

## Estudio fenotípico y molecular en 150 pacientes mexicanos con inmunodeficiencias humorales

López-Herrera G<sup>1</sup>, Alemán-López C<sup>1</sup>, Vargas-Hernández A<sup>2</sup>, Carrillo-Tapia E<sup>1</sup>, García-García E<sup>1</sup>, Segura-Méndez N H<sup>3</sup>, Nuñez-Nuñez M. E<sup>4</sup>, Zarate-Hernández M C<sup>5</sup>, Gómez-Hernández N<sup>6</sup>, Mogica-Martínez D<sup>7</sup>, Yamazaki-Nakashimada M A<sup>1</sup>, Staines-Boone T A<sup>8</sup>, Espinosa-Rosales F J<sup>1</sup>, Santos-Argumedo L<sup>2</sup>, Berrón-Ruiz L<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias, Instituto Nacional de Pediatría SSA, Ciudad de México; <sup>2</sup>Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN, Ciudad de México; <sup>3</sup>Servicio de Alergia e Inmunología Clínica, Hospital de Especialidades del Centro Médico Siglo XXI, IMSS, Ciudad de México; <sup>4</sup>Servicio de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica, Hospital Civil de Guadalajara “Dr. Juan I. Menchaca”, Guadalajara, Jalisco; <sup>5</sup>Departamento de Alergias, Hospital Universitario Monterrey; <sup>6</sup>Servicio de Alergia e Inmunología. Hospital de Occidente CMN, IMSS, Guadalajara, Jalisco; <sup>7</sup>Servicio de Alergia e Inmunología, Centro Médico “La Raza”, IMSS, Ciudad de México, <sup>8</sup> Servicio de Alta Especialidad, Centro Médico Noreste IMSS, Monterrey, Nuevo León, México  
Email: lberronruiz@yahoo.com.mx

### RESUMEN

En las inmunodeficiencias humorales (IDH) el defecto se limita a la formación de anticuerpos, ya sea por una alteración en el desarrollo de las células B, por una falla en la respuesta de las células T dando lugar a la ausencia de todas las clases de anticuerpo ó la ausencia selectiva de una clases o subclase de anticuerpos. Se estudiaron 152 pacientes con probable IDH; se les realizó tinciones para poblaciones leucocitarias; a los pacientes con agammaglobulinemia ligada al X (XLA) n= 70, se les realiza la expresión de la proteína BTK; a los pacientes con probable inmunodeficiencia común variable (IDCV) n=70, se les determino las subpoblaciones de células B y a los de síndrome de hiperIgM n= 12, se les determino la expresión del ligando de CD40 (CD154). Todo por citometría de flujo. A los pacientes con datos que orienten diagnóstico de XLA e hiperIgM se les realizó el estudio molecular para detectar la mutación en los genes *BTK* y *CD40L*. De los 70 pacientes con XLA se han encontrado 27 mutaciones en el gen de *BTK* que se encuentran entre el exon 7 a 18 y que afectan a los dominios SH2 y Kinase de la proteína; 8 con mutaciones en *CD40L* que se encuentran en el exon 4 y 5 y afectan al dominio con homología a TNF; y de los 70 pacientes con IDCV 70 % no expresan células B de memoria, se empieza la búsqueda de genes candidatos como *LRBA*, *CTLA-4*, *BAFFR*, *ICOS* que puedan explicar el fenotipo clínico.

La citometría de flujo es una herramienta que ayuda a orientar el diagnóstico de IDH, y con la búsqueda de las mutaciones en los genes se confirma el diagnóstico; esto es importante para un tratamiento oportuno y una mejor calidad de vida.

**Palabras clave:** inmunodeficiencia primarias (IDP's), agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX), inmunodeficiencia común variable (IDCV), síndromes de hiper IgM ligada al cromosoma X (HIGMLX).

## INTRODUCCIÓN

Las inmunodeficiencias primarias (IDP's) son debidas a defectos intrínsecos de las células que integran el sistema inmunitario, se deben a defectos genéticos y se presentan fundamentalmente en forma de infecciones recurrentes. La clasificación de las IDP's más actualizada está bajo la revisión de la Organización Mundial de la Salud. La última clasificación se publicó en el 2015 y divide a las IDP's en ocho grupos principalmente, dependiendo de la línea celular ó proteína del sistema inmune afectado. Dentro de la clasificación se encuentra las Inmunodeficiencias Humorales (IDH's), es el grupo con más casos reportados; el defecto se limita a la formación de anticuerpos, ya sea por una alteración en el desarrollo intrínseco de la célula B, por un fallo en la respuesta de las células T o defectos que afecten la activación de las células B. Los defectos moleculares de este grupo de IDP's son muy heterogéneos, pudiendo afectar cualquier elemento de la respuesta humoral, dando lugar a una falta de producción de todas las clases de anticuerpos o la deficiencia selectiva de una clase o subclase de anticuerpo. Entre las IDH's se encuentran las Agammaglobulinemia LX (ALX), Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) y los Síndrome de HiperIgM LX (HIGMLX).<sup>1</sup>

En la ALX los pacientes que la padecen presentan niveles muy bajos de todas las inmunoglobulinas en suero, lo cual es el resultado de un bloqueo en la diferenciación de los linfocitos B en la médula ósea. Ocurre con una frecuencia de 1 entre  $10^3$  a  $10^6$  varones, empiezan a presentar infecciones bacterianas desde los 6 meses de edad.



El defecto se debe por mutaciones en la proteína BTK, a la fecha existe una base de datos en donde se resumen todas estas alteraciones genéticas (<http://bioinf.uta.fi/BTKbase>). Actualmente se tiene la información de 1111 pacientes con XLA provenientes de 973 familias no relacionadas en quienes se han encontrado 602 defectos genéticos diferentes.

La IDCV es el síndrome más común de IDP's; los pacientes presentan los niveles reducidos de IgG e IgA en suero, mientras que la IgM se encuentra reducida en la mitad de los pacientes, a pesar de poseer células B en sangre periférica. El predominio es de 1 por cada 15 000 a 117 000 casos sin predominio de género. Los actuales conocimientos sobre diferenciación del linfocito B han permitido definir alteraciones en las poblaciones de memoria del linfocito B. En los últimos años se han identificado varios defectos monogénicos en las proteínas ICOS, TACI, BAFFR, LRBA, CTLA etc. Pero solo en 20 % de los pacientes, la mayoría con un patrón de herencia autosómico recesivo y dominante.

El síndrome de HIGMLX se caracteriza por presentar valores séricos normales o elevados de la inmunoglobulina IgM y bajos niveles de las IgG e IgA. Los pacientes son susceptibles a infecciones recurrentes respiratorias, infecciones oportunistas, neutropenia. La incidencia es baja. Suele originarse debido a una mutación del gen que codifica para el ligando de CD40 (CD40L) en los linfocitos T. La unión de CD40, expresado en los linfocitos B y CD40L en los linfocitos T activos; es importante para promover la supervivencia del linfocito B y la inducción del cambio de isotipo. Se han descrito mutaciones en toda la molécula de CD40L sin correlación genotipo-fenotipo aparente. En la zona del gen que codifica para el exón 4 y 5 se concentra la proporción más alta de mutaciones (65 %).

En México, en la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría se dedica al estudio fenotípico, funcional y molecular de las IDP's, con el objetivo de comprender las bases moleculares de los procesos inmunitarios, además de proporcionar la información necesaria para apoyar el diagnóstico clínico con el cual ofrecer un tratamiento más específico a cada paciente y finalmente dar un consejo genético a las familias.<sup>2-4</sup>

## OBJETIVOS

*General:* Realizar un análisis fenotípico y molecular en pacientes mexicanos con inmunodeficiencias humorales que puedan explicar los posibles defectos en la ALX, IDCV,

## HIGMLX.

### *Específicos:*

- 1) Realizar un estudio fenotípico de las poblaciones y subpoblaciones de los linfocitos B de los pacientes.
- 2) Según sea el caso determinar la expresión de las proteínas BTK, CD40L, ICOS, LRBA, BAFFR, CTLA4.
- 3) Determinar el tipo de mutación presente en los pacientes; tanto en el gen *BTK*, así como *CD40L*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 70 pacientes con ALX, 70 pacientes con IDCV y 12 pacientes con HIGMLX. Se les realizó determinación de poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T y B; a los pacientes con HIPERIGMLX se les determinó la expresión de la proteína CD40L en células T CD3+ activadas; a los pacientes con IDCV la expresión de las moléculas BAFFR y ICOS en células B CD19+ además CTLA4 y LRBA en células T CD4+, todo con la técnica citometría de flujo. A los pacientes con ALX se les determinó la expresión de la proteína BTK en monocitos CD14+, con la técnica de western blot. Se determinó el tipo de mutación en los pacientes con ALX con cDNA para el gen *BTK* y de HIPERIGMLX con DNAg para el gen *CD40L*; por medio de clonación de los productos de PCR, purificación de plásmidos de las colonias positivas, secuenciación de los vectores y análisis de las secuencias comparándola con una secuencia reportada en la página electrónica GeneBank.

## RESULTADOS

Los principales hallazgos fenotípicos y moleculares en los 150 pacientes mexicanos con Inmunodeficiencias Humorales se encuentran resumidos en la tabla 1. En cuanto a las poblaciones de memoria de las células B; los pacientes con HIPERIGMLX tienen un promedio en el porcentaje de células B de memoria sin cambio de isotipo de 21.4 % (VR: 6-26 %) y de células B con cambio de isotipo de 1.4 % (VR: 7-24 %). A los pacientes con IDCV se le clasificó según su porcentaje de células B de memoria con cambio de isotipo; porcentaje menor de 1 % son 26 pacientes; con una expresión menor 5 % son 25 pacientes y con una expresión normal 19

pacientes. Se tienen pacientes con IDCV con baja expresión en las proteínas BAFFR (n=15), ICOS (n=15) y LRBA (n=20), en estos pacientes se realizará el estudio molecular de los genes candidatos.



**Tabla 1.** Principales hallazgos fenotípicos y moleculares en los 150 pacientes con Inmunodeficiencias Humorales

Inmunodeficiencia Humoral	Número de pacientes	Promedio de edad de años	Promedio de concentración de inmunoglobulinas séricas (mg/dL)			Promedio de % de linfocitos B	Porcentaje de pacientes que expresan poco o nada de proteína					Número de pacientes que se les realizó estudio molecular	Tipo de mutación que se presente en el gen	
			IgG	IgA	IgM		BTK	CD40L	BAFFR	ICOS	LRBA		BTK	CD40L
Agammaglobulinemia LX (ALX)	70	10	89	12	21	0.1	68	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	27	M. puntual =12 Delecciones = 13 Inserciones =3	No se realizó
Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV)	70	27	209	37	27	9	No se realizó	No se realizó	15	15	20	0	No se realizó	No se realizó
Síndrome de HiperIgM (HIGMLX)	12	2	398	22	100	12	No se realizó	70	No se realizó	No se realizó	No se realizó	10	No se realizó	M. Puntual= 7

## CONCLUSIONES

El estudio fenotípico en los pacientes con IDH's es importante para orientar el tipo de defecto molecular que explique su fenotipo clínico. La cuantificación de las subpoblaciones de memoria en los pacientes con IDCV es un método útil para distinguir entre los diferentes fenotipos clínicos de los pacientes. El estudio molecular proporciona el diagnóstico definitivo de la enfermedad y poder brindar un consejo genético a los familiares.

## RECOMENDACIONES

Los hallazgos encontrados en este trabajo de investigación nos permiten iniciar la búsqueda de tratamientos alternativos y favorecen la posibilidad de diagnosticar las enfermedades en edades tempranas para evitar las complicaciones que pudieran poner en riesgo la integridad y la vida de los pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol*. 2015 Nov; 35(8): 96-726.
2. García-García E, Staines-Boone AT, Vargas-Hernández A, González-Serrano ME, Carrillo-Tapia E, Mogica-Martínez D, et al. Clinical and mutational features of X-linked agammaglobulinemia in Mexico. *Clin Immunol*. 2016 Apr; 165: 38-44.
3. Berrón-Ruiz L, López-Herrera G, Ávalos-Martínez CE, Valenzuela-Ponce C, Ramírez-SanJuan E, Santoyo-Sánchez G, et al. Variations of B cell subpopulations in peripheral bloos of healthy Mexican population according to age: Relevance for diagnosis of primary immunodeficiencies. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2016 Nov - Dec; 44(6):571-9.
4. Vargas-Hernández A, Berrón-Ruiz L, Staines-Boone T, Zarate-Hernández M, Córdova-Calderón WO, Espinosa-Rosales FJ, et al. Clinical and genetic analysis of patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Clin. Genet*. 2013 Jun; 83(6): 585-7.