

Estudios moleculares en algunos genes candidatos a Inmunodeficiencias Primarias en 4 pacientes del área asistencial del Grupo Inmunodeficiencias Primarias de la Universidad de Antioquia

Molecular studies in some candidate genes for Primary Immunodeficiency's in 4 patients from the primary immunodeficiency group at the University of Antioquia

¹Laura Naranjo Piedrahita, ²Claudia M. Trujillo Vargas

Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Resumen

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son enfermedades raras ocasionadas por defectos genéticos y/o hereditarios en moléculas involucradas en la respuesta inmune. Actualmente estas enfermedades se dividen en 9 subgrupos, dentro de las cuales se encuentran las deficiencias predominantemente de anticuerpos y las deficiencias del complemento. Dentro de las deficiencias predominantemente de anticuerpos se encuentra la Inmunodeficiencia Común Variable (ICV), la cual es una de las IDPs más frecuentes y más del 90% de los pacientes no tienen un diagnóstico molecular definido. También se encuentran las deficiencias del complemento dentro de las cuales se encuentra la Deficiencia de C3, la segunda mayormente reportada según LASID.

La caracterización genética de estas enfermedades es muy importante, para realizar consejería genética y proponer terapias más específicas. En el presente trabajo se realizó un análisis de secuenciación del exoma en cuatro pacientes (3 de ellos con diagnóstico de ICV y 1 con deficiencia del complemento), se identificaron cuatro variantes en 4 genes priorizados (*TNFRSF9*, *A2M*, *TCF3* y *C3*) y posteriormente se realizó una confirmación de las mutaciones encontradas. A uno de los pacientes se le realizó la medición de alfa 2-macroglobulina y se encontraba disminuida, lo cual indica que la mutación en este gen posiblemente influya en la producción de la proteína. Al paciente donde se le encontró la variante en el gen *TCF3*, se le realizó también un modelamiento de su proteína, pero ésta no fue concluyente, ya que según el gráfico de Ramachandran la mayoría de los residuos de aminoácidos no se encontraban en la zona favorable y por lo tanto la estructura secundaria de la proteína podría ser errada. Se encontró además una disminución en la proteína C3 en el paciente con mutaciones en este gen, entonces se realizó pruebas funcionales de complemento al paciente, en el cual se identificó que no tenía la proteína.

Para concluir, el presente trabajo identifica 3 nuevas variantes en los genes mencionados anteriormente y que pueden influir directamente en la producción de cada una de las proteínas que codifican. Se necesitan más estudios posteriores que realicen procedimientos para analizar funcionalmente cada una de esas proteínas.

Palabras clave: Inmunodeficiencias Primarias, Inmunodeficiencia común variable, deficiencia del complemento, *TNFRSF9*, *A2M*, *TCF3* y *C3*, variante, mutación, exoma.

Abstract

Primary immunodeficiencies (PID) are rare diseases caused by genetic and / or hereditary defects in molecules involved in the immune response. Currently these diseases are divided into 9 subgroups, among which are predominantly antibody deficiencies and complement deficiencies. Among the predominantly antibody deficiencies is Common Variable Immunodeficiency (CVID), which is one of the most frequent PIDs and more than 90% of patients do not have a defined molecular diagnosis. Complement deficiencies are also found within which the C3 deficiency is found, the second mostly reported, according to LASID. The genetic characterization of these diseases is very important, to perform genetic counseling and propose more specific

¹Estudiante de Microbiología y Bioanálisis, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia

²Asesora, profesora asociada, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia

therapies. In the present work, exome sequencing analysis was performed for 4 patients (3 of them with diagnosis of CVID and 1 with complement's deficiency) and 4 variants were identified in 4 prioritized genes (*TNFRSF9*, *A2M*, *TCF3* and *C3*). One of the patients underwent the measurement of A2M and it was diminished, which indicates that the mutation possibly influences the production of the protein. The protein variant in *TCF3* gene was also modeled, but this was not conclusive, since according to the Ramachandran graph, most of the amino acid residues were not in the favorable zone and therefore the secondary structure of the protein might be not accurate. A decrease in the C3 protein was also found, then a complement test was performed on the patient, in which it was identified that it did not have the protein. To conclude, the present work identifies 3 new variants in the genes mentioned above that can directly influence the production of each of the proteins they encode. Further studies are needed to perform procedures to functionally analyze each of these proteins.

Key words: Primary immunodeficiencies, common variable immunodeficiency, complement deficiency, *TNFRSF9*, *A2M*, *TCF3* and *C3*, variant, mutation, exome.

Introducción

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son enfermedades raras ocasionadas por defectos genéticos y/o hereditarios en moléculas involucradas en la respuesta inmune. En la actualidad hay 354 desórdenes diferentes con 344 genes identificados (Picard et al., 2018). Son enfermedades que pueden ser monogénicas o poligénicas (que afecten uno o varios genes, respectivamente) (Bonilla y Geha, 2003). La frecuencia estimada es de 1:1200 individuos en Estados Unidos (Boyle y Buckley, 2007). Estas enfermedades confieren una susceptibilidad elevada a infecciones en tracto respiratorio que es una de las primeras manifestaciones (además de tener infecciones a repetición) manifestaciones autoinmunes, inflamatorias, alérgicas y cáncer; y tienen una evolución variable, algunas veces severa o incluso letal (Elorz Lambarri et al., 2004).

Según la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS), las IDP se clasifican de la siguiente manera (Picard et al., 2018):

1. Inmunodeficiencias que afectan la inmunidad celular y humoral.
2. Inmunodeficiencias combinadas con características sindrómicas asociadas
3. Deficiencias predominantemente de anticuerpos
4. Enfermedades con disregulación inmune

5. Defectos congénitos en el número y/o función de los fagocitos
6. Defectos en la inmunidad innata
7. Desórdenes auto-inflamatorios
8. Deficiencias del complemento
9. Fenocopias de Errores Innatos de la Inmunidad.

