

INFORME SERVICIO SOCIAL

El **presente trabajo** redacta el trabajo realizado en el servicio social correspondiente a la carrera de medicina durante el ciclo 01 de Febrero del 2019 al 31 de Enero del 2020



Bethy Alexandra Pérez Arias



Universidad Autónoma Metropolitana

I. DATOS GENERALES

Programa de vinculación con el Instituto Nacional de Pediatría
Proyecto “Activación de monocitos por ligandos de TLR en pacientes con Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X y asociación genotipo-fenotipo”

II. NOMBRE DEL ASESOR

Asesor interno : Raúl Enrique Castañeda Castaneira
Asesor externo: María Edith González Serrano

III. INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Las inmunodeficiencias primarias son un grupo heterogéneo de enfermedades heredadas, con defectos en uno o más componentes del sistema inmune. Estas enfermedades tienen un espectro amplio de manifestaciones clínicas y hallazgos de laboratorio. Sin embargo en la mayoría de los casos se presenta un incremento en la susceptibilidad a infecciones y una predisposición a enfermedades autoinmunes y cáncer.¹

Hasta la fecha se han identificado poco más de 300 genes diferentes con alteraciones que dan lugar a más de 160 formas de inmunodeficiencias.²

Existen diferentes clasificaciones de IDP, la más reciente es aquella reportada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunto con la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS, de sus siglas en inglés). Esta clasificación incluye las siguientes categorías: 1. Inmunodeficiencias de células B y células T; 2. Deficiencias predominantemente de anticuerpos; 3. Defectos de fagocitos; 4. Desórdenes genéticos de la regulación inmune; 5. Defectos en la inmunidad innata; 6. Enfermedades autoinflamatorias; 7. Otras inmunodeficiencias bien definidas; 8. Defectos del complemento.²

Las inmunodeficiencias de anticuerpos constituyen el grupo más numeroso, de acuerdo con ESID, representan un 54.87%, este registro comprende 64 centros de Europa durante 2009 con un total de 10,279 pacientes.³ De acuerdo al segundo registro del Grupo Latinoamericano de Inmunodeficiencias Primarias (LAGID) publicado en 2007, en el cual se incluyeron 12 países latinoamericanos entre ellos México, en total se incluyeron 3321

pacientes. La inmunodeficiencia más frecuente fue la que afecta predominantemente a anticuerpos (53.2%).⁴

Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA).

La agammaglobulinemia con ausencia de linfocitos B (LB) es una IDP que se caracteriza por la ausencia de LB circulantes y disminución grave en los niveles de todas las inmunoglobulinas (Ig) séricas. Se han descrito dos patrones de herencia, autosómico recesivo y ligado al cromosoma X. La XLA fue descrita por primera vez en 1952 por el Dr. Bruton y el defecto genético se identificó en los 90's por 2 grupos diferentes. La tirosin cinasa de Bruton (BTK) es miembro de la familia de cinasas Tec y se encuentra mutada en la mayoría de los pacientes masculinos con agammaglobulinemia.⁵

Etiología

La tirosin cinasa de Bruton (Btk) es una tirosin cinasa que pertenece a la familia Tec de cinasas (TFKs), dicha familia constituye el segundo grupo más grande de tirosin cinasas citoplásmicas, de las células de los mamíferos e incluye junto con Btk a Tec, Itk, Txk y a la tirosin cinasa de la médula ósea del cromosoma x (Bmx). La mayoría de las TFKs (Btk, Itk, Tec, Txk) se expresan en células hematopoiéticas. Btk es crítica para el desarrollo, diferenciación y señalización de los linfocitos B. Por lo tanto, los linfocitos deficientes en Btk no alcanzan el estado de madurez, bloqueándose el desarrollo de pro y pre-B y mueren prematuramente, de modo que los pacientes con mutaciones en el gen que codifica para Btk prácticamente carecen de LB circulantes y son incapaces de producir todas las clases de inmunoglobulinas (Igs), y montar una respuesta inmune humoral. La IDP caracterizada por deficiencia de Btk es conocida como agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA).⁶

Btk expresión y genética

El gen BTK se localiza en el cromosoma en la posición Xq21.3-Xq22, está formado por 19 exones de aproximadamente 37.5 kb, sobre el cromosoma X.⁶ Existen alrededor de 1112 mutaciones reportadas a la fecha que afectan este gen y han sido registradas en la base de datos de mutaciones internacionales designada como BTKbase.⁷

Btk se expresa predominantemente en LB, pero no en células plasmáticas. A excepción de los linfocitos T (LT) otras líneas hematopoiéticas expresan Btk.⁶

Bioquímica de Btk

Btk está formada por los siguientes dominios a partir del extremo N-terminal: dominio homólogo a pleckstrin (PH), homólogo de Tec (TH), dominio homólogo a src 2 (SH2), SH3 y cinasa (SH1). Cada uno de estos dominios tiene el potencial de interactuar con proteínas de señalización intracelular. Btk es una enzima metaloproteína que requiere Zn^{2+} para su actividad y estabilidad. La unión de Btk a este ion está mediada por motivos altamente conservados llamados dedos de zinc, también conocidos como motivos Btk y se localizan en el dominio TH. Las mutaciones que afectan la unión al zinc ocasionan inestabilidad de la proteína.⁶

Btk se transcribe a partir de un sólo gen sin evidencia de splicing alternativo.⁶

Las mutaciones en Btk responsables de XLA que afectan el dominio cinasa y el dominio homólogo a pleckstrin, alteran su actividad de cinasa y la translocación a la membrana respectivamente.^{8,9}

Figura 1. Estructura de Btk que indica los sitios de fosforilación de tirosina, dominio homólogo a pleckstrin (PH), región homóloga a Tec (TH), dominio homólogo a Src 3 (SH3), dominio homólogo a Src 2 (SH2), dominio cinasa. En los cuadros se muestran las proteínas que se sabe interactúan con cada uno de los dominios.⁹

Activación de Btk

Los mecanismos moleculares de la activación de Btk no se comprenden totalmente, sin embargo se cree que las modificaciones post-translacionales, así como la localización subcelular juegan un papel importante. Btk se encuentra predominantemente en el citosol y posterior a la unión del receptor de la célula B (BCR) con el antígeno, fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) es activado, con lo que se genera fosfoinositido fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). PIP3 se acumula en la superficie interna de la membrana plasmática y varias proteínas de señalización son reclutadas incluyendo a Btk, que se une a PIP3 a través de su dominio PH, esto es un requisito para su activación. Btk transloca a la membrana plasmática donde es fosforilada en Y551 por una cinasa de la familia Src (SFK),

probablemente Lyn. La fosforilación de Btk en esta tirosina, la cual se encuentra en dominio catalítico es seguida de autofosforilación en otra tirosina del dominio SH3. En cooperación con la proteína adaptadora de unión a célula B (BLNK), Btk fosforila a la fosfolipasa C2 (PLC2), lo que desencadena la cascada de señalización. La localización de Btk en la membrana plasmática es crítica para su fosforilación y activación.⁶

Btk y señalización de receptores tipo Toll (TLR)

Los TLR son una familia de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) de la respuesta inmune innata capaces de reconocer productos microbianos denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) con lo que se desencadenan vías de señalización intracelular que resultan en la translocación del factor nuclear B (NF- κ B) al núcleo, activación y diferenciación celulares, así como secreción de citocinas y quimiocinas. Hasta el momento se han descrito 11 tipos diferentes de TLR, 10 de los cuales se encuentran en humanos, se expresan en diferentes tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfocitos y células endoteliales.^{9, 10} Los TLR tienen un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina y un dominio citoplasmático Toll/IL-1R. Al activarse inician la cascada de señalización intracelular que culmina en la activación del factor nuclear B (NF- κ B).^{8, 9}

La capacidad de Btk de interactuar con el dominio TIR de miembros de la familia de TLR (TLR4, TLR6, TLR8, TLR9) y proteínas de las vías de señalización de los TLR, tales como proteína de diferenciación mieloide 88 (MyD88), proteína adaptadora de MyD88 (Mal), cinasa asociada al receptor de interleucina 1 (IL-1R) (IRAK-1), sugiere la importancia de Btk como componente de las vías de TLR, por lo que participa en la función de células del sistema inmune innato y adaptativo.^{6, 11}

Doyle *et al.* demostraron que células monocíticas humanas THP1 estimuladas con ligando de TLR8 (R848) y ligando de TLR9 (CpGB-DNA) presentan autofosforilación de Btk en el residuo de tirosina 223.⁸ Lee *et al.* reportaron resultados que concuerdan con lo mencionado, los autores estimularon células B obtenidas de bazo de ratón sano con LPS y CpG ODN, induciendo la autofosforilación de Btk.¹² De modo similar Jefferies *et al.* y Schmidt *et al.* observaron que la línea celular de pro-monocitos humanos THP-1 y los macrófagos derivados de médula ósea de ratón al ser estimulados el ligando de TLR4 LPS presenta autofosforilación de Btk.^{11, 13}

Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con XLA estimuladas con ligando de TLR9 (CpGB-DNA), tienen alterada la producción de IL-6.⁸

Hasan *et al.* así como Lee *et al.* demostraron que linfocitos B esplénicos de ratón deficiente en Btk al ser estimulados con ligandos de TLR9 producen mayor cantidad de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-12p40, TNF-), IL-27p28 (modula la diferenciación y proliferación de LB), pero menor cantidad de IL-10 que las células de ratón *wild type*. Es posible que la disminución en la producción de IL-10 en células Btk^{-/-} estimuladas con CpG sea la causa del incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias.^{10, 12} Schimidt *et al.* también observaron una menor producción de IL-10 en macrófagos derivados de médula ósea de ratón Btk^{-/-} estimulados con ligandos de TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, al ser comparados con células de ratón *wild type*.¹³ La estimulación con CpG-DNA incrementa la expresión de TLR9 en células Btk^{-/-} (82%) al ser comparada con células *wild type* (36%), esta diferencia en la expresión de TLR9 persiste aún en las células sin estimular, Btk^{-/-} (11%) versus 3.1% en las células *wild type*. La activación de TLR9 en LB Btk^{-/-} induce su supervivencia y proliferación en mayor grado que en las células *wild type*, al estimular la expresión del gen 2 antiapoptótico de la leucemia/linfoma de células B (*Bcl-2*) y el gen que codifica la ciclin D2 reguladora del ciclo celular.¹⁰ Contrario a estos hallazgos Lee *et al.* reportaron que células B de ratón Btk^{-/-} proliferan en respuesta al estímulo con CpG ODN, pero en menor grado que las células *wild type*.¹²

Horwood *et al.* observaron que células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con XLA estimuladas con LPS (ligando de TLR4) o N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2R)-propil]-(R)-cisteína (PAM₃Cys) y lipopéptido 2 activador de macrófago (MALP2) (ligandos de TLR2), producen menos TNF-α e IL-1 que las células de controles sanos pareados por edad y género. Pero no encontró diferencias en cuanto a la producción de IL-6, IL-8 e IL-10.^{14, 15}

Recientemente se reportó el caso de dos gemelos caucásicos monocigotos poseedores de una microdelección que involucra los genes que codifican para Btk y para el péptido 1 sordera-distonía (DDP1). Los pacientes tenían un cuadro clínico compatible con XLA, agammaglobulinemia y ausencia de células CD19+ en sangre periférica. Las CMSP deficientes en Btk de estos pacientes respondieron al estímulo de los siguientes agonistas de TLRs: TLR 2/6 (zymosan), TLR3 (poli I:C), TLR4 (LPS), TLR7/8 (imidazoquinolina) con producción de TNF-, IL-6, IL-1, IL-10, IL-12p40, de modo similar a los controles pareados

por edad; presentaron actividad de células NK y células dendríticas plasmocitoides normales.¹⁶

En otro estudio realizado en 6 pacientes con diagnóstico de XLA los autores estudiaron el número y frecuencia de células dendríticas mieloides y plasmocitoides en sangre periférica, aunque hubo una tendencia a números bajos esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Generaron células dendríticas a partir de monocitos inmaduros para evaluar su respuesta a agonistas de TLRs. Las células estimuladas expresaron moléculas de superficie indicadoras de maduración (CD80, CD83, CD86, Complejo principal de histocompatibilidad I y II) normalmente y la producción de IL-6, TNF-, IL-10 e IL-12 después del estímulo con ligandos de TLR 1 a 6 fue similar en las células de los pacientes y controles. Pero el estímulo con agonista de TLR8 no indujo producción de TNF- ni IL-6.¹⁷

Taneichi *et al.* realizaron otro estudio en CD obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica de 8 pacientes con XLA, las estimularon con ligandos de TLRs (PGN, Poli (I:C), LPS, MR-848, CpG). La expresión del marcador de maduración CD83 inducida por TLR2, TLR4 y TLR7/8 está alterada en los pacientes con XLA. La producción de TNF-, IL-6 en las células dendríticas de los pacientes con XLA y los controles variaron entre individuos y el ligando de TLR de un individuo a otro, solo el estímulo con poli (I:C) estimuló la producción de IL-12p70. CpG no fue capaz de inducir la producción de TNF-a o IL-6 aún en los controles. IL-6 e IL12p70 fueron producidas de manera similar en ambos grupos.¹⁸

Por otra parte Zorn *et al.* investigaron el efecto de la ausencia de Btk sobre la respuesta de células cebadas derivadas de médula ósea de ratón, estimuladas con ligando de TLR4 y TLR2. Los autores observaron que la producción de IL-6 y H₂O₂, la activación de la cinasa p38, en las células estimuladas fue similar en el ratón *wild type* y el Btk^{-/-}. A diferencia de la producción de TNF-, que fue mayor en las células Btk^{-/-} con respecto de las células *wild type*.¹⁹

Estudios murinos^{10, 12, 13, 19} y en humanos^{20, 31} concuerdan en una producción incrementada de citocinas proinflamatorias en células de pacientes con XLA al ser estimuladas con ligandos de TLR.

BTK Y LA TRANSCRIPCIÓN

Btk interactúa con varios reguladores de la transcripción y fosforila algunos de estos, por lo que induce la actividad de los factores de transcripción. Uno de estos es el factor nuclear B (NF-B), el cual está involucrado en la regulación de la expresión de diversos genes, y en células deficientes de Btk la actividad de NF-B se encuentra alterada.⁶

NF-B es un heterodímero formado por una subunidad de unión a DNA de 50 kDa (p50) y otra subunidad de transactivación de 65kD (RelA/p65). NF-B se expresa ubicuamente en las células sin estimular en una forma inactiva en el citoplasma donde es retenida por proteínas de la familia IB. Después de la estimulación con LPS las proteínas adaptadoras MyD88, Mal, se unen a la cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK)-4 e IRAK-1, lo que activa a la cinasa IB (IKK), a través de Traf-6. IB es fosforilada por IKK, con lo que es fosforilado y ubiquitinizado, esto lleva a la liberación de NFB que se transloca al núcleo donde se une al DNA y desencadena la transcripción de varios genes. La translocación de NF-B al núcleo no es suficiente para activar la transcripción, ya que se requiere la fosforilación de la subunidad p65 para la transactivación de la expresión de genes.²¹

Doyle *et al.* demostraron que Btk es necesaria para la señalización activada por TLR4 (LPS), TLR8 (R848) y TLR9 (CpGB-DNA) e induce la fosforilación de p65 en la serina 536, con lo que promueve la transactivación de NF-B y no está involucrada en el proceso que lleva a la degradación de IB.^{8, 21}

La estimulación de monocitos humanos de la línea celular THP1 con LPS (TLR4) y el lipopéptido-2 activador de macrófago (TLR2) inducen la fosforilación de Mal (TIRAP) en residuos de tirosina mediada por Btk.²² Una vez que TIRAP ha sido fosforilada es blanco de SOCS (de sus siglas en inglés *supresor of cytokine signaling 1*), que la ubiquitiza y es degradada en el proteasoma 26S.^{23, 24} Alteraciones en esta regulación pueden ser responsables de la respuesta pro-inflamatoria que se observa en PBMC de pacientes con XLA en respuesta a LPS.

MUTACIONES

Las mutaciones en Btk responsables de XLA afectan el dominio cinasa y el dominio homólogo a pleckstrin, los cuales alteran actividad cinasa y la translocación a la membrana respectivamente.^{8,9} Aunque se han descrito mutaciones en a lo largo de todo el gen que codifica para Btk, siendo en total alrededor de 1112 mutaciones diferentes, de las cuales 14.83% se encuentran en el dominio SH2, 21.49% en el dominio pH, 46.94% en el dominio

cinasa y el resto de las mutaciones distribuidas en el resto de los dominios.⁷ Basile *et al.* reportaron un estudio en el que incluyeron 49 pacientes con diagnóstico de XLA, los autores encontraron mutaciones distribuidas a lo largo de todo el gen, tanto regiones codificantes como no codificantes.²⁵

La mayoría de las mutaciones incluyendo sustituciones de un aminoácido resultan en la ausencia de la proteína Btk en plaquetas y monocitos. Sin embargo algunas sustituciones de aminoácidos pueden dar como resultado la formación de una proteína inestable pero con cierto grado de función. Los defectos en splicing que afectan sitios en el consenso splice que son conservados pero no invariantes pueden dar lugar a la producción de cantidades disminuidas o normales de Btk.²⁶

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los pacientes típicamente inician con síntomas entre los 6 a 12 meses de edad, cuando la IgG materna transferida al feto a través de la placenta es catabolizada.⁵ Aunque existen casos reportados de inicio en edad más tardía (hasta 15 años).²⁵

Los pacientes presentan típicamente infecciones respiratorias bacterianas recurrentes y/o infecciones gastrointestinales,⁵ siendo las infecciones respiratorias la presentación clínica inicial más frecuente (69%).²⁵ Las infecciones más características son otitis media, sinusitis, bronquitis, neumonía e infecciones gastrointestinales.⁵ El desarrollo de enfermedad pulmonar crónica se relaciona con la edad al diagnóstico y el tratamiento inadecuado.²⁵

Las infecciones bacterianas son características en los pacientes con XLA, principalmente aquellas causadas por bacterias piógenas encapsuladas, tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, entre otras. En caso de septicemia las bacterias que se han reportado con mayor frecuencia son *Pseudomonas*, seguidas de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. En caso de artritis séptica los gérmenes que se aíslan con mayor frecuencia son *H. influenzae* y *S. pneumoniae* antes del inicio del tratamiento de reemplazo con gammaglobulina (Ig) y una vez iniciado el tratamiento la artritis viral es la más frecuente. La meningitis bacteriana se presenta antes del inicio del tratamiento con Ig, y es causada por los agentes ya mencionados.⁵ En una serie de 49 pacientes con XLA hasta un 16% de

los pacientes presentaron infecciones del sistema nervioso central (SNC) como manifestación inicial, siendo el agente causal *H. influenzae* o pneumococo.²⁵

Los pacientes con XLA presentan infecciones recurrentes del tracto respiratorio. La sinusitis crónica se presenta en más del 30% de los pacientes. La bronquitis y/o neumonía crónicas pueden presentarse aún cuando se haya iniciado el tratamiento de reemplazo con Ig, lo que da lugar al desarrollo de bronquiectasias.⁵

Las infecciones del tracto gastrointestinal son frecuentes en los pacientes con XLA, *Giardia lamblia* se aísla con frecuencia en las muestras de heces de los pacientes, este agente difícil de erradicar y es causante de diarrea crónica y síndrome de mala absorción. *Campylobacter jejuni* causa infecciones similares, acompañadas además de afección cutánea y fiebre. Salmonella es otro agente descrito como causante de diarrea en pacientes con XLA.⁵

Mycoplasma es otro agente que causa infección en los pacientes con XLA, sobre todo a nivel respiratorio, urogenital y de articulaciones. Los pacientes con XLA son especialmente susceptibles a enterovirus (poliovirus, echovirus y coxsackie-virus). Los síntomas neurológicos progresivos, tales como ataxia, parestesias, pérdida de habilidades cognitivas y de audición neurosensorial, en pacientes con XLA, debe hacer sospechar de infección por enterovirus.⁵

Cabe mencionar que los procesos infecciosos graves que ameritan hospitalización antes del diagnóstico se reportan hasta en un 74%.²⁵

Más del 20% de los pacientes con XLA presentan artritis la cual se presenta con limitación de la movilidad, aumento de volumen, dolor, y formación de pannus.^{5,27} En algunos casos se aísla algún agente piógeno, sin embargo, en la mayoría de los casos no se logra el aislamiento del agente.⁵ Los agentes que se aislaron del cultivo de líquido sinovial de una serie de 19 pacientes de los cuales 25% cursaron con artritis séptica fueron estafilococo, pseudomonas y micobacterias.²⁷

La neutropenia se ha reportado en pacientes con XLA, frecuencia variable 10-25% de acuerdo con las series. Otras manifestaciones que pueden presentar los pacientes con XLA son: glomerulonefritis, alopecia, amiloidosis y enfermedad de Von Reclinghausen.⁵

A la exploración física las amígdalas están ausentes o hipoplásicas (79%).²⁵

Como ya se mencionó la mayoría de los pacientes con XLA tienen un inicio de infecciones bacterianas, hipogammaglobulinemia y un número muy disminuido o ausencia de

linfocitos B en sangre periférica.²⁶ Sin embargo algunos pacientes tienen algo de IgG y/o IgM y escasos números de linfocitos B en sangre y aunque la edad de inicio es temprano, algunos adultos con XLA han sido diagnosticados hasta que se establece el diagnóstico en algún pariente como nieto o sobrino y se desconoce la causa de esta variabilidad.^{26, 28} Broides *et al.* reportaron un estudio en que se incluyeron 110 pacientes con mutación en Btk los autores observaron que los pacientes con mutaciones menos graves (sustitución de aminoácidos o sustitución de pares de bases en los sitios dentro del consenso splice que es conservado, pero no invariante) tienen mayor probabilidad de diagnosticarse tardíamente, mayor porcentaje de LB, así como de IgM plasmática, comparados con pacientes con mutaciones graves (defectos de splicing en sitios invariantes dentro de la secuencia consenso del splice (primeros 2 o dos últimos pares de bases del intron), codón de paro prematuro, mutaciones con corrimiento del marco de lectura).²⁶ En otro estudio realizado por López *et al.* los autores incluyeron 65 pacientes con agammaglobulinemia de los cuales en 54 se corroboró mutación en el gen que codifica para Btk. Clasificaron las mutaciones en menos graves y graves y observaron que los pacientes con mutación menos grave tenían niveles detectables de IgG, IgA e IgM; los pacientes con niveles detectables de Btk presentaban un mayor porcentaje de LB al momento del diagnóstico.²⁹

DIAGNÓSTICO

La mayoría de los pacientes con diagnóstico de XLA cursan con infecciones bacterianas recurrentes, especialmente de la vía respiratoria, presentan niveles bajos de las inmunoglobulinas séricas la IgG sérica usualmente es menor a 200 mg/dl y la IgM e IgA son menores a 20 mg/dl, ausencia de linfocitos B, definido como células que expresan CD19 y CD20 <2%, lo que refleja un bloqueo en el desarrollo de los linfocitos B. Sin embargo existen algunos casos raros de pacientes con XLA, en los que se han reportado valores cercanos a los normales de linfocitos B. El análisis molecular del gen *BTK* se realiza para establecer la mutación.⁵

La Base de Inmunodeficiencias (IDR, de sus siglas en inglés *ImmunoDeficiency Resource*) es una base que integra datos clínicos, bioquímicos, genéticos, genómicos, computacionales, proteómicos, estructurales de las inmunodeficiencias en donde se encuentran publicados los criterios para establecer el diagnóstico posible, probable y definitivo de XLA.³⁰

Se considera que un paciente tiene diagnóstico posible de XLA cuando presenta los siguientes criterios diagnósticos:

Masculino con menos de 2% de células CD19+, en quien se han excluido otras causas de agammaglobulinemia (Deficiencia de cadena pesada, deficiencia de μ , deficiencia de IgA) y que además cuenta con alguno de los siguientes criterios diagnósticos: 1) inicio de infecciones bacterianas recurrentes en los primeros 5 años de vida; 2) IgG, IgM e IgA séricas 2 desviaciones estándar por debajo de los valores normales para la edad; 3) ausencia de isohemaglutininas.

El diagnóstico de XLA es probable en aquellos pacientes masculinos con menos de 2% de células CD19+, quien presenta además todas las características siguientes: 1) inicio de infecciones bacterianas recurrentes en los primeros 5 años de vida; 2) IgG, IgM e IgA séricas 2 desviaciones estándar por debajo de los valores normales para la edad; 3) Ausencia de isohemaglutininas y/o respuesta pobre a vacunas; 4) se han descartado otras causas de hipogammaglobulinemia (Deficiencia de cadena pesada, deficiencia de μ , deficiencia de IgA)

El diagnóstico definitivo de XLA se establece en aquellos pacientes masculinos que tienen menos de 2% de células CD19+ y además alguna de las siguientes características: 1) mutación de Btk; 2) ausencia de (ácido desoxirribonucleico mensajero) RNAm determinado por northern blot de monocitos o neutrófilos; 3) ausencia de Btk en monocitos o plaquetas; 4) tíos, primos maternos o sobrinos con menos de 2% de células CD19+.

JUSTIFICACIÓN.

Las inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos constituyen el grupo más numeroso dentro de las inmunodeficiencias primarias.^{3, 4} Se ha descrito el efecto de la deficiencia de Btk en la respuesta a ligandos TLR en líneas celulares, ratones y humanos, siendo en estos últimos donde se han observado mayor variabilidad en los resultados, probablemente debido a la gran diversidad genética que existe, así como a la gran cantidad de mutaciones que pueden causar la enfermedad. En nuestro laboratorio hemos demostrado que las células mononucleares de pacientes con XLA tienen una respuesta predominantemente inflamatoria en respuesta a ligando de TLR4, lo que concuerda con estudios recientes de otros investigadores.^{20, 31} En los estudios reportados a nivel mundial

no se ha buscado una asociación de la respuesta predominantemente proinflamatoria que muestran las células de pacientes con XLA, al ser estimuladas con ligandos de TLR's, con las mutaciones, ni con las manifestaciones clínicas, complicaciones, infecciones ni la presencia de autoinmunidad o neoplasias. Conocer si existe una relación entre las manifestaciones clínicas, complicaciones asociadas a una respuesta pro-inflamatoria con la producción de citocinas (TNF- α , IL-10, IL-1 β e IL-6) posterior al estímulo con ligandos de TLR's, ayudará a identificar a los pacientes con diagnóstico de XLA con mayor riesgo de presentar infecciones, complicaciones como bronquiectasias, autoinmunidad y neoplasias y así tomar medidas de prevención adicionales a la aplicación de gammaglobulina intravenosa, como el uso de antibióticos profilácticos, para disminuir su morbimortalidad.

IV. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

1. Establecer la asociación existente entre los cambios en la producción de citocinas (IL-10, TNF-, IL-1 β , IL-6) en células de sangre periférica de pacientes con XLA estimuladas con ligandos de TLR4, TLR7/8, TLR9 al ser comparadas con controles sanos, con respecto al tipo de mutación (grave y moderada), dominio de la proteína Btk afectado (PH, PT, SH2, SH3 y cinasa), manifestaciones clínicas, complicaciones tales como el desarrollo de bronquiectasias, infecciones, autoinmunidad y neoplasias en pacientes con XLA que sean referidos para su diagnóstico a la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias durante al menos 2 años (estos pacientes son referidos del Hospital Infantil de México, Hospital Niño DIF Hidalgo, Centro Medico "La Raza", Hospital General Regional # 25 IMSS Monterrey Nuevo León).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las características clínicas de pacientes con diagnóstico de XLA que sean referidos para su diagnóstico del Hospital Infantil de México, Hospital Niño DIF Hidalgo, Centro Medico "La Raza", Hospital General Regional # 25 IMSS Monterrey Nuevo León a la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias de Marzo de 2012 a Marzo de 2014.

2. Comparar las diferencias entre la producción de citocinas (IL-10, TNF-, IL-1 β , IL-6) en células de sangre periférica de pacientes con XLA estimuladas con ligandos de TLR4, TLR7/8, TLR9 y sus controles sanos pareados por edad y género, que sean referidos para su diagnóstico a la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias durante al menos 2 años.
3. Identificar la asociación entre la producción de citocinas (IL-10, TNF-, IL-1 β , IL-6) por células mononucleares de sangre periférica de pacientes con XLA estimuladas con ligando de TLR4, TLR7/8, TLR9 con el **tipo de mutación** (grave y moderada), el **dominio de la proteína Btk afectado** (PH,PT, SH2, SH3 y cinasa), **manifestaciones clínicas, procesos infecciosos, complicaciones, como bronquiectasias, autoinmunidad y neoplasias.**
4. Se determinará la expresión de moléculas de señalización de la vía de TLR's (Mal/TIRAP, STAT3, SOCS3, 38MAPK, ERK, JNK) en células mononucleares de pacientes con XLA después de su activación con ligandos de TLR4, TLR7/8, TLR9, por western blot.

V. METODOLOGÍA UTILIZADA

CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Observacional, transversal, ambilectivo, comparativo, analítico.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Población objetivo

Pacientes mexicanos con diagnóstico de XLA.

Población elegible

Pacientes con diagnóstico de XLA que sean referidos para su diagnóstico del Hospital Infantil de México, Hospital Niño DIF Hidalgo, Centro Medico "La Raza", Hospital General Regional # 25 IMSS Monterrey Nuevo León, a la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias durante al menos 2 años.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

GRUPO 1: Caso

1. Pacientes con diagnóstico definitivo de XLA de acuerdo con la IDR

b. Pacientes masculinos que tienen menos de 2% de células CD19+

c. Y además alguna de las siguientes características

1) mutación de Btk;

2) ausencia de (ácido desoxirribonucleico mensajero) RNAm determinado por northern blot de monocitos o neutrófilos;

3) ausencia de Btk en monocitos o plaquetas;

4) tíos, primos maternos o sobrinos con menos de 2% de células CD19+.

1. Pacientes con XLA que sean referidos para su diagnóstico a la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias durante al menos 2 años.

2. Firma de carta de consentimiento y/o asentimiento informado.

GRUPO 2: Control

1. Masculino que no cuente con diagnóstico de XLA, pareado por edad por cada uno de los pacientes con XLA que ingresen al estudio.

2. Pacientes que sean sometidos a un tratamiento quirúrgico (orquidopexia, amigdalectomía, adenoidectomía, circuncisión, corrección de luxación de cadera congénita, pie equino varo, craneosinostosis) electivo en el INP.

3. Firma de carta de consentimiento y asentimiento informado.

Criterios de exclusión

1. Procesos infecciosos concurrentes en el momento de toma de la muestra en ambos grupos.

2. Ingesta de anti-inflamatorio no esteroideo en la última semana.

3. Ingesta de inmunosupresores en el último mes.

4. Ingesta de vacunas bacterianas, inmunoestimulantes en la última semana.

Métodos

1. Identificación y reclutamiento de los pacientes y controles

Los pacientes con diagnóstico confirmado de XLA que cumplan con los criterios de inclusión serán invitados a participar en el estudio y en caso de aceptar se les solicitará la firma de carta de consentimiento y/o asentimiento. Se incluirá un control por cada

uno de los pacientes, pareado por edad y género, a quienes también se les solicitará la firma de la carta de consentimiento y/o asentimiento.

2. Toma de la muestra

Se tomará una muestra de sangre periférica de 20 mL en cada grupo (pacientes con XLA y controles sanos), con la siguiente técnica: lavado de manos con agua y jabón, colocarse guantes desechables estériles, colocar un compresor por arriba del sitio de punción, realizar antisepsia de la región con etanol al 96% o yodo polivinilpirrolidona antes de la venopunción, los sitios a puncionar serán, venas dorsales de la mano y fosa antecubital (vena basílica, cefálica y mediana). Puncionar la vena en un ángulo de 15° a 30° respecto de la piel con aguja de 25 mm, por goteo o con jeringa con el bisel hacia arriba, soltar el compresor cuando refluya la sangre, posterior a la recogida de la muestra se retira la aguja y se aplica presión suave hasta lograr hemostasia y se coloca un apósito en el sitio de punción. La muestra de sangre se transportará en tubo heparinizado (BD^{MR}) y en un tubo CPT.

3. Separación de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

La separación de las CMSP se realizará con tubos CPT de BD^{MR} de acuerdo con las instrucciones del fabricante, brevemente:

1. Centrifugar los tubos CPT a 1800 RCF (*Relative centrifugal force*) durante 20 min.
2. Después de centrifugar las CMSP formarán una capa por debajo del plasma, dicha capa se aspirará gentilmente con una pipeta Pasteur y se colocará en un tubo cónico de 15 mL con tapa.
3. Se agragará PBS al tubo hasta aforar a 15 mL, se mezclará gentilmente.
4. Se centrifugará nuevamente a 300 RCF por 15 minutos, se decantará el sobrenadante.
5. Se resuspenderá el botón celular agitando suavemente en vortex.
6. Se adicionarán PBS hasta aforar a 10 mL y se mezclará suavemente.
7. Se centrifugará a 300 RCF por 10 min y se decantará el sobrenadante.
8. Se resuspenderá el botón celular agitando suavemente en vortex y se adicionará AIMV hasta aforar a 1 mL.

9. Se procederá a realizar cuenta celular y corroborar viabilidad con cámara de Neubauer y tinción con azul tripano.

4. Expresión de BTK por citometría de flujo

1. Se colocará el equivalente a 1×10^6 células por tubo (control de isotipo, tinción de Btk y control de autofluorescencia) y se colocaron en baño de hielo.
2. Se realizará la tinción de CD14 y se incubará durante 20 min en baño de hielo en la oscuridad, finalizado este tiempo se lavaran las células.
3. Se fijarán las células con 100 μ L de Lyse/Fix Buffer 1x (Franklin, EUA BD Phosphoflow^{MR}) y se incubarán durante 10 min a 37^o C en oscuridad, al finalizar el tiempo de incubación se lavarán y se permeabilizarán con 100 μ L de Perm buffer II (Franklin, EUA BD Phosphoflow^{MR}) se incubarán durante 30 min en baño de hielo y en oscuridad, posterior a lo cual se lavarán, se agregarán 30 μ L de FcBlock (Franklin, EUA, BD Pharmigen^{MR}) previamente diluido 1:500 y se incubarán durante 30 minutos en baño de hielo en oscuridad, finalizado este tiempo se lavaran las células.
4. Una vez resuspendido el botón celular y se agregarán 20 μ L del anticuerpo anti BTK humano teñido con PE (Franklin, EUA, BD Phosphoflow^{MR}) al tubo etiquetado como BTK y 20 μ L del control de isotipo IgG_{2a} teñido con PE (Franklin, EUA, BD Phosphoflow^{MR}) al tubo etiquetado como CI, y se incubarán durante 30 min en baño de hielo en oscuridad, al finalizar se realizará el lavado.
5. La adquisición de las muestras se realizará en FACS Aria Flow Citometer (Franklin, EUA, BD^{MR}).

5. Depleción de linfocitos B de las células CMSP de los controles

La depleción de los linfocitos B se realizará con perlas anti CD19 Miltenyi Biotec^{MR} de acuerdo con las indicaciones del fabricante, brevemente:

1. Pasar la suspensión celular a través de una organza, con la finalidad de evitar grumos que ocluyan la columna.
2. Centrifugar la suspensión celular a 300 RCF por 10 min y aspirar el sobrenadante.
3. Resuspender el botón celular en 80 μ L de Buffer (PBS + albúmina sérica bovina 0.5%, EDTA 2mM)

4. Agregar 20 μL de micro perlas anti CD19 por cada 10^7 células.
5. Mezclar e incubar a durante 15 min a una temperatura de 2-8° C.
6. Lavar las células con 1 mL de buffer y centrifugar a 300 RCF durante 10 minutos,
7. Aspirar el sobrenadante y resuspender en 500 mL de buffer.
8. Colocar una columna en el separador magnético MACS y enjuagarla con buffer.
9. Colocar la suspensión celular en la columna.
10. Recolectar las células no marcadas, centrifugar a 300 RCF durante 5 min y aspirar el sobrenadante.
11. Resuspender el botón celular en 1 mL de PBS y proceder a contar las células y corroborar viabilidad.

Nota: antes y después de la separación de linfocitos B, se tomarán 10 μL de la suspensión celular y se teñirá con anticuerpo anti CD19 unido a FITC para corroborar el porcentaje en que eliminaron los LB.

6. Cultivo celular

En placas de cultivo de 24 pozos con fondo plano se prepararán pozos con 1×10^6 CMSP y AIMV hasta un volumen final de 1000 μL por pozo. Se agregarán diferentes estímulos: ligando de TLR4, ligando de TLR7/8 y ligando de TLR9, se dejarán sin estímulo. Las placas se incubarán a 37°C y en una atmósfera de CO_2 al 5% durante 24 h. Al finalizar del tiempo de incubación se homogenizará el contenido de cada pozo, mismo que se depositará en un tubo eppendorf de 1 mL por pozo, y se centrifugará a 433g durante 5 min, posterior a lo cual el sobrenadante se colocará en alícuotas de 100 μL y se congelará a -20° C hasta la realización de la técnica de ELISA.

7. ELISA para determinación de Citocinas en el sobrenadante del cultivo

Se realizará de acuerdo con las especificaciones del fabricante, brevemente:

Se utilizarán placas previamente sensibilizadas con anticuerpo específico hacia la citocina a determinar (IL-10 ó IL-6 ó IL-1 β o TNF- α). Se añadirán 100 μL de la muestra del paciente o 100 μL de la muestra del control o 100 μL standard por pozo, la placa se cubrirá con el adhesivo que incluye el kit y se incubará durante 2 horas a temperatura ambiente. Se aspirará el contenido de cada pozo y se lavará 4 veces con buffer de lavado, se tendrá

cuidado de remover el fluido entre cada lavado. Después del último lavado se decantará la solución de lavado y se invertirá la placa sobre papel absorbente. Se agregarán 200 μ L de conjugado de la citocina que corresponda (IL-10 ó IL-6 ó IL-1 β o TNF- α), de acuerdo con el anticuerpo con que fue sensibilizada la placa, a cada pozo y la placa será cubierta con el adhesivo incluido para incubarse durante 2 horas a temperatura ambiente. Se aspirará el contenido de cada pozo y se lavará 4 veces con el buffer de lavado, se tendrá cuidado de remover el fluido entre cada lavado. Después del último lavado se decantará la solución de lavado y se invertirá la placa sobre papel absorbente. Se agregarán 200 μ L de solución de sustrato a cada pozo y se incubará durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se agregarán 50 μ L de solución de paro a cada pozo. Se determinará la densidad óptica de los pozos en los primeros 30 minutos, mediante el espectrofotómetro Epoch (Biotek instruments, EUA) a 450 nm y se corregirá la amplitud de onda a 540 o 570 nm.

8. Determinación de la expresión de moléculas de señalización por Western blot

Se cultivarán 2×10^6 células mononucleares con ligando de TLR4, TLR7/8 y TLR9 a concentraciones y tiempo que se optimizará durante la etapa de estandarización, al finalizar el cultivo se centrifugarán las células a 4^o C y se lisarán con buffer de lisis suplementado con inhibidores de fosfatas y proteasa, se cuantificará la proteína por método de Bradford y se fraccionará en geles SDS-PAGE, se hará transferencia a membrana de nitrocelulosa y se incubará con anticuerpos específicos a Mal/TIRAP, STAT3, SOCS3, 38MAPK, ERK, JNK, posteriormente se revelará con anticuerpo secundario.

9. Clasificación de las mutaciones

Las mutaciones se clasificarán a cuerdo a lo reportado por Broides *et al.*²⁶ de la siguiente manera:

1. Moderada: mutaciones que derivan en sustituciones de aminoácidos y defectos de splicing que ocurren en sitios conservados pero no invariantes.
2. Graves: Mutaciones que ocasionan defectos de splicing en sitios invariantes dentro de la secuencia consenso del splice (los primeras dos o los dos últimos pares de bases de un intron), codones de paro prematuro, corrimiento del marco de lectura.

10. Recolección de la información clínica

Se revisarán los expedientes clínicos, así como interrogatorio de pacientes y sus familiares, de todos los pacientes con diagnóstico de XLA que sean incluidos en el estudio y se recabará la siguiente información contenida en la hoja de recolección de datos, ver adelante.

Tamaño de la muestra

Ya que la XLA es una enfermedad con una prevalencia de 1/200,000 habitantes³⁰ el tamaño de la muestra será a conveniencia y se incluirán todos los pacientes con XLA que sean referidos del Hospital Infantil de México, Hospital Niño DIF Hidalgo, Centro Medico "La Raza", Hospital General Regional # 25 IMSS Monterrey Nuevo León a la unidad de investigación en inmunodeficiencias para su diagnóstico en al menos 2 años. De febrero de 2011 a febrero de 2012 fueron referidos un total de 20 pacientes, mismos que son candidatos a ingresar al protocolo, estimamos que durante el estudio ingresarían al menos 40 pacientes.

Análisis estadístico

Las características clínicas de los pacientes serán resumidas con porcentajes y gráficos de pastel para aquellas variables cualitativas nominales dicotómicas o politómicas (XLA, bronquiectasias, tipo de mutación, dominio, Btk) y con medidas de tendencia central y de dispersión como media, mediana, desviación estándar y gráfico de barras, para las variables cuantitativas, para identificar la forma de distribución de los datos.

Las concentraciones de las citocinas en pacientes con XLA será comparada con la producida por su control sano correspondiente. Se identificará la existencia de asociación calculando OR utilizando una prueba de regresión logística, entre los cambios en la producción de citocinas con el tipo de mutación, el dominio de Btk afectado, manifestaciones clínicas, procesos infecciosos, complicaciones, bronquiectasias y autoinmunidad.

XI. ACTIVIDADES REALIZADAS

Durante mi servicio social en el Instituto Nacional de Pediatría, estuve en la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias . Es un centro donde se realiza investigación básica y clínica de las inmunodeficiencias primarias, diagnósticos oportunos a través de pruebas funcionales o moleculares, y dan a conocer este grupo de enfermedades a médicos de primer contacto y a la población a nivel nacional .

De mis principales actividades realizadas fueron académicas, los primeros temas de los cuales tuvimos clases fueron sobre la fisiología del sistema inmunitario, también sobre los procedimientos en laboratorio para realizar diagnósticos y sobre la clasificación, fisiopatología, clínica y tratamiento de las inmunodeficiencias primarias.

Además cada martes de la semana se presentaban casos con diagnósticos de difícil abordaje y que su ADN se manda a secuenciación de exoma y se analizaba la posible alteración del exoma que podría ocasionar las manifestaciones clínicas. Los días miércoles acudíamos a consulta externa de inmunología donde se citaban pacientes con inmunodeficiencias primarias , se interrogaban , exploraban y analizábamos los casos.

Ya que es un hospital de tercer nivel, recibía casos referidos para guiar el diagnóstico y tratamiento, todos participábamos en el abordaje y búsqueda de información para análisis del caso clínico y en caso de ser candidato se investigaba en el laboratorio de inmunodeficiencias.

Realicé presentación de cartel en dos congresos sobre una serie de casos clínicos de pacientes con diagnóstico confirmado de deficiencia de DOCK8. Fue presentando en el 37 Congreso Nacional de Pediatría y en la reunión de la Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias.

Parte de mis actividades de laboratorio fueron realizar expresión de citometría de flujo de las proteínas WAS , DOCK8 y ATM para el diagnóstico de la deficiencia de estas proteínas en las inmunodeficiencias primarias. Realizamos subpoblaciones de linfocitos y

linfoproliferación en sangre para caracterizar a los pacientes con inmunodeficiencia combinada severa. Además de realizar ELISAS para determinación de citocinas en pacientes con XLA, que eran parte de mi protocolo.

En todas realizábamos su lectura y análisis para brindar un diagnóstico al paciente.

Realicé búsqueda bibliográfica de mi respectivo protocolo de investigación, para mi presentación del cartel, la presentación de clases y análisis de casos clínicos de pacientes referidos.

En la Tabla 1 en la sección de anexos se puede observar la distribución por mes de horas de clases, búsqueda bibliográfica, laboratorio y análisis de resultados así como asistencia a congresos.

XII. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

Logramos recabar la muestra de sangre periférica de trece pacientes con diagnóstico de XLA. De los trece pacientes se incluyeron once y dos se excluyeron debido a que uno presentaba un proceso infeccioso cutáneo severo al momento del estudio y en el otro paciente la muestra fue insuficiente.

Determinamos por técnica de ELISA la producción de citocinas (IL-10, TNF-, IL-1 β , IL-6) en sobrenadante de cultivo células mononucleares de sangre periférica estimuladas con ligandos de TLR4, TLR7/8, TLR9.

XIII. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Presentaremos el reporte de avances obtenidos del análisis de las muestras de los once pacientes recabados para este estudio y redactaremos la forma de distribución de los datos.

Las muestras fueron analizadas de acuerdo al siguiente orden de colocación del estímulo:

1. Sin estímulo
2. PAM3
3. PAM2
4. Poli 1:c
5. LPS
6. Flagelina
7. R848
8. ODN

Con una dilución de la muestra de 1:10 para Interleucina 10 y 1:80 para el resto de las interleucinas y TNFa, se estimularon y midieron las Interleucinas 1, 6 y 10 así como el Factor de Necrosis Tumoral alfa en los cultivos celulares. Analizamos las medidas de concentración que obtuvimos por Western Blot .

En total obtuvimos 352 datos, los ordenamos en SPSS Statistics Versión 22. Y obtuvimos sus estadísticos descriptivos.

En la Tabla 2 en la sección de anexos, se incluye el valor de media, mediana, el mínimo y máximo y desviación estándar de la producción de citocina IL-10, TNF-, IL-1 β , IL-6 en células de sangre periférica, con cada estímulo con ligandos de TLR4, TLR7/8, TLR9 .

En el Gráfico 2 en la sección de anexos, observamos los datos en diagrama de cajas donde se observa la mediana de la concentración de citocina por cada estímulo y en cada interleucina producidas en las células de sangre periférica.

Se puede observar que presentó mayor cantidad de concentración la interleucina 6 para todos los estímulos, la interleucina 10 alcanzaba menores concentraciones de citocina para todos los estímulos en las células de sangre periférica.

Este protocolo continua en estudio, lo que permitirá obtener las muestras pareadas de los controles, así como realizar la historia clínica completa y conocer las mutaciones de cada paciente para poder realizar un análisis de variables

Pudo concluir analizando que realizar mi servicio social en el Instituto Nacional de Pediatría, hizo que mi forma de ver la medicina cambiará . Comprendí que todos los días se conocen e investiga en México nuevas enfermedades y la forma de diagnosticarlas. Pude observar que la investigación científica es necesaria para la mejora de la comprensión de las enfermedades, que reunir todos los elementos de la historia clínica nos pueden orientar a un diagnóstico más certero y que al paciente hay que valorarlo integralmente para que de la mano de todas las manifestaciones clínicas podamos unificar el diagnóstico.

IX. RECOMENDACIONES

Este año de servicio social me brindó la oportunidad de estar en un laboratorio rodeado de grandes investigadores. Comprendí que para lograr conocer las enfermedades y mejores tratamientos, la investigación es la gran herramienta que nos permite crecer. Fue un año en que me acerque con el área científica, microscópica y molecular que tiene la medicina. Me dejo fascinada lo que hacen en la unidad de investigación en inmunodeficiencias, recomendaría que siguiera siendo una opción de vinculación, ya que nos impulsa a los alumnos a acercarnos cada día más a la medicina basada en evidencias y seguir implementando

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Rezaei N, Bonilla F, de Vries E, Sullivan KE, and Orange J (2008) An Introduction to Primary Immunodeficiency Diseases. In: Rezaei N, Aghamohammadi A, Notarangelo LD (eds) Primary Immunodeficiency Diseases. Springer, Spain, pp 1-38
2. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, Hammarstrom L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck JM, Roifman C, Seger R, and Wedgwood J (2007) Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of

Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol* 120 (4):776-794

3. ESID. Immunodeficiency Registry. <http://www.esid.org/statistics.php?sub=1>. 2009.

Ref Type: Online Source

4. Leiva LE, Zelazco M, Oleastro M, Carneiro-Sampaio M, Condino-Neto A, Costa-Carvalho BT, Grumach AS, Quezada A, Patino P, Franco JL, Porras O, Rodriguez FJ, Espinosa-Rosales FJ, Espinosa-Padilla SE, Almillategui D, Martinez C, Tafur JR, Valentin M, Benarroch L, Barroso R, and Sorensen RU (2007) Primary immunodeficiency diseases in Latin America: the second report of the LAGID registry. *J Clin Immunol* 27 (1):101-108

5. Aghamohammadi A, Lougaris V, Plebani A, Miyawaki T, Durandy A, and Hammarstrom L (2008) Predominantly Antibody Deficiencies. In: Rezaei N, Aghamohammadi A, Notarangelo LD (eds) *Primary Immunodeficiency Diseases*. Springer, Spain, pp 97-105

6. Mohamed AJ, Yu L, Backesjo CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, Christensson B, Berglof A, Vihinen M, Nore BF, and Smith CI (2009) Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev* 228 (1):58-73

7. Valiaho J, Smith CI, and Vihinen M (2006) BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat* 27 (12):1209-1217

8. Doyle SL, Jefferies CA, Feighery C, and O'Neill LA (2007) Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton's tyrosine kinase. *J Biol Chem* 282 (51):36953-36960

9. Jefferies CA and O'Neill LA (2004) Bruton's tyrosine kinase (Btk)-the critical tyrosine kinase in LPS signalling? *Immunol Lett* 92 (1-2):15-22

10. Hasan M, Lopez-Herrera G, Blomberg KE, Lindvall JM, Berglof A, Smith CI, and Vargas L (2008) Defective Toll-like receptor 9-mediated cytokine production in B cells from Bruton's tyrosine kinase-deficient mice. *Immunology* 123 (2):239-249

11. Jefferies CA, Doyle S, Brunner C, Dunne A, Brint E, Wietek C, Walch E, Wirth T, and O'Neill LA (2003) Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 278 (28):26258-26264

12. Lee KG, Xu S, Wong ET, Tergaonkar V, and Lam KP (2008) Bruton's tyrosine kinase separately regulates NFkappaB p65/RelA activation and cytokine interleukin (IL)-10/IL-12 production in TLR9-stimulated B Cells. *J Biol Chem* 283 (17):11189-11198
13. Schmidt NW, Thieu VT, Mann BA, Ahyi AN, and Kaplan MH (2006) Bruton's tyrosine kinase is required for TLR-induced IL-10 production. *J Immunol* 177 (10):7203-7210
14. Horwood NJ, Page TH, McDaid JP, Palmer CD, Campbell J, Mahon T, Brennan FM, Webster D, and Foxwell BM (2006) Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. *J Immunol* 176 (6):3635-3641
15. Horwood NJ, Mahon T, McDaid JP, Campbell J, Mano H, Brennan FM, Webster D, and Foxwell BM (2003) Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 197 (12):1603-1611
16. Jyonouchi H, Geng L, Toruner GA, Vinekar K, Feng D, and Fitzgerald-Bocarsly P (2008) Monozygous twins with a microdeletion syndrome involving BTK, DDP1, and two other genes; evidence of intact dendritic cell development and TLR responses. *Eur J Pediatr* 167 (3):317-321
17. Sochorova K, Horvath R, Rozkova D, Litzman J, Bartunkova J, Sediva A, and Spisek R (2007) Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF-alpha production in antigen-presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Blood* 109 (6):2553-2556
18. Taneichi H, Kanegane H, Sira MM, Futatani T, Agematsu K, Sako M, Kaneko H, Kondo N, Kaisho T, and Miyawaki T (2008) Toll-like receptor signaling is impaired in dendritic cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol* 126 (2):148-154
19. Zorn CN, Keck S, Hendriks RW, Leitges M, Freudenberg MA, and Huber M (2009) Bruton's tyrosine kinase is dispensable for the Toll-like receptor-mediated activation of mast cells. *Cell Signal* 21 (1):79-86
20. Marron TU, Martinez-Gallo M, Yu JE, and Cunningham-Rundles C (2012) Toll-like receptor 4-, 7-, and 8-activated myeloid cells from patients with X-linked agammaglobulinemia produce enhanced inflammatory cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 129 (1):184-190

21. Doyle SL, Jefferies CA, and O'Neill LA (2005) Bruton's tyrosine kinase is involved in p65-mediated transactivation and phosphorylation of p65 on serine 536 during NFkappaB activation by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 280 (25):23496-23501
22. Gray P, Dunne A, Brikos C, Jefferies CA, Doyle SL, and O'Neill LA (2006) MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. *J Biol Chem* 281 (15):10489-10495
23. Mansell A, Smith R, Doyle SL, Gray P, Fenner JE, Crack PJ, Nicholson SE, Hilton DJ, O'Neill LA, and Hertzog PJ (2006) Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* 7 (2):148-155
24. Kobayashi T, Takaesu G, and Yoshimura A (2006) Mal-function of TLRs by SOCS. *Nat Immunol* 7 (2):123-124
25. Basile N, Danielian S, Oleastro M, Rosenzweig S, Prieto E, Rossi J, Roy A, and Zelazko M (2009) Clinical and molecular analysis of 49 patients with X-linked agammaglobulinemia from a single center in Argentina. *J Clin Immunol* 29 (1):123-129
26. Broides A, Yang W, and Conley ME (2006) Genotype/phenotype correlations in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol* 118 (2-3):195-200
27. Chun JK, Lee TJ, Song JW, Linton JA, and Kim DS (2008) Analysis of clinical presentations of Bruton disease: a review of 20 years of accumulated data from pediatric patients at Severance Hospital. *Yonsei Med J* 49 (1):28-36
28. Hashimoto S, Miyawaki T, Futatani T, Kanegane H, Usui K, Nukiwa T, Namiuchi S, Matsushita M, Yamadori T, Suemura M, Kishimoto T, and Tsukada S (1999) Atypical X-linked agammaglobulinemia diagnosed in three adults. *Intern Med* 38 (9):722-725
29. Lopez-Granados E, Perez de DR, Ferreira CA, Fontan CG, and Garcia Rodriguez MC (2005) A genotype-phenotype correlation study in a group of 54 patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 116 (3):690-697
30. Samarghitean C, Valiaho J, and Vihinen M (2007) IDR knowledge base for primary immunodeficiencies. *Immunome Res* 3:6
31. Edith González-Serrano, Iris Estrada-García, Dolores Mogica-Martínez, Alejandro González-Garay, Gabriela López-Herrera, Laura Berrón-Ruiz, Sara Elva Espinosa-Padilla,

Marco Antonio Yamazaki-Nakashimada, Alexander Vargas-Hernández, Leopoldo Santos-Argumedo, Sergio Antonio Estrada-Parra, Francisco J. Espinosa-Rosales. Increased pro-inflammatory cytokine production after lipopolysaccharide stimulation in patients with X-linked agammaglobulinemia. Journal of Clinical Immunology. En revisión.

XI. ANEXOS

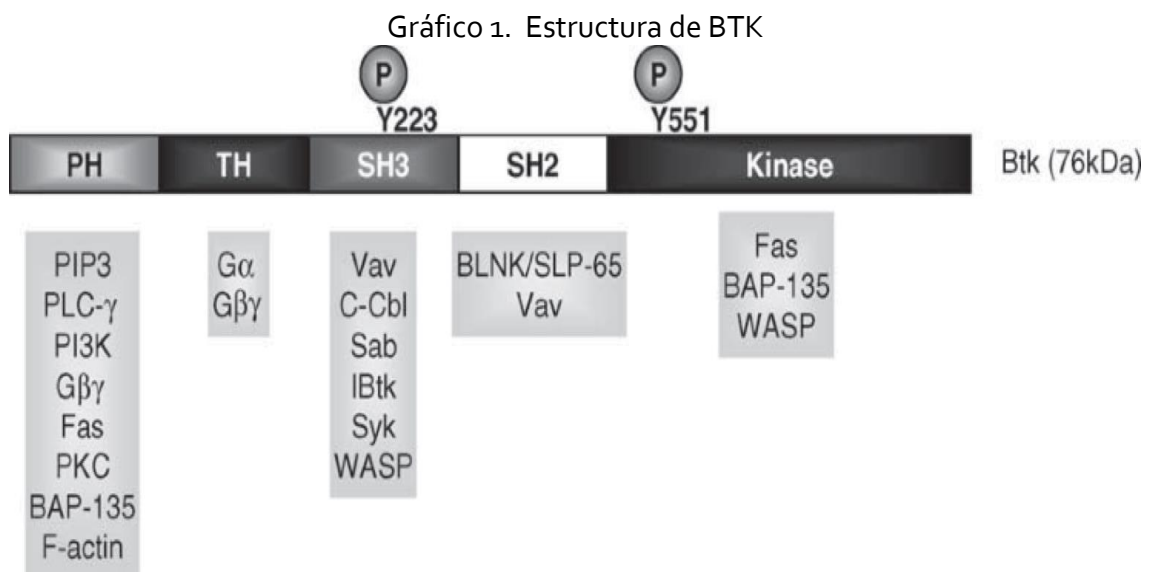


Tabla 3. Tablas de disposición de horas en período

PERIODO DE DURACIÓN : 01 DE FEBRERO DEL 2019 AL 31 DE ENERO DEL 2020

FEBRERO 2019	
Búsqueda bibliográfica	36 horas
Laboratorio	36 horas
Lectura y análisis de resultados	18 horas
Clases	6 horas
Asistencia a congresos	24 horas
HORAS TOTALES	120H

MARZO 2019	
Búsqueda bibliográficas	30 horas
Laboratorio	48 horas
Lectura y análisis de resultados	36 horas
Clases	12 horas
HORAS TOTALES	126H

ABRIL 2019	
Búsqueda bibliográfica	50 horas
Laboratorio	24 horas
Lectura y análisis de resultados	36 horas
Clases	10 horas
HORAS TOTALES	120H

MAYO 2019	
Búsqueda bibliográfica	6 horas
Laboratorio	48 horas
Lectura y análisis de resultados	24 horas
Clases	6 horas
Lectura de expedientes	36 horas
HORAS TOTALES	120H

JUNIO 2019	
Búsqueda bibliográfica	36 horas
Laboratorio	18 horas
Lectura y análisis de resultados	24 horas
Clases	6 horas
Lectura de expedientes	36 horas
HORAS TOTALES	120H

JULIO 2019	
Búsqueda bibliográfica	14 horas
Laboratorio	12 horas
Lectura y análisis de resultados	12 horas
Clases	8 horas
Lectura de expedientes	36 horas
Asistencia a congresos	32 horas
HORAS TOTALES	114H

AGOSTO 2019	
Búsqueda bibliográfica	36 horas
Laboratorio	36 horas
Lectura y análisis de resultados	12 horas
Clases	8 horas
Lectura de expedientes	40 horas
HORAS TOTALES	132H

SEPTIEMBRE 2019	
Búsqueda bibliográfica	12 horas
Laboratorio	36 horas
Lectura y análisis de resultados	36 horas
Clases	8 horas
Lectura de expedientes	28 horas
HORAS TOTALES	120H

OCTUBRE 2019	
Laboratorio	36 horas
Lectura y análisis de resultados	36 horas
Asistencia a congresos	50 horas
HORAS TOTALES	122H

NOVIEMBRE 2019	
Búsqueda bibliográfica	30 horas
Laboratorio	40 horas
Lectura y análisis de resultados	36 horas
Clases	8 horas
Asistencia a congresos	12 horas
HORAS TOTALES	126H

DICIEMBRE 2019	
Búsqueda bibliográfica	40 horas
Laboratorio	20 horas
Lectura y análisis de resultados	20 horas
Clases	10 horas
HORAS TOTALES	90H

ENERO 2020	
Búsqueda bibliográfica	30 horas
Laboratorio	50 horas
Lectura y análisis de resultados	48 horas
Clases	10 horas
HORAS TOTALES	138H

HORAS TOTALES DE TRABAJO	
Búsqueda bibliográfica	320h
Laboratorio	404h
Lectura y análisis de resultados	338h
Clases	92h
Asistencia a congreso	118h
Lectura de expedientes	176h
HORAS TOTALES	1448H

Tabla 2. Estadísticos descriptivos de concentración de citocina por estímulo

				Concentración				
				Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
Interleucina	IL-1	Estímulo	Sin estimular	6872,637	3245,750	27,381	18685,684	7191,011
			PAM3	6197,865	3290,662	137,043	16675,021	5310,449
			PAM2	5220,167	1437,643	289,755	13482,286	5425,476
			Poli I:C	7044,896	4176,176	158,568	23474,787	7481,345
			LPS	10338,668	5045,291	624,000	28218,278	9889,265
			Flagelina	9198,717	7619,840	624,000	27097,020	8516,462
			R848	9481,560	7652,637	2585,531	26823,357	7909,013
			ODN	5521,124	2060,782	624,000	19613,098	6693,384
	IL-6	Estímulo	Sin estimular	15186,435	8417,373	210,982	50813,941	17218,583
			PAM3	18986,774	8604,742	61,760	56631,864	19659,748
			PAM2	12611,160	5340,051	556,987	44516,348	14407,902
			Poli I:C	15842,484	5361,693	624,000	52670,725	17749,402
			LPS	20429,803	16513,530	919,789	61691,600	21286,290
			Flagelina	21252,432	21251,341	285,594	56987,748	19160,955
			R848	19646,022	23024,146	490,774	49591,558	16770,574
			ODN	13683,164	4538,432	624,000	46729,016	15353,917
	IL-10	Estímulo	Sin estimular	748,506	136,748	30,812	3417,919	1053,925
			PAM3	1451,658	423,568	62,400	6676,495	2169,419
			PAM2	849,237	231,756	62,400	3173,526	1146,455
			Poli I:C	1066,419	251,476	4,811	6060,986	1794,768
			LPS	2287,218	417,832	59,776	10659,199	3264,019
			Flagelina	1982,905	561,242	62,400	7807,945	2596,938
			R848	1166,258	262,949	62,175	6938,992	2033,985
			ODN	451,417	148,221	14,518	1336,051	489,169
	TNFa	Estímulo	Sin estimular	4017,840	2209,123	257,021	19560,405	5666,113
			PAM3	3636,532	2230,688	62,744	9304,062	3414,300
			PAM2	2652,405	973,732	392,820	10718,736	3338,758
			Poli I:C	4697,880	1605,466	70,298	23499,227	7033,759
LPS			8664,858	3872,654	624,000	31075,356	10238,967	
Flagelina			6770,885	3108,788	411,820	19366,318	7138,117	
R848			11093,982	9800,116	624,000	32839,106	10273,505	
ODN			4170,608	1327,656	375,845	19507,126	5956,145	

Gráfico 2. Diagrama de cajas de concentración de citocina por estímulo

