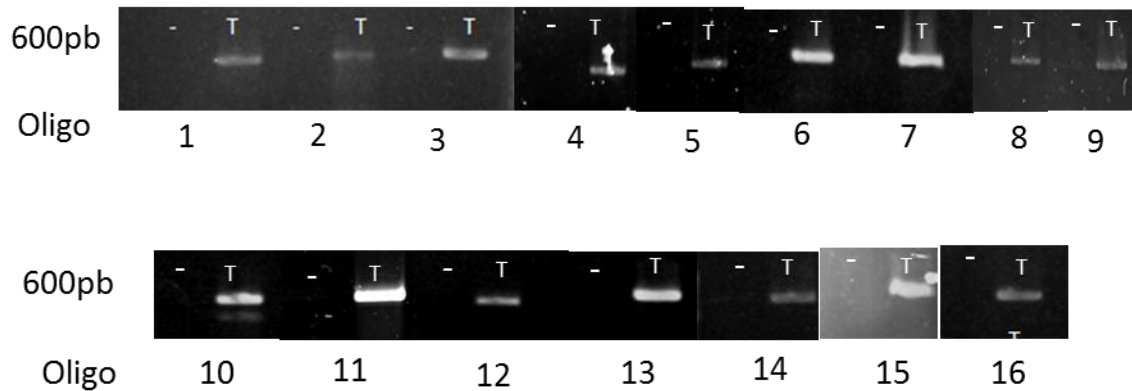


Figura 9 Amplificados del mRNA de LRBA con los 16 pares de oligos de un testigo.

Una vez probado lo anterior, se extrajo el RNA de la paciente 2, se realizó la síntesis cDNA, la fig10 muestra el amplificado de GAPDH, el cual se utilizó como control. A partir del cDNA de la paciente se lograron amplificar los pares de oligos 5,7, 10, 12, 13, 15 y 16 como se muestra en la figura 12. Los primero pares de oligos no se pudieron amplificar como se observa en la figura 11, los cuales de acuerdo al esquema de oligos (figura 7) corresponden a los exones 2-17 y del 21-22. En la figura 12 los amplificados obtenidos para el P2, incluyen los exones 16-23, 37-46, 50- 54.

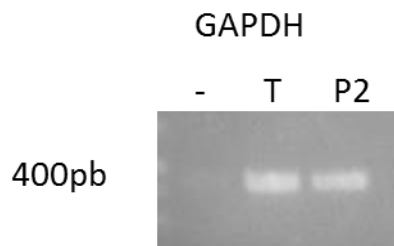


Figura 10 Amplificado de GAPDH del cDNA del paciente 2 y un testigo.

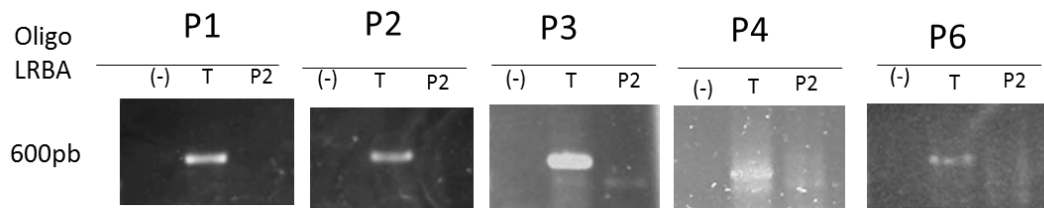


Figura 11 Amplificados del cDNA de LRBA del paciente 2 y un testigo

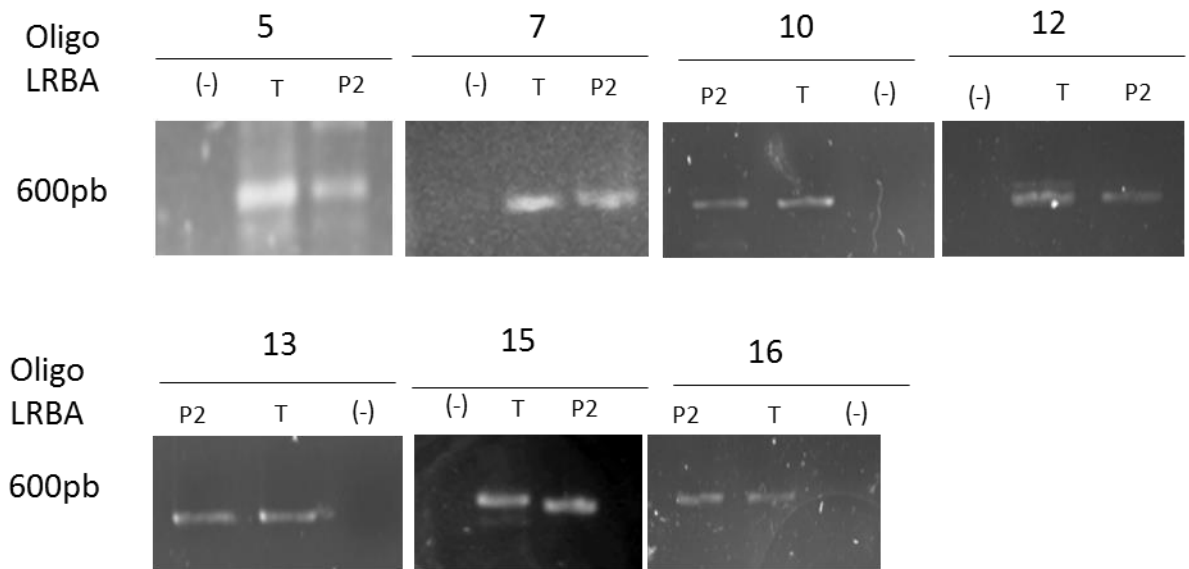


Figura 12 Amplificados del cDNA de LRBA del paciente 2 y un testigo. Se lograron amplificar los fragmentos correspondientes al inserto 5, 7, 10, 12, 13, 15 y 16.

Al no poderse amplificar los pares de oligos 8,9, 11 y 14 procedimos a amplificar los exones correspondientes a estos oligos en DNA genómico de la paciente, como se observa en la figura 13, estos exones van del 31 al 56.

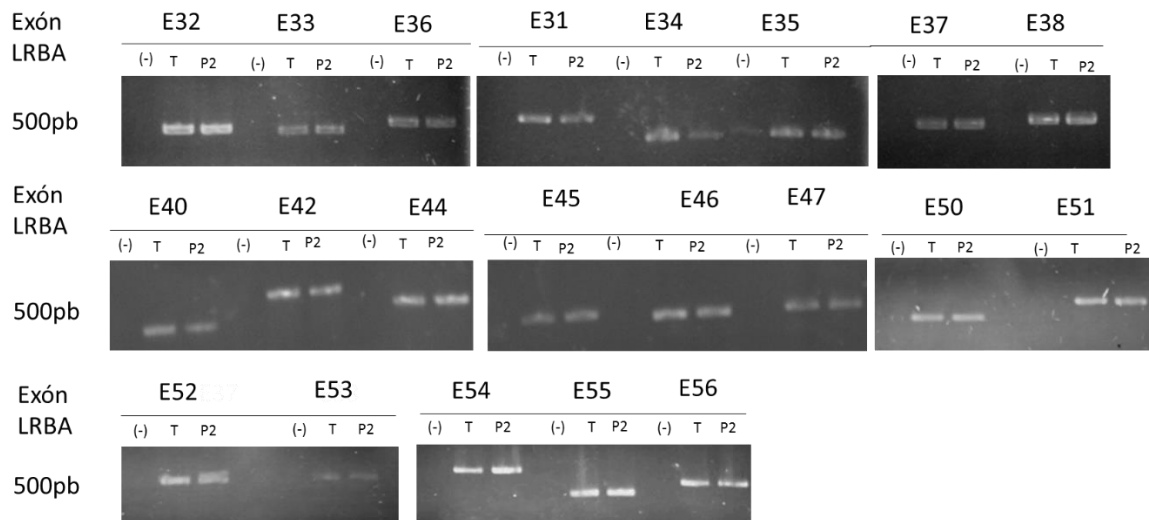


Figura 13 Amplificado de los exones 31-56 de LRBA en gDNA de la paciente 2.

VII Discusión

La inmunodeficiencia común variable, es un desorden clínico y molecularmente heterogéneo. Además de las infecciones recurrentes como se mencionó anteriormente estos pacientes pueden presentar también desordenes inflamatorios y autoinmunes, muchos casos son esporádicos, pero existen algunas familias con más de un miembro afectado (Ochs, 2014). Una pequeña proporción de pacientes presentan patrones de herencia autosómica recesiva y algunos otros de herencia autosómica dominante. Los pocos pacientes que se han encontrado asociados a una mutación, presentan mutaciones en moléculas asociadas al desarrollo de las células B (ICOS), CD19, CD20, CD21, CD81, BAFFR y LRBA.

Dentro de los 17 pacientes analizados se encontraron 5 pacientes en los que no se detectó la proteína.

Hasta el momento existen 3 reportes de mutaciones en LRBA en 11 diferentes pacientes con CVID, las principales características de estos pacientes son la manifestación de enfermedades autoinmunes, principalmente purpura trombocitopenica (López-Herrera, 2012), enfermedades gastrointestinales y un número bajo de células B de memoria. Al analizar las características clínicas de los pacientes analizados podemos observar que los pacientes tienen un porcentaje bajo de células B de memoria ya que en jóvenes de 10-16 años el valor de referencia es de 13-48%*, en este rango de edad se encuentran los pacientes 1 y 2 ambas de 9 años de edad al momento del diagnóstico de CVID; el rango normal en adultos es de 18-47%² los pacientes 9, 11 y 13 con edades al diagnóstico de 46, 43 y 18 respectivamente se encuentran por debajo de ese rango, tienen un porcentaje menor al siendo el valor normal en pacientes mexicanos. Cuatro de ellos

² Valores de referencia en pacientes mexicanos. Datos obtenidos por Berrón-Ruíz y cols. Datos sin publicar

presentan manifestaciones a autoinmunes y tres de ellos presentan enfermedades gastrointestinales (tabla 7).

De los pacientes reportados con mutaciones de LRBA, la mayoría han sido niños, los cuales fueron diagnosticados desde los 4 años de edad hasta pacientes adultos de 29 años. Lo que correlaciona con los pacientes en los que no se detectó la proteína, ya que 3 de ellos son jóvenes de 14 a 19 años (López-Herrera, 2012, Alangari, 2012 y Burns, 2012).

Las mutaciones reportadas en LRBA, hasta el momento en pacientes con COVID se heredan de forma autosómica recesiva y se han reportado exclusivamente en pacientes con familiares con algún grado de consanguineidad. De los 5 pacientes solo una menciona tener consanguineidad.

La falta de expresión de la proteína en estos pacientes no implica que no se esté traduciendo, puede existir algún defecto en cualquier punto de la formación de la proteína. Por lo que se procedió a analizar la expresión del mensajero, comenzando con la paciente 2, al ser la paciente que tiene más características clínicas indicativas de una probable mutación en *LRBA*, de acuerdo a lo reportado. Se lograron amplificar fragmentos del mRNA correspondientes a los exones 16-23, 30-32, 37-46 y del 50-57 (figura 12). No se lograron amplificar los 21-26 (figura 11), solo se amplificó un fragmento del exón 23, como se observa en la figura 8 es el exón más grande; se amplificaron a partir del exón 31 al exón 57 de una muestra de gDNA de la paciente figura 13. El anticuerpo utilizado reconoce la secuencia de aminoácidos correspondiente a los exones 21-24, lo que puede ser un indicativo de que la mutación se encuentra en esa región.

Aún es necesario amplificar esos exones a partir del DNA genómico para descartar que sea una delección del gen en esa región, así mismo es necesario también secuenciar esa región para corroborar si se trata de una mutación en ambos alelos o sea una mutación compuesta.

La ausencia de LRBA en los 5 pacientes podría explicar el fenotipo y las características clínicas de estos pacientes. LRBA es una proteína citosólica expresada en varios tejidos, se ha demostrado en linfocitos B, después de ser activados LRBA es capaz de traslocarse a la membrana de vesículas como lisosomas, la red trans Golgi y el retículo endoplásmico (Wang, 2001), también se demostró que LRBA está relacionada con la endocitosis. La endocitosis es importante en la señalización de los receptores de los linfocitos (Wang, 2001), lo que podría hacer posible que estos pacientes tengan defectos en la transducción de señales que lleve a una mala activación de los linfocitos B, así como la síntesis de las inmunoglobulinas; sin embargo, dicha hipótesis debe comprobarse, pues a la fecha, el mecanismo molecular por el cual LRBA media la activación, la diferenciación y la producción de anticuerpos en las células B es desconocido.

Por otra parte López Herrera y cols. demostraron que pacientes con deficiencia de LRBA tienen problemas con la apoptosis y la autofagia, se ha demostrado que pacientes con enfermedades autoinmunes como el Lupus eritematoso tienen problemas en estos dos aspectos (Levine, 2008), lo que correlaciona con algunos de los pacientes analizados en los que no se detectó la proteína.

VIII Conclusiones

Se encontraron 5 pacientes con deficiencia en la expresión de LRBA dentro de una cohorte de 17 pacientes. Estos pacientes presentaban pocas células B de memoria y uno de los siguientes síntomas: autoinmunidad y/o problemas gastrointestinales.

La deficiencia de LRBA debería ser considerada en pacientes con CVID que presenten síntomas de CVID a una edad temprana así como un fenotipo clínico más severo, aparte de las infecciones recurrentes características de estos pacientes, en particular en pacientes que presenten autoinmunidad.

Dentro los pacientes estudiados aun es necesario caracterizar las mutaciones o el defecto genético que conlleva a la ausencia de la proteína. Así mismo es necesario entender mejor la función de LRBA, para poder entender las alteraciones celulares en estos pacientes.

IX BIBLIOGRAFÍA

1. Alangari A, Alsultan A, Adly N, Massaad M, Shakir I, Alijebreen A, Raddaoui E, Almomeme A, AL-Muhsen S, Geha R y Alkuraya F. LPS-responsive beige-like ancor (LRBA) gene mutation in a family with inflammatory bowel disease and combined immunodeficiency. 2012 *J Allergy Clin Immunol* 130(2), 481-488.
2. Abolhassani H, Sagvand B, Shokuhfar T, Mirminachi B, Rezaei N y Aghamohammadi A. A review on guidelines for management and treatment of common variable immunodeficiency. 2013 *Expert Rev. Clin. Immunol.* 9(6), 561–575
3. Aghamohammadi A, Abolhassani H, Eibl M, Espanol T, Kanegane H, Miyawaki T, Mohammadinejad P, Pourhamdi S, Wolf H, Parvaneh N, Herz W, Durandy A, Stiehm R, Plebani A. Primary Immunodeficiencies Diseases: Definition, diagnosis, and management. 2012 Ed Springer. Capitulo 3 pp113 122.
4. Bacchetta R y Notarangelo L. Immunodeficiency with autoimmunity: beyond the paradox. 2013. *Frontiers in immunology.* 4(77)
5. Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher A J, Gaspar H B. 2007. Translational mini-review series on immunodeficiency: Molecular defects in common variable immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 149:401-409.
6. Berrón-Ruiz L, López-Herrera G, Vargas-Hernández A, Mógica-Martínez D, García-Latorre E, Blancas-Galicia L, Espinoza-Rosales F y Santos-Argumedo L. Lymphocytes and B-cell abnormalities in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Allergol Immunopathol.* 2013 (Madr).
7. Bradshaw CR, Surendranath V, Henschel R, Mueller MS, Habermann BH. HMMerThread: detecting remote, functional conserved domains in entire genomes by combining relaxed sequence-sequence-database searches with fold recognition. *PLoS One.* 2011; 6: e17568.
8. Beirer K, Hutloff A, Dittrich A, Heuck CH, Rauch A, Büchner K, Ludewig B, Ochs H, Mages H, Krocze R. 2000. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur. J. Immuno;* 30: 3707
9. Burns S, Zenner H, Plagnol V, Curtis J, Mok K, Eisenhut M, Kumararatne D, Doffinger R, Trasher A y Nejentsev S. LRBA gene deletion in a patient presenting with autoimmunity without hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2012 130(6) 1428-1432
10. Bryan A, Calver N, Toubi E, Webster A, Farrant J. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleuk-2. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 56. 239-48
11. Burgess A, Mornon JP, de Saint-Basile G, Callebaut I. A concanavalin A-like lectin domain in the CHS1/LYST protein, shared by members of the BEACH family. *Bioinformatics.* 2009; 25: 1219-1222.
12. Castigli E, Wilson S, Garibay L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, Geha R. TAC1 is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nature Genetic,* 2005; 37: 829.

13. Carsetti R, Rosado M, Donnanno S, Guazzi V, Soresina A, Meini A, Plebani A, Aiuti F, Quinti I. The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: 412.
14. Chen, K., Coonrod, E. M., Kumanovics, A., Franks, Z. F., Durtschi, J. D., Margraf, R. L., Wu, W., Heikal, N. M., Augustine, N. H., Ridge, P. G., Hill, H. R., Jorde, L. B., Weyrich, A. S., Zimmerman, G. A., Gundlapalli, A. V., Bohnsack, J. F., Voelkerding, K. V. Germline mutations in NFKB2 implicate the noncanonical NF-kappa-B pathway in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 2013 93: 812-824.
15. Conley M E, Notarangelo L D, Etzioni A. Diagnostic criteria for Primary Immunodeficiencies. *Clin. Immunol.* 1999; 93: 190.
16. Conley, M.E., Broides, A., Hernandez-Trujillo, V., Howard, V., Kanegane, H., Miyawaki, T., and Shurtleff, S.A. (2005). Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development. *Immunol. Rev.* 203, 216–234.
17. Cullinane A, Schaffer A y Huizing M. 2013 Review The BEACH Is Hot: A LYST of Emerging Roles for BEACH-Domain Containing Proteins in Human Disease. *Traffic* 2013; 14: 749–766
18. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol.* 1999; 92:34–48.
19. Driessen G, Van Zelm M, Van Hagen P, Hartwig N, Trip M, Warris A, Vries E, Barendregt B, Pico I, Hop W, Van Dongen Jy Van der Burg M. B-cell replication history and somatic hypermutation status identify distinct pathophysiologic backgrounds in common variable immunodeficiency. *Blood*, 2011; 118: 6814-6823
20. Feuchter AE, Freeman JD, Mager DL. Strategy for detecting cellular transcripts promoted by human endogenous long terminal repeats: identification of a novel gene (CDC4L) with homology to yeast CDC4. *Genomics* 1992; 13:1237 – 1246.
21. Gamberale R. Ontogenia B: el delicado equilibrio entre la diversidad y la autoinmunidad. *Revista Química Viva*, 2004; 3: 1-10
22. Gebauer D, Li J, Jogl G, Shen Y, Myszka D y Tong L. 2004 Crystal Structure of the PH-BEACH Domains of Human LRBA/BGL[†] *American Chemical Society Volume 43, Number 47 November 30, 2004.*
23. Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Drager, R., Eibel, H., Fischer, B., Schaffer, A. A., Mages, H. W., Kroczeck, R. A., Peter, H. H. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. 2003 *Nature Immun.* 4: 261-268, 2003.
24. Haymore B, Mikita C y Tsokos G. Common variable immune deficiency (CVID) presenting as an autoimmune disease: role of memory B cells. *Autoimmunity reviews* 2008; 7: 09-312
25. Hou T, Li Y, Wang W. Prediction of peptides binding to the PKA RIalpha subunit using a hierarchical strategy. *Bioinformatics.* 2011; 27: 1814-1821

26. Kuijpers, T. W., Bende, R. J., Baars, P. A., Grummels, A., Derks, I. A. M., Dolman, K. M., Beaumont, T., Tedder, T. F., van Noesel, C. J. M., Eldering, E., van Lier, R. A. W. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J. Clin. Invest.* 120: 214-222, 2010.
27. Ko J, Radigan L y Cunningham-Rundles C. Immune competence and switched memory B cells in common variable immunodeficiency *Clinical Immunology* 2005; 116: 37 – 41
28. LeBien T y Tedder T. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008; 112: 1570-1580.
29. Levine, B, y Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of the disease. *Cell* 132:27-42, 2008
30. Liu, Y., Hanson, S., Gurugama, P., Jones, A., Clark, B., Ibrahim, M. A. A. Novel NFKB2 Mutation in early-onset CVID. *J. Clin. Immunol.* 2014 34: 686-690.
31. Losi CG, et al. Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2005 25:496–502.
32. López-Herrera, G., Tampella, G., Pan-Hammarstrom, Q., Herholz, P., Trujillo-Vargas, C. M., Phadwal, K., Simon, A. K., Moutschen, M., Etzioni, A., Mory, A., Srugo, I., Melamed, D., and 21 others. *Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity.* *Am. J. Hum. Genet.* 90: 986-1001, 2012.
33. Notarangelo L, Fischer A, Geha R, Casanova J, Chapel H, Conley M, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammartröm L, Nonoyama S, Ochs H, Puck J, Roifman C, Seger R y Wedgwood J. Primary immunodeficiencies: 2009 update: The International Union of Immunological Societies (IUIS) Primary Immunodeficiencies (PID). *J. Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 1161–1178.
34. Reiser M, Kunyu L, Lockey R y Wang J. Lipopolysaccharide Responsive Beige-Like Anchor subcellular localization involving in vesicle trafficking responsive to lipopolysaccharide. *Austin Journal of Clinical Immunology.* 2014. 1(4):8
35. Park M, Li J, Maddox D, Abraham R. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *The Lancet* 2008; 372:489-502
36. Salzer, E., Santos-Valente, E., Klaver, S., Ban, S. A., Emminger, W., Prengemann, N. K., Garncarz, W., Mullauer, L., Kain, R., Boztug, H., Heitger, A., Arbeiter, K., Eitelberger, F., Seidel, M. G., Holter, W., Pollak, A., Pickl, W. F., Forster-Waldl, E., Boztug, K. B-cell deficiency and severe autoimmunity caused by deficiency of protein kinase C-delta. *Blood* 121: 3112-3116, 2013
37. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, Debre P, Schmitt C, Oksenhendler E. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol.* 2003; 23:385–400.
38. Sean Deane Carlo Selmi Stanley M. Naguwa Suzanne S. Teuber. Common Variable Immunodeficiency: Etiological and Treatment Issues

39. Scharenberg AM, Hannibal MC, Torgerson T, et al. Common Variable Immune Deficiency Overview. 2006 Jul 5. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1299>
40. Spickett G, Farrant J, North E, Zhang J, Morgan L, Webster B. 1997. Common variable immunodeficiency: how many diseases?. *Immunology Today*; 8:325-8.
41. Suryani S, Fulcher D, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, Shaw P, Gibson J, Williams A y Tangye S. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood*, 2010; 115: 519-529
42. Van Zelm M C, Reisli I, van der Burg M, Castano D, van Noesel C J, Vantol M J, Woellner C, Grimbacher B, Patino P J, van Dongen J J, Franco J L. 2006. An antibody deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N. Engl. J. Med*; 354: 1874.
43. van Zelm, M. C., Smet, J., Adams, B., Mascart, F., Schandene, L., Janssen, F., Ferster, A., Kuo, C.-C., Levy, S., van Dongen, J. J. M., van der Burg, M. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J. Clin. Invest.* 120: 1265-1274, 2010.
44. Thiel, J., Kimmig, L., Salzer, U., Grudzien, M., Lebrecht, D., Hagen, T., Draeger, R., Voelxen, N., Bergbreiter, A., Jennings, S., Gutenberger, S., Aichem, A. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J. Allergy Clin. Immun.* 129: 801-810, 2012.
45. Vries E y Driessen G. Educational Paper. Primary immunodeficiencies in children: a diagnostic challenge. *Eur J Pediatr.* 2011 170: 169-177
46. Wang, J.-W., Howson, J., Haller, E., Kerr, W. G. 2001. Identification of a novel lipopolysaccharide-inducible gene with key features of both a kinase anchor proteins and chs1/beige proteins. *J. Immun.* 166: 4586-4595.
47. Wang JW, Gamsby JJ, Highfill SL, Mora LB, Bloom GC, Yeatman TJ, et al. Deregulated expression of LRBA facilitates cancer cell growth. *Oncogene.* 2004; 23: 4089-4097.
48. Wang JW y Lockey R. Lipopolysaccharide-Responsive Beige-like Anchor (LRBA), a Novel Regulator of Human Immune Disorders. *Austin J Clin Immunol.* 2014;1(1): 9.
49. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth CH, Guido W, Hermann E, Schlesier M, Peter H. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27^{pos}IgM^{neg}IgD^{neg}) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood.* 2001; 99: 1544.
50. Warnatz K y Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry part B* 2008, 74B: 261-271
51. Warnatz, K., Salzer, U., Rizzi, M., Fischer, B., Gutenberger, S., Bohm, J., Kienzler, A.-K., Pan-Hammarstrom, Q., Hammarstrom, L., Rakhmanov, M., Schlesier, M., Grimbacher, B., Peter, H.-H., Eibel, H. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 106: 13945-13950, 2009.

52. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K. 2008. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*; *111*: 77-85.
53. Xiao Y, Hendriks J, Langerak P, Jacobs H y Borst J. CD27 is acquired by primed B cells at the centroblast stage and promotes germinal center formation. *J. Immunol.* 2004; *172*:7432-7441
54. Xiao X, Miao Q, Chang C, Gershwin M, Ma X. 2014 Common variable immunodeficiency and autoimmunity – an inconvenient truth. *Autoimmun Rev*
55. Yong P, Thaventhiran J y Grimbacher B. A rose is a rose but CVID is not CVID. Common Variable Immune Deficiency (CVID), what do we know in 2011. *Advances in Immunology*, 2011; *111* 667-710

Anexo 1

Diagnóstico diferencial de hipogammaglobulinemia

| | |
|------------------------------------|---|
| 1.-Inducida por fármacos: | <ul style="list-style-type: none">• Agentes antipalúdicos• Captopril• Carbamazepina• Glucocorticoides• Fenclofenaco• Las sales de oro• Penicilamina• Fenitoína• La sulfasalazina |
| 2.-Trastornos genéticos | <ul style="list-style-type: none">• Ataxia Telangiectasia• Formas autosómicas de SCID• Híper IgM• Deficiencia de transcobalamina II e hipogammaglobulinemia• Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X• Trastorno linfoproliferativo ligado a X (asociado a EBV)• SCID ligada al X• Algunos trastornos metabólicos• Las anomalías cromosómicas• Síndrome cromosoma 18q• Monosomía 22• La trisomía 8• La trisomía 21 |
| 3.-Enfermedades Infecciosas | <ul style="list-style-type: none">• VIH• Rubéola congénita• Infección congénita por CMV• Infección congénita por <i>Toxoplasma gondii</i>• Epstein-Barr Virus |
| 4.- Malignidad | <ul style="list-style-type: none">• Leucemia linfocítica crónica• Inmunodeficiencia con timoma• Linfoma no Hodgkin• Células B malignas |
| 5.-Trastornos sistémicos | <ul style="list-style-type: none">• Inmunodeficiencia causada por hipercatabolismo de inmunoglobulinas• Inmunodeficiencia causada por la pérdida excesiva de inmunoglobulinas (nefrosis, quemaduras graves, diarrea, linfangiectasia grave). |

Anexo 2

Oligos para la amplificación del gDNA de LRBA

| Exón | Forward | Reverse | Tm° | Tiempo de extensión | Extras |
|------|-----------------------------|-----------------------------|-----|---------------------|-------------|
| 1 | ACACACCTGGTGCTACCAGAG | CTCAGGCACCTGAGATTGAC | 61 | 40'' | Betaina 1mM |
| 2 | TTGTCCCCTCAAACCTAAAAC | AGGTGAGTAGAATTTGTGTCC C | 64 | 40'' | |
| 3 | ATGTGGAGGAAGAATGTGAGT AG | CTAAAGTTCTAGGTGCATGCTAC | 57 | 40'' | |
| 4 | AGCATGCACCTAGAACTTTAGT G | TGTCCAAGTATGGCACGAGTAG | 57 | 40'' | |
| 5 | GCCCTACAGCATTACAAAACT G | ATTCCATTGCTGACCCAAGCTG | 57 | 40'' | |
| 6 | CCTGATAAAGAGTCTTCTCCAG | GATCATGTACCTTTTGTGGCTTG | 57 | 40'' | |
| 7 | CCTTAGGCTATTGCATTACCTC | CCTTTTCCACCACTAGATTCC | 57 | 40'' | |
| 8 | GGCCCATGAATAGATATTGTTCC | TAAATGAACCAATGACCCACTCC | 57 | 40'' | |
| 9 | TGGCTTGAGAACACATGTGTTTC | TCATGGAGAACAGATATCCATC C | 57 | 40'' | Betaina 1mM |
| 10 | CGAGGGGTCCTTATATAATAC | TCCTCCAATTGAATGCATTGCAC | 57 | 40'' | |
| 11 | TGAATCATCTCCTAAGGACAACC | TGATGAAATTAACCCTCACAGCC | 57 | 40'' | Betaina 1mM |
| 12 | TGTTGGAAGCAGTTTTAGTGGA G | TTTGATAGAGGAATGGAGGCAA G | 57 | 40'' | |
| 13 | TTGCCTCATTCTCTATCAAAC | GGAACAAAGCTACAGTTACTAG G | 57 | 40'' | |
| 14 | TGTGTCAGTGAGTATGTGTTGTC | ACCAGCACAAGTAGTATTCTTCC | 57 | 40'' | |
| 15 | AAAAGGTCATTCTGTAGGAGAC C | ATGAGTGAACACACTTGAGCTA C | 57 | 40'' | |

| | | | | | |
|-----|-----------------------------|-----------------------------|----|------|----------------|
| 16 | GTACTGATGTCTTTAGTGCTTCC | CCTAAGTAGACACATTTACTCCC | 57 | 40'' | |
| 17 | CCCCGCACAAAAAAGAAATTG G | GTAGCTCTATAATAGCACTCACC | 57 | 40'' | |
| 18 | TCATTGAAAGGAACTCTAGCCT G | TCTTGAATGCAAGCTGTCCAAAC | 57 | 40'' | |
| 19 | AGTTGGGAGAGTAATTGAGTTG G | TTAGCCGGGTTAGGTGGTGTG | 57 | 40'' | |
| 20 | AGGAGATGTGGCTGCATTTTTA G | TGCCTGACATCACTAAATAGCAC | 57 | 40'' | Betaina 1mM |
| 21 | TCTCAGAGAGAGTAAGCAGTTT C | CTCCCTTTCCCCCGAAAAAG | 57 | 40'' | |
| 22 | AAATGTGTTTCTTTTTCGGGGG | CGCACTACTTTTTCAGCACCC | 57 | 40'' | |
| 23a | GTGGTTTCATGCTGTGTTACTTG | GACAGTCATTGAATCTTTGCCAG | 57 | 40'' | Betaina 1mM |
| 23b | GACAAATGAGACAAGGAATGCA G | TCAGAGACACTACCATGACAAT C | 57 | 40'' | |
| 23c | TCAGCTATGTCACCAGAACTAC | AACTGCCAAACTGTGCTAAT G | 57 | 40'' | Betaina 1mM |
| 24 | CCACTTCATAATCCAATGCCAC | CGTGCCATAAAATTGCTACAGG | 57 | 40'' | |
| 25 | AATGCCTGCTGCATCATCTTCC | AGGTCTCTCAAGTAAAAGATC C | 57 | 40'' | |
| 26 | TCTGTTGCTCCTCCTCATCCC | CTTGCCCATCCAACCTACCAAC | 57 | 40'' | Betaina 1mM |
| 27 | AGGAATAAGCTGAATGTCGTCT G | GAAGGAAAAGGCATCACAGAA AC | 57 | 40'' | Betaina 1mM |
| 28 | TTCCTGCATGCCATCTTTCTCC | TCTAGACCTTTCTATCTCTGCTC | 57 | 40'' | |
| 29 | CCACTGCATCTGACCTGTTTTC | ATGCTCTCCCTTAATTTGCACAG | 57 | 40'' | Betaina 1mM |
| 30 | TGCACCCACTCAGTACATTCTG | TGTGGATTTTCGGCTACACAGG | 57 | 40'' | |
| 31 | GCAGTGCTTTACAATTCTTGTTG | TACAATGGTTTCTAATGTGCCCC | 57 | 40'' | Betaina 1mM |

| | | | | | |
|----|-----------------------------|-----------------------------|--------|--------|----------------|
| 32 | GATAATTGAGCTTGTAGCTGAG G | ATGTTCCCAAGCCTCTAAATGTC | 57 | 40'' | |
| 33 | CTGCTATGCATAGCAGTAATGTC | ATGAGAAACCTTGTCAAAGGCT G | 57 | 40'' | |
| 34 | TGGTAGTTTTGAAGCCAGCTTTG | CACTTCCTCTCATGCTTGCTTC | 57 | 40'' | Betaina 1mM |
| 35 | TGTTACCTTCTTTCCAGCTCC | CAGAGCTCCATTACATTACTGAC | 57 | 2'30'' | Betaina 1mM |
| 36 | AGCTAATCTGCTATTGCCAGAA G | AAGAGACATGTAATCTCTCCA G | 57 | 40'' | |
| 37 | GAGACAGCAGATCACTAAATCT C | ACTGATTTTCTCCTCCCTTTGG | 57 | 40'' | |
| 38 | GGAGGGAGAATTAAGTGAAG G | GAATGTGTCGCTTAAAAGGAGA C | 57 | 40'' | |
| 39 | TATATCTGGAAGGGGAGGATTT G | GACAACTGAAGAATCTCTACA C | 57 | 40'' | |
| 40 | AATCACTTTCTCCACTGTAGCTG | TAAAGGAGAAACTGTAGAAGG GG | 57 | 40'' | |
| 41 | AAGTAGTTGGCAGGCAGTTCAG | CATTGCATATAAGCCAAGGCAA C | 57 | 40'' | Betaina 1mM |
| 42 | TGTGCTTTCTGAATGAGTACTG | AGGTCACTAGAACAGAAGGTGG | 2'30'' | 40'' | Betaina 1mM |
| 43 | GCAGCTTCATGTCACATTATCTC | TACTCTGCTAGACACCATACCC | 57 | 40'' | Betaina 1mM |
| 44 | GGCACTGTAATGACAGCTTACC | ACTGAATCTATATCCCCTTGCTC | 57 | 40'' | |
| 45 | TGGATACTGAGAATGATGTCTG G | TAGTAGAAGAGAGGAAGTGTCT C | 57 | 40'' | |
| 46 | CCCAATATGATACTGTGTTGCAG | GCATCTGAAGGGGCAAATTTAA G | 57 | 40'' | |
| 47 | TCTTGAAAGGAAGGCTACCTG | GAGAGACATGCTGTAATTCTTG G | 60 | 2' | |
| 48 | TCTTATGAGAAACTGTGACAGG G | CACTTTCAGTTAGTCCTATCACC | 60 | 2' | |
| 49 | TTTTCCAGGCTGGAGTGAAGTG | CTGGGTTCAAGTTCCTTGCTAGG | 62 | 2' | |

| | | | | | |
|----|-----------------------------------|-------------------------------------|----|--------|--|
| 50 | CCCACTGTGAAAACACAGGTTG | TAACATCTGCTGTTGTTAGCAG | 57 | 40'' | |
| 51 | CAGATCATGACTGCTGTTTCTAC | TCACGTGGGCCTTTTTTAAGCC | 57 | 40'' | |
| 52 | TGATGGCACAGTTCAGAGCGG | ATGAAATACCAGCATAGCCACA G | 57 | 40'' | |
| 53 | ACCCACATTTTTCCAGCAATTGG | TTTGAAGAGGGAAAACAATGCC C | 57 | 40'' | |
| 54 | TGTAATGATACAGTGCCATGGT C | GGTGACAGCTATTTCCAATGAA G | 57 | 40'' | |
| 55 | TAGTCCTAAAGTAGGATTGCTG G | GGACCTGCAATGTGGCTAGTG | 57 | 40'' | |
| 56 | TGAGATCTGGCAAACATGAAGA G | TGAAGTGTGTGAGCCTTGCTG | 67 | 2'30'' | |
| 57 | CTAAAACTCCTGAGGATCTCTC | TCCCTCTGCAGTTTTACTATAC | 57 | 40'' | |
| 58 | ACCTTAGTCCCAAAATTGGA G | TACAGGACCAAAATTACAGCAT C | 57 | 40'' | |

ANEXO 3

Preparación de soluciones

- PBS 10x

Para 1 litro

- NaCl 80g
- KH_2PO_4 2g
- Na_2HPO_4 anhidro 11.5g
- KCl 2g
- H_2O aforar a 1000ml
- Filtrar en membrana de 0.22

- PBS 1x

Hacer una dilución 1:10 de la solución PBS 10x

- Solución fijadora

— Paraformaldehido 1%

- PBA (PBS-Azida).

Albúmina 0.5%
Azida de sodio 0.05%

Disolver en PBS 1x.

- Líquido de Turk

Ácido acético glacial 3.0 ml

Agua destilada c.b.p. 100 ml

Adicionar 1 ó 2 gotas de azul de metileno

- Tris-ácido acético- EDTA 50X (TAE)

Disolver en 1 L de agua las siguientes sales:

-Tris.base 242 g

-Ácido acético glacial 57.1 ml

-EDTA 18.6g

- **TAE 1X**

Preparar 1L de una dilución 1:50 de TAE 50X

- Gel de Agarosa

Agarosa 1%

- Tris- Acido Bórico- EDTA (TBE) 10X

Tris-base 108 g

Acido bórico 55 g

EDTA 9.3 g

Agua destilada c.b.p. 1L

- Regulador de carga para DNA

Sacarosa 20 g

Orange G 0.1 g

Agua destilada c.b.p. 50 ml