Entre ellas, las deficiencias predominantemente de anticuerpos son las más comunes, representando aproximadamente el 67% de estas enfermedades (Javier et al., 2000). Este subgrupo se subclasifica en (Picard et al., 2018):

1. Reducción severa de isotipos de inmunoglobulinas (Ig) en el suero, con linfocitos B disminuidos o ausentes.
2. Reducción severa en al menos dos isotipos de Ig en el suero, con número normal o bajo de linfocitos B.
3. Reducción severa de IgG e IgA con IgM normal/elevado en el suero y número normal de linfocitos B.
4. Deficiencias en las cadenas livianas de los isotipos de Ig, generalmente con número normal de linfocitos B.

La Inmunodeficiencia Común Variable (ICV) que es la IDP sintomática más frecuente se ubica en el grupo de deficiencias predominantemente de anticuerpos, subgrupo 2 (Picard et al., 2018). Tiene una prevalencia de 1 por cada 10.000 - 50.000 nacidos vivos, afectando por igual a ambos géneros (Vélez

et al., 2015). Más del 90% de los casos no tienen un diagnóstico molecular definido u otra explicación causal (Romero y Juri, 2013). La mayoría de los casos son esporádicos y sólo el 20 a 25% tiene una historia familiar, con una herencia autosómica dominante (Vélez et al., 2015). La enfermedad se caracteriza por hipogammaglobulinemia (niveles séricos de IgG e IgA y ocasionalmente IgM disminuidos de acuerdo a los parámetros establecidos para la edad y sexo) (Vélez et al., 2015) (Bonilla et al., 2016). Además, los pacientes presentan deficiente producción de anticuerpos específicos tras la inmunización, defectuosa función de los linfocitos B, lo que confiere mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas (Vélez et al., 2015). Aproximadamente el 73% de los pacientes desarrollan neumonía y *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o *Mycoplasma sp* son los agentes más comúnmente aislados. También se desarrollan menos frecuentemente infecciones severas tales como empiema, sepsis, meningitis u osteomielitis (Kainulainen et al., 2001), aunque en un estudio realizado a 476 pacientes con ICV, el 90% tenía 1 o más de las complicaciones mencionadas anteriormente (Cunningham-Rundles, 2010). Las infecciones recurrentes pueden causar cambios estructurales como bronquiectasias en el 33% al 80% (Bonilla et al., 2016). Del 20% al 67% restantes pueden desarrollar problemas relacionados con la autoinmunidad, enfermedad pulmonar intersticial, granulomatosa, hepática, inflamatoria gastrointestinal, hiperplasia linfóide, cáncer o linfoma (Bonilla et al., 2016).

Aunque idealmente el diagnóstico se debe realizar en la infancia temprana para prevenir secuelas graves, la enfermedad se manifiesta principalmente en la adultez (Bonilla et al., 2016).

Dentro de las Deficiencias del Complemento (Grupo 8 de IDP según la clasificación de la IUIS) se encuentran aquellas de componentes únicos de estas vías o las de proteínas

reguladoras del sistema. Estas deficiencias ocupan un 2,5% del total de las IDP reportadas por la Sociedad Latinoamericana para las Inmunodeficiencias (LASID) hasta el año 2014 (Condino-Neto et al., 2015). Además, dentro de la categoría de las deficiencias del complemento, el angioedema hereditario es la deficiencia más reportada con 167 casos hasta 2016 por LASID, seguido por las deficiencias de C3 y C4 con 12 y 13 casos respectivamente (Registros LASID 2016:

https://registrolasid.org/docs/Estatisticas_LASID-2016_Set.pdf). La deficiencia de C3 tiene un patrón de herencia autosómico recesivo. Varias de las funciones claves para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune como la opsonización, la quimiotaxis y la actividad bactericida están ausentes o disminuidas en pacientes con esta IDP (Fuentes et al., 2016). Los individuos afectados tienen <1% de los niveles normales de C3, lo cual confiere una susceptibilidad incrementada a infecciones como neumonía, amigdalitis, sinusitis, otitis, bacteriemia, meningitis y osteomielitis. Los microorganismos más frecuentes son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*. Raramente, la deficiencia de C3 ocasiona lupus eritematoso sistémico, pero puede cursar con glomerulonefritis membrano-proliferativa y glomerulonefritis mesangiocapilar en un 26% de los casos, en los cuales los anticuerpos antinucleares son normalmente indetectables (Pettigrew et al., 2009).

La caracterización genética de estas enfermedades es muy importante, para realizar consejería genética y proponer terapias más específicas. Para identificar estos defectos genéticos, se cuenta actualmente con varias herramientas de biología molecular, entre las cuales se destaca la secuenciación del exoma, la cual es clave para identificar variantes en las regiones codificantes de genes relacionados

con deficiencias en moléculas específicas que confieren un fenotipo clínico.

El exoma es la parte del genoma formado por los exones. Cuando se realiza el corte-empalme del ARN, los intrones se remueven para transcribir ARN maduro en todo tipo de células. El exoma está constituido por ~180,000 exones que codifican ~20,000 proteínas y a su vez constituye del 1 - 1,5% del genoma total. Se estima que alrededor del 85% de las mutaciones en el genoma se encuentran en el exoma (Ng et al., 2009). La secuenciación del exoma (Del inglés, *Whole exome sequencing*, WES) es una tecnología avanzada de secuenciación masiva; es más útil si se realiza al paciente y los progenitores (quienes constituyen una referencia para descartar variantes benignas - en el caso de no tener síntomas- o establecer el patrón de herencia) (Choi et al., 2009). Del WES se generan secuencias cortas (< 250 nucleótidos) de ADN amplificado llamadas *reads*. Un aspecto importante a mencionar en el WES es la cobertura y profundidad. La cobertura se refiere al porcentaje del genoma de referencia que es secuenciado un determinado número de veces (10X). De aquí se induce que algunas regiones del genoma de referencia no se alcanzan a cubrir con el WES. Por su parte, la profundidad es el número de veces promedio que una determinada base está presente en los *reads*, es decir, el número de veces que se ha leído esa misma región del genoma en un determinado WES. Este aspecto es muy importante debido a que es la exactitud de que el nucleótido asignado este verdaderamente en esa posición en el genoma, de tal manera que, si está presente una mutación, varias de las lecturas tendrán la misma mutación. Esto permite diferenciar si ha ocurrido un error en la secuenciación, ya que, si existe un error, la probabilidad de que ese mismo error se lea varias veces es muy baja (Sims et al., 2014) (Protocolo 2015 http://contenidos.institutoroche.es/pdf/2015/g_en_data.pdf). Dentro de las ventajas que ofrece este método comparado con la

secuenciación tradicional por Sanger, es que permite una secuenciación más rápida y tiene costos más bajos por base secuenciada. Permite el procesamiento de múltiples muestras de pacientes al mismo tiempo gracias a la librería que posee. Con esta tecnología, se pueden investigar variantes en genes que antes se consideraban raramente implicadas con enfermedades sin aumentar el costo de la prueba (Lay-Son y León, 2015). Como limitaciones se encuentra que esta tecnología por sí sola no identifica mutaciones inestables por expansión de nucleótidos o alteraciones epigenéticas, porque deben identificarse mediante otras técnicas. Dependiendo de la cobertura y profundidad del análisis, los niveles de lecturas en algunas regiones del genoma pueden ser bajos, lo cual representa pérdida de información relevante. Debido a la gran cantidad de datos que se generan y a la gran cantidad de variantes no reportadas previamente, puede haber confusión en la información, pero esto se facilita si el estudio se le realiza en simultáneo a los padres y otros familiares afectados (Lay-Son y León, 2015).

La secuenciación se compone de cuatro pasos sencillos: Preparación de la muestra, preparación de la librería, secuenciación y análisis de datos. Para la preparación de la muestra, se corta el ADN y se añaden adaptadores en los finales 3' y 5', los cuales tienen regiones complementarias a secuencias en la celda de flujo en la que se preparan las librerías. La celda de flujo está fabricada a base de capas de vidrio muy delgadas, con varios canales y cada uno de estos, está asociado a dos tipos de oligonucleótidos, que son secuencias universales que se unen a los adaptadores previamente unidos a las cadenas de ADN. Luego, cada fragmento es isotérmicamente amplificado con la ayuda de una polimerasa, para luego desnaturalizarlos. En este proceso, la cadena original de ADN se descarta por medio de lavados y en la lámina queda la complementaria, la cual luego forma un bucle con las secuencias complementarias

en la celda de flujo. Eso se repite una y otra vez hasta crear millones de copias, que resulta en una amplificación clonal del ADN. Después, se lavan todas las secuencias *reverse* y quedan las secuencias *forward*, a las cuales se unen nucleótidos marcados con fluorescencia que emiten una señal específica en el equipo; a este proceso se le llama secuenciación por síntesis. Luego se hace nuevamente el proceso para la región *reverse*. Finalmente el equipo separa las regiones *forward* y *reverse* por medio de colores específicos y las organiza para luego presentar el resultado (<https://www.illumina.com/>). En el proceso de análisis, la calidad de los *reads* se verifica, ellos son organizados de acuerdo a cada cromosoma, luego los *reads* son comparados con un genoma de referencia para identificar las variantes, que posteriormente se clasifican en *indels* que son inserciones o deleciones en la secuencia genética; *SNPs* (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) que son nucleótidos únicos que se insertan en la secuencia ya sea en regiones codificantes y no codificantes; también existen los *CNV* (del inglés *Copy Number Variation*) que corresponde a regiones largas del genoma que sufrieron un proceso de deleción o de duplicación en los cromosomas. Luego de esta clasificación, se analiza el potencial patogénico de las variantes con algunos programas de predicción como ANNOVAR, SAMtools, Picard, GATK y SeattleSeq Variation Annotation (<https://www.illumina.com/>). Estos programas tienen en cuenta la frecuencia de las variantes en algunas poblaciones según bases de datos tales como 1000 genomas o ExAC, entre otros.

Es importante aproximarse molecularmente a estos defectos genéticos, ya que en varias de las enfermedades descritas anteriormente se requiere urgentemente el desarrollo de terapias más específicas y costo-efectivas para su manejo. En el año 2015 por ejemplo, se reportaron 34 nuevos defectos genéticos

involucrados en el desarrollo de IDP (Picard et al., 2015).

El objetivo principal de este estudio es caracterizar molecularmente genes candidatos a IDP obtenidos a partir de WES. Los objetivos específicos del estudio fueron, analizar el WES de los pacientes incluidos en el estudio, seleccionar las variantes en los genes que fueran potencialmente deletéreas, confirmar mediante secuenciación por Sanger las variantes seleccionadas y realizar su modelamiento *In Silico* o pruebas cuantitativas y funcionales, cuando fuera posible.

Aspectos éticos

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de donadores sanos y de los pacientes del área asistencial del grupo incluidos en este estudio, los cuales fueron reclutados voluntariamente. El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Sede de Investigaciones Universitarias (SIU), Universidad de Antioquia (UdeA). Se obtuvo consentimientos informados para todos los participantes, de acuerdo a los estándares de la Declaración de Helsinki.

Metodología

Población

Este es un estudio de serie de casos. En un estudio previo, se seleccionaron algunos pacientes previamente diagnosticados con IDP para realizar WES. De estos pacientes, cuatro fueron seleccionados para este estudio teniendo en cuenta que estuvieran en seguimiento por el área asistencial del grupo de IDP (GIDP) de la Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia (UdeA). Se realizó una revisión de las historias clínicas de cada paciente. Se excluyeron los pacientes con diagnóstico genético previo y aquellos con síndrome de infección recurrente anormal de origen desconocido (Esto significa que su fenotipo clínico no cumpliera con los criterios

de clasificación de las IDP según lo establecido por ESID (<https://esid.org/Working-Parties/Registry/Diagnosis-criteria>). Tres de los pacientes seleccionados padecían ICV (F 00670-I-H2; F 00461; F00108) y uno presentaba deficiencia del C3 (F 00837).

WES

Se aisló ADN genómico (ADNg) proveniente de las muestras de sangre periférica de los 4 pacientes mencionados anteriormente, sus padres y hermanos según correspondiera, utilizando el kit de extracción Puregene™, Genra Systems, Minneapolis (MN), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los WES se realizaron ya sea en el *Human Genome Sequencing Center* (HGSC), *Baylor College of Medicine*, Houston, Texas, Estados Unidos de América, EUA (F 00670-I-H2 y F 00461) o en MacroGen, Seúl, Corea (F 00108 y F 00837). Se usó 1 mg de ADN en una librería de Illumina® que fue construida de acuerdo al protocolo de esta marca (http://nextgen.mgh.harvard.edu/attachments/Multiplexing_SamplePrep_Guide_1005361_C.pdf). La secuenciación fue realizada usando la plataforma de Illumina HiSeq 2000®, con un rendimiento de 9.1 Gb. En el caso de las muestras enviadas a macrogen, se usó la plataforma Illumina HiSeq X Ten Sequencing System. La muestra logró un 91% del exoma cubierto con una profundidad mayor a 20X. El análisis de la secuenciación en Illumina fue realizado usando las recomendaciones de HGSC Mercury (<https://www.hgsc.bcm.edu/software/mercury>). Como criterios para la selección de las variantes posiblemente patogénicas en este estudio, se tuvo en cuenta aquellas con una frecuencia <1% en la población, variantes potencialmente deletéreas según proyectos de Genoma Humano (<http://www.internationalgenome.org/>), ExAC (Exome Aggregation Consortium) (<http://exac.broadinstitute.org/>) o ESP (Exome Sequencing Project) (<https://esp.gs.washington.edu/drupal/>), que

tuvieran un patrón de herencia compatible y además, que correspondieran a genes relacionados con el sistema inmune.

PCR convencional

Luego de analizar el WES y seleccionar las variantes en los genes candidatos *TNFRSF9*, *A2M*, *TCF3* y *C3*, se utilizaron cebadores para amplificarlos por medio de reacción en cadena de la polimerasa (Del inglés, *Polymerase chain reaction*, PCR) convencional.

Los cebadores para el exón 3 de *TNFRSF9* fueron Fw_5' GGAGAAACCACCTTTCCTTGG 3' y Rv_3' GGAGCTCGTTAGCCCTGACTAC 5'. Los cebadores para el exón 17 de *A2M* fueron Fw_5' TGGATTGCTTGTCAAATTCAA 3' y Rv_3' CAGCCTAACACATGTACCTCCA 5'. Los cebadores para el exón 11 de *TCF3* (Fw_5' AGCACGAGCGTATGGTAGGAC 3' y Rv_3' AACTGACAACAACCCGCTCTC 5') y finalmente los cebadores para el exón 18 del gen *C3* fueron (Fw_5' GAGATGGGTTTCACCATGTTAG 3' y Rv_3' TGATTCCAGAGAAGACCAGAGATA 5'). Todos los anteriores cebadores fueron diseñados en el presente trabajo por medio de análisis de las regiones codificantes donde se encontraba la mutación. Se flanquearon regiones específicas antes y después de la mutación y se diseñaron teniendo en cuenta que su tamaño fuera entre 18 y 22 pares de bases, que la temperatura de *melting* estuviera entre 52 y 65 °C, que tuviera entre 40 a 60% contenido de Guanina-Citosina y que no causara estructuras secundarias (*hairpins* y dimerizaciones). Todos los productos de PCR fueron secuenciados por Sanger en MacroGen, Seúl, Corea y los resultados fueron analizados utilizando el genoma de referencia hg37, usando BioEdit sequence alignment editor v7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Además, se utilizaron programas bioinformáticos tales como Chromas (versión 2.6)

(<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>) para analizar los datos obtenidos.

Para todas las PCR, los cebadores *forward* y *reverse* tenían una concentración de trabajo de 0,2 μM ; el MgCl_2 se utilizó a 1,5 μM , los dNTPs a 0,2 μM y se usó 2,5 UI *Taq* polimerasa por reacción. Con el ADN extraído previamente se realizó la amplificación con una concentración de trabajo de 50 ng/ μL , utilizando 2 μL de volumen y finalmente el volumen final de cada reacción fue de 50 μL . Las condiciones para cada PCR en los cuatro genes analizados fueron: El paso inicial fue activar la enzima por medio del calor el cual se realizó a 94 °C por 3 minutos, luego se realizó la desnaturalización de las hebras de ADN a 94 °C por 20 segundos, posteriormente el alineamiento para cada uno de los genes, para el cual se ajustó la temperatura y tiempo de acuerdo al tamaño del amplicón, así: Para el gen *TNFRSF9* fue de 59 °C por 18 segundos, para el gen *A2M* fue de 53 °C por 30 segundos, para el gen *TCF3* fue de 63 °C por 30 segundos y para el gen *C3* fue de 58 °C por 25 segundos. Luego se realizó el paso de extensión a 72 °C por 25 segundos. Los anteriores pasos se repitieron 34 veces y finalmente se realizó la elongación final la cual fue a 72 °C por 5 minutos.

Luego de cada amplificación de las regiones de interés en cada gen, se realizaron electroforesis para evidenciar la amplificación, las cuales fueron realizadas en un gel de agarosa al 1% con una duración de 45 minutos a 90 voltios.

Modelamiento de proteínas

Se recolectó información de los dominios y atributos de la proteína *TCF3* reportados en Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) y Protein Data Bank PDB (<https://www.rcsb.org/>). Para predecir los efectos funcionales en la variante estructural p.294_295del de la proteína del gen *TCF3*, se analizó la secuencia mutada con ayuda de programas bioinformáticos iTASSER Protein Structure & Function

Predictions

(<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), el cual es un programa *online*, en el que se ingresan las secuencias de la proteína *wild type* y la secuencia mutada, para luego obtener los resultados de la proteína en 3D que son analizados con el software UCSF Chimera v1.11.2 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). Las secuencias fueron analizadas usando el gráfico de Ramachandran por medio del visualizador SWISS Model PDB.

Prueba del complemento

Evaluación de la vía clásica.

Eritrocitos de carnero al 1% sensibilizados con hemolisina a una concentración 1/3000 se expusieron a diferentes diluciones del suero a evaluar durante 30 minutos a 37°C. La liberación de hemoglobina como producto de la lisis de los eritrocitos mediada por el complemento se evaluó espectrofotométricamente a 415 nm.

Con la Densidad Óptica (DO) del control positivo (son eritrocitos enfrentados al agua, 100% de lisis), se determinó la absorbancia en la cual se lisan el 50% de los eritrocitos del carnero, dividiendo el valor de DO del control positivo entre dos. Utilizando el análisis *point to point* en el programa GraphPad Prism versión 5.0, se enfrentaron los valores de volúmenes de suero del paciente (μL) contra las DO de liberación de hemoglobina, obteniendo así μL de suero necesarios para lisar 50% de los eritrocitos de carnero al 1%. Finalmente, las unidades hemolíticas por mililitro de suero se obtuvieron al dividir 1000 entre los μL de suero necesarios para lisar el 50% de los eritrocitos.

Evaluación de la vía alterna

Se utilizan eritrocitos al igual que en la técnica anterior. A lo largo del tiempo las células utilizadas para esta técnica han sido los eritrocitos de conejo dado a la capacidad que éstas células tienen para unir C3b, factor B y factor H a su membrana, pero no la de unir el

factor I (inactivador de C3b); lo que permite la formación y estabilidad de la C3 convertasa de la vía alterna (C3bBb) llevando a la activación en cascada de las demás proteínas de la vía alterna del complemento. Las unidades hemolíticas por mililitro de suero se obtuvieron como ya se describió para la evaluación de la vía clásica del complemento.

Western Blot

Estos análisis se realizaron en el laboratorio del Dr. Paolo Macor, Department of Life Sciences, Molecular Immunology and Pathology, University of Trieste, Trieste, Italia siguiendo las recomendaciones establecidas por este laboratorio. Brevemente, los sueros fueron analizados en un gradiente PAGE, para luego transferirse a membranas de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA) e incubarse con las diluciones de los anticuerpos anti-complemento respectivos. La detección de las bandas se realizó por quimioluminiscencia.

Otros análisis

Los datos de citometría fueron obtenidos del área asistencial del GIDP (Tabla 5 y 6).

Toda la información de las funciones en los genes de las tablas del exoma para cada paciente, se obtuvo de la base de datos médica NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y de la base de datos GeneCards® (<https://www.genecards.org/>).

Se realizó la medición de la proteína sérica alfa 2 macroglobulina (A2M) al paciente F 00461, por la técnica de nefelometría en el laboratorio DINAMICA IPS.

La cuantificación del Factor I del complemento fue realizada gentilmente con la ayuda de Anete Sevciovic Grumach, en el laboratorio de inmunología de la Faculdade de Medicina do ABC, Brasil.

Resultados

Características clínicas de los pacientes

F 00670-I-H2

Paciente de sexo masculino nacido en 1986 y remitido al servicio de inmunología clínica a los 22 años por presentar desde hacía dos años, varios episodios de neumonía y sinusitis recurrente. No presentaba antecedentes familiares de infecciones recurrentes, autoinmunidad o malignidades hematológicas; tenía una hermana mayor de 25 años que documentaba haber presentado infecciones recurrentes. Entre los antecedentes personales de infecciones recurrentes el paciente relató que tuvo episodios de otitis recurrente de los 8 a los 10 años de vida; además fue sometido a adenoidectomía y drenaje de senos paranasales con tubos de ventilación a la misma edad. Los cuatro episodios de neumonía que tuvo entre los 20 y 22 años fueron manejados con antibióticos intravenosos. Al examen físico se documentaron cicatrices en oído izquierdo, amígdalas hipotróficas, sin lesión en las mucosas. Se le realiza un examen de Ig séricas encontrando valores disminuidos de IgG, IgM e IgA de acuerdo a los parámetros establecidos para la edad y sexo. Se encontró IgG de 550 mg/dL (valores normales según García de Olarte Diana: 968 – 2514 mg/dL), IgA de 31 mg/dL (valores normales son de 116 – 551 mg/dL), IgM se encontró de 33,6 mg/dL (valores normales son de 103 – 397 mg/dL). No se observaron anticuerpos séricos IgG detectables contra rubeola. A los 23 años se le diagnosticó esofagitis péptica distal con erosiones grado A y gastritis eritematosa con infección por *Helicobacter pylori*. Desde los 23 a los 24 presentó sinusitis crónica. A los 25 años se hospitalizó debido a una neumonía con derrame pleural detectando también un granuloma manejado con prednisolona. El paciente sigue en seguimiento por el GIDP en la actualidad.

F 00461

Paciente masculino nacido en 1997 a las 36 semanas de gestación por cesárea. Tercer hijo de padres no consanguíneos. Dentro de los antecedentes familiares refiere una

hermana mayor con amigdalitis a repetición y padres con hipotiroidismo. Consulta por primera vez al servicio de inmunología a los 15 años con cuadro de aproximadamente un año de evolución que inició con tos productiva,

adenopatías izquierdas e infiltrados pulmonares, esplenomegalia y hepatomegalia.

Tabla 1.

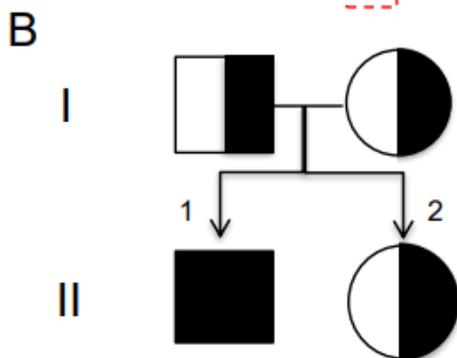
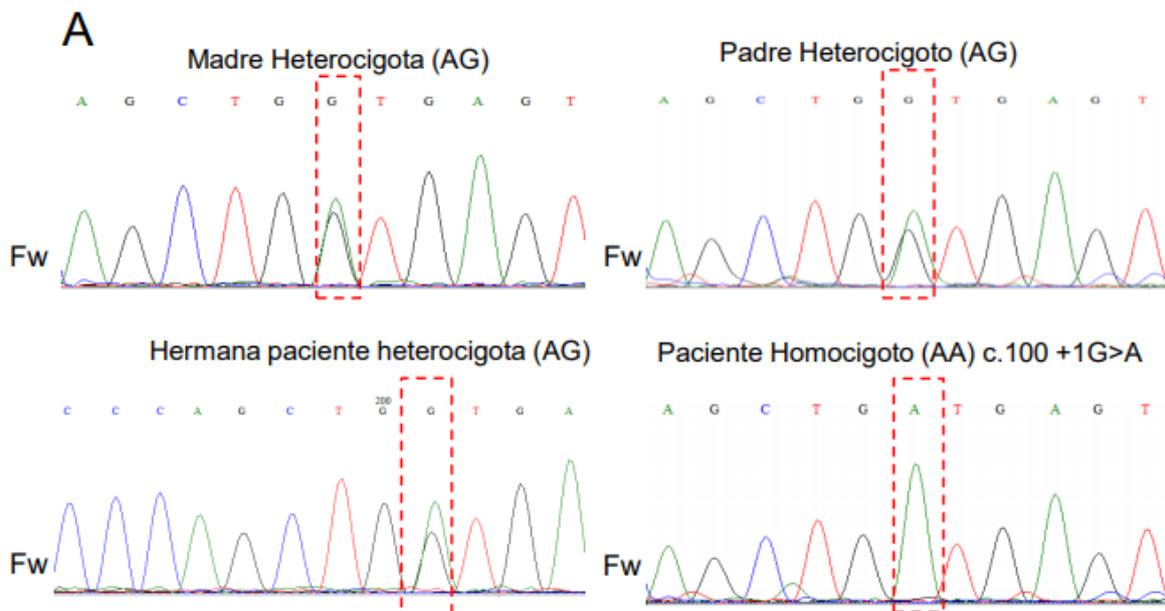
Gen	Función del gen	Enfermedades relacionadas	Variante	Tipo de mutación	Genotipo	Reads*	Frecuencia	Predictor ^b
TNFRSF9	Expansión clonal, supervivencia y desarrollo de los LT.	Inmunodeficiencia.	c.100+1G>A	Splicing	Homocigoto	32/32	0,00029	Deletéreo ⁴ N/A ^{1,2,3}
ATP2B3	Homeostasis intracelular de los flujos de calcio.	Atresia biliar, defectos congénitos del corazón.	c.3052-5C>T	Splicing	Homocigoto	81/81	0,0091	N/A ^{1,2,3,4}
APOO	Apolipoproteína, involucrada en el transporte y metabolismo de lípidos.	Inmunodeficiencia, anomalías vertebrales y cardiovasculares, atresia anal.	c.A43T	Missense	Homocigoto	9/9	0,000581	Deletéreo ^{2,3} Normal ⁴ N/A ¹
MXRA5	Remodelamiento de las proteínas de matriz extracelular.	Inmunodeficiencia, hernia diafrágica congénita.	c.G4067A	Missense	Homocigoto	43/43	0,000484	Benigno ² Normal ⁴ N/A ^{1,3}
POF1B	Relacionado con defectos en la maduración ovárica.	Hernia diafrágica congénita. Defecto en la maduración ovárica.	c.G986A	Missense	Homocigoto	34/34	0,001742	Benigno ² Normal ³ N/A ^{1,4}
MIS18BP1	Requerido para el reclutamiento de la Proteína del centrómero A y segregación cromosómica en la mitosis.	Anomalías congénitas de riñón y tracto urinario.	c.A1846T	Inserción Frameshift	Heterocigoto compuesto	7/13	0,00029	Benigno ² Normal ^{3,4} N/A ¹
		Inmunodeficiencia.	c.471_472	Inserción Frameshift	Heterocigoto compuesto	2/18	9.68E-05	N/A ^{1,2,3,4}
ATN1	Relacionado con la atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana caracterizada por ataxia cerebelosa.	Atresia anal, síndrome de CHARGE, defectos congénitos en el corazón.	c.G1494T	Missense	Heterocigoto compuesto	22/83	0,006196	Benigno ² Normal ⁴ N/A ^{1,3}
		Inmunodeficiencia, enfermedades múltiples en el ojo.	c.G1497T	Missense	Heterocigoto compuesto	12/60	0,000871	Benigno ² Normal ⁴ N/A ^{1,3}
CLCA2	Regula el transporte de cloro en la membrana plasmática.	Inmunodeficiencia, Hernia diafrágica congénita.	c.T1011G	Missense	Heterocigoto compuesto	14/33	0,000871	Benigno ² Normal ^{3,4} N/A ¹
		Síndrome de heterotaxia, inmunodeficiencia.	c.T1411A	Missense	Heterocigoto compuesto	9/17	0,000387	Benigno ² Normal ^{3,4} N/A ¹
HRNR	Involucrado en el desarrollo de las células epidérmicas.	Inmunodeficiencia.	c.G7111A	Missense	Heterocigoto compuesto	17/156	0,000194	Normal ⁴ Patogénico ² N/A ^{1,3}
		Inmunodeficiencia.	c.G6143A	Missense	Heterocigoto compuesto	28/206	0,000484	Normal ⁴ Deletéreo ² N/A ^{1,3}
INTS1	Es un complejo integrador de la ARN polimerasa II que se asocia con el procesamiento del ARN y la regulación en la transcripción.	Inmunodeficiencia	c.C5540T	Missense	Heterocigoto compuesto	26/75	0,000290	Patogénico ² Deletéreo ^{3,4} N/A ¹
		Enfermedad mitocondrial, síndrome de heterotaxia, inmunodeficiencia, osteoporosis	c.C3326T	Missense	Heterocigoto compuesto	12/21	0,001161	Benigno ² Normal ^{3,4} N/A ¹

<i>MUC16</i>	Codifica para una proteína miembro de la familia de las mucinas. Estas tienen un rol importante en la formación de la barrera mucosa y en la protección en las células epiteliales contra patógenos.	Enfermedad alveolar capilar, falla medular, alteraciones en el desarrollo.	c.G31412A	Missense	Heterocigoto compuesto	25/59	0,005324	Benigno ² N/A ^{1,3,4}
		Microcefalia autosómica dominante, retinopatía central, alteraciones en el desarrollo, anomalías congénitas en el riñón	c.G5672A	Missense	Heterocigoto compuesto	29/54	0,005130	Patogénico ² N/A ^{1,3,4}
<i>SERHL2</i>	Codifica para una hidrolasa de serina. Está relacionado con hipertrofia muscular.	Inmunodeficiencia	c.G893A	Missense	Heterocigoto compuesto	43/116	0,000484	Benigno ² Normal ^{3,4} N/A ¹
		Enfermedad alveolar capilar, desorden bipolar, alteraciones en el desarrollo, malformación del cerebro, inmunodeficiencia, macrocefalia.	c.T926C	Missense	Heterocigoto compuesto	22/82	0,003097	Benigno ² Normal ^{3,4} N/A ¹
<i>TDRD5</i>	Hace parte de una familia conservada de proteínas que están involucradas en el desarrollo de las células germinales. Está involucrado en el procesamiento del ARN en la espermatogénesis (Estudios en modelo murino)	Enfermedad alveolar capilar, falla medular, inmunodeficiencia, osteoporosis, retinopatía central, defectos congénitos en el corazón.	c.A863G	Missense	Heterocigoto compuesto	73/157	0,003194	Benigno ² Normal ^{3,4} N/A ¹
		Atresia anal, retinopatía central, defectos congénitos en el corazón, anomalías craneofaciales, inmunodeficiencia, anomalías congénitas en el riñón.	c.C1769T	Missense	Heterocigoto compuesto	16/30	0,004937	Deletéreo ^{2,3,4} N/A ¹
<i>ZNF398</i>	Este gen actúa como activador transcripcional.	Inmunodeficiencia, desórdenes en el movimiento.	c.G419A	Missense	Heterocigoto compuesto	16/33	0,000580	Benigno ² Normal ^{3,4} N/A ¹
		Inmunodeficiencia.	c.C1286T	Missense	Heterocigoto compuesto	25/60	0,000193	Benigno ² N/A ¹ Normal ^{3,4}
<i>KRT10</i>	Codifica para la superfamilia de proteínas de filamentos intermedios y es miembro de la familia de las citoqueratinas tipo I. Hacen parte del citoesqueleto celular. Mutaciones en este gen se asocian con Hiperqueratosis	Inmunodeficiencia.	c.T1495C	Missense	Heterocigoto simple	3/8	0,000193	Benigno ² Normal ^{3,4} N/A ¹
<i>CHST13</i>	Está presente en el cartilago, y se distribuye en la superficie de muchas células y la matriz extracelular.	Inmunodeficiencia.	c.C981A	Missense	Heterocigoto simple	27/55	9,68E-05	Patogénico ² Deletéreo ⁴ N/A ^{1,3}
<i>LRRRC24</i>	Es miembro de la superfamilia de proteínas ricas en leucina (LRR). Su función es desconocida.	Inmunodeficiencia.	c.G1280A	Missense	Heterocigoto simple	18/36	0,000193	Patogénico ² Normal ^{3,4} N/A ¹

Tabla 1. Especificaciones de los genes priorizados en el WES del paciente F 00670-IH2. *Número de reads con la variante/reads totales. ^a Los predictores utilizados: SIFT¹, Polyphen 2², LRT³, Mut Taster⁴. N/A: No hay información en predictores. Missense: Son mutaciones con cambio de sentido. Inserción Frameshift: Mutación que indica cambio en el marco de lectura. Las palabras que se encuentran en rojo son los genes que se incluyeron en el estudio para análisis posteriores.

Estuvo hospitalizado 41 días con cuadro febril. Le diagnosticaron bronconeumonía por *Haemophilus influenzae*. Al realizar las mediciones de IgG sérica se obtuvo un valor de 615.6 mg/dl (valores normales: 968 – 2514 mg/dL; García de OG, Acta Médica Colombiana 1984). Se evidenció, por citometría de flujo, disminución en los linfocitos B de memoria y expansión de células CD21+^{low} en sangre periférica. El paciente se diagnostica con ICV y neumatía crónica. Se inicia terapia de reemplazo con gamaglobulina humana intravenosa. A los 17 años tuvo un cuadro febril de tres días de evolución atribuido a la reactivación de una

sinusitis crónica, recibiendo amoxicilina 500 mg cada 8 horas por una semana con buena respuesta. A los 18 años, se documenta una conjuntivitis alérgica. A esta edad, el paciente refirió que presentaba epistaxis fácilmente, con mejoría luego de tratamiento con esteroide nasal. También presentó amigdalitis que se trató con azitromicina, con buena respuesta. A los 20 años el paciente presentó otitis y laringitis por 15 días que fueron tratadas con amoxicilina por 7 días. También documentó gastritis crónica folicular e infección por *H. pylori*, diagnosticado por endoscopia.



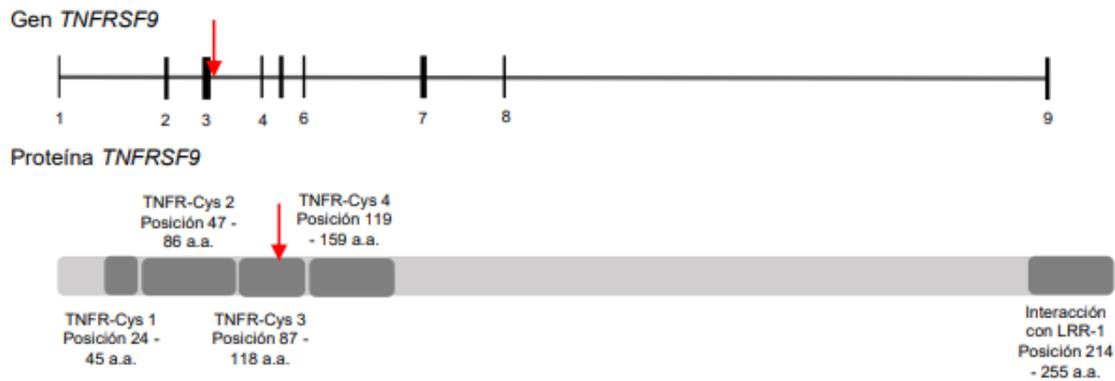
C

Figura 1. Confirmación del defecto genético en *TNFRSF9* en el paciente F 00670-I-H2. A. Secuenciación por Sanger realizada en el cual se confirma la mutación homocigota en *TNFRSF9* en el paciente y el patrón heterocigoto en sus padres y hermana. B. Pedigree de la familia del paciente. C. Representación esquemática del gen *TNFRSF9* (arriba), con 9 exones, localización 1p36.23 y la proteína que codifica (abajo). Las flechas rojas representan la ubicación de la mutación y el sitio estimado donde se afecta la proteína. Fw: *Forward*, a.a.: Aminoácidos.

F 00108

Paciente hombre nacido en 1992, parto gemelar por cesárea. No se refieren antecedentes familiares infecciosos de importancia ni inmunodeficiencia, autoinmunidad y neoplasias. Sin embargo, su abuela materna presenta diabetes mellitus tipo 2. El paciente inicia desde los 11 años con cuadro clínico de trombocitopenia. Un año y medio después (12 años) se le diagnostica hepatitis y anemia hemolítica autoinmune, manejado con prednisolona durante un año, seguido de azatioprina y ciclosporina también por un año, que hay que suspender luego de 6 meses porque el paciente comienza con episodios de diarrea la cual requiere hospitalización. En esta época estuvo hospitalizado por enfermedad diarrea crónica, con más de cuatro meses de evolución. Al momento de la hospitalización, padece rinitis alérgica la cual se la maneja con loratadina. El paciente tiene retraso pondoestatural. El paciente refiere haber sufrido varicela durante se mismo año.

Es remitido al servicio de inmunología por reumatología a los 14 años. Se le realiza un examen de IgG sérica encontrándose disminuida (647 mg/dL; valores normales: 968 – 2514 mg/dL; García de OG, Acta Médica Colombiana 1984). Se evidenció, por citometría de flujo, disminución en los

linfocitos B de memoria y expansión de células CD21^{low} en sangre periférica. Tiene esquema de vacunación completa, pero sin registro de vacuna para la Hepatitis B y anticuerpos de tipo IgG protectores para varicela zóster. El paciente se diagnostica con ICV, intolerancia al gluten, diarrea crónica, tiroiditis, desequilibrio hidroeléctrico secundario a desarrollo pondoestatural. A esta misma edad cursa con desnutrición crónica secundaria a problema gastrointestinal y endocrino. Se inicia terapia de reemplazo con gamaglobulina humana intravenosa. Se le ordena complemento nutricional (Nutren®), suministro de somatropina y gluconato de potasio. Se requiere reemplazo de gamaglobulina humana mensualmente. Consulta nuevamente al servicio de salud a la edad de los 15 años (3 meses después de la anterior hospitalización) por presentar tos productiva de dos semanas de evolución, fiebre, vómito, dolor torácico; se le diagnostica neumonía y se inicia tratamiento con ceftriaxona. Dos meses después, nuevamente consulta por episodios de diarrea con adenopatías cervicales y adicionalmente hipotiroidismo. A los 16 años es hospitalizado nuevamente por 15 días por malestar general, diarrea, hipokalemia y adenopatía cervical. A los 17

años, presenta diarrea crónica de difícil manejo, enfermedad hepática autoinmune.

Tabla 2.

Gen	Función del gen	Enfermedades relacionadas	Variante	Tipo de mutación	Genotipo	Reads*	Frecuencia	Predictor ⁶
A2M	Inhibidor de proteasas (tripsina, trombina y colagenasa) y participa en cascadas inflamatorias como transportador de citoquinas.	Inmunodeficiencia.	c.2027delA	Delección <i>Frameshift</i>	Heterocigoto simple	50/88	9.68E-05	N/A ^{1,2,3,4}
C8A	Componente del sistema del complemento. Codifica para la subunidad alfa de C8, el cual participa en el complejo de ataque a la membrana (MAC)	Inmunodeficiencia.	c.C92A	<i>Missense</i>	Heterocigoto. (Asociado a genes IDP)	64/124	0,000193	Patogénico ² Normal ^{3,4} N/A ¹
		Inmunodeficiencia.	c.G1396T	<i>Nonsense</i>	Heterocigoto. (Asociado a genes IDP)	66/131	0,000193	N/A ^{1,2} Deletéreo ³ Anormal ⁴
DOCK11	Está relacionado en la vía en la actividad reguladora de CDC42 y la respuesta elevando el Ca ²⁺ citosólico en las plaquetas. Se expresa principalmente en células grasas y nódulos linfoides	Inmunodeficiencia.	c.3180+4A>G	<i>Splicing</i>	Homocigoto	18/18	0,000193	N/A ^{1,2,3,4}
ZNF598	Participa en proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Se expresa principalmente en bazo y testículos.	Dilatación aórtica, síndrome de Charge, defecto de migración neuronal, enfermedad de Parkinson, inmunodeficiencia, malformación del septo urorectal.	c.A40C	<i>Missense</i>	Homocigoto	6/6	0,004743	N/A ^{1,2} Normal ³ Patogénico ⁴
ARR3	Participa como receptor en la señalización de la proteína G heterotrimérica. Interactúa con la gamma-tubulina para regular funciones en los centrómeros.	Inmunodeficiencia.	c.A1087G	<i>Missense</i>	Homocigoto	20/20	0,000193	N/A ¹ Benigno ² Normal ^{3,4}
AHNAK2	Codifica nucleoproteínas. Participa en la señalización del calcio asociado a los canales de este.	Síndrome de heterotaxia, inmunodeficiencia, enfermedad mitocondrial, enfermedades múltiples en el ojo.	c.G10552A	<i>Missense</i>	Heterocigoto compuesto	22/51	0,002129	N/A ^{1,3} Benigno ² Normal ⁴
		Osteoporosis, inmunodeficiencia, alteraciones en el desarrollo, distrofia muscular.	c.C4517T	<i>Missense</i>	Heterocigoto compuesto	13/78	0,002323	N/A ^{1,3} Benigno ² Normal ⁴

FAM21B	Está relacionado en las vías para la endocitosis, actúa en la superficie de los endosomas. Se expresa principalmente en corazón y médula ósea.	Hernia diafragmática congénita, síndrome de heterotaxia, inmunodeficiencia, osteoporosis, enfermedades múltiples en el ojo.	c.G695A	Missense	Homocigoto	28/29	0,001452	N/A ¹ Benigno ² Normal ^{3,4}
		Hernia diafragmática congénita, síndrome de heterotaxia, inmunodeficiencia, enfermedad mitocondrial, osteoporosis, cáncer gástrico.	c.G695A	Missense	Heterocigoto compuesto	35/121	0,003484	N/A ¹ Benigno ² Normal ^{3,4}
IRX4	Está relacionado con el desarrollo del corazón y la diferenciación cardíaca ventricular. Expresión se da principalmente en próstata y piel.	Miopia aguda, desórdenes genéticos, melanomas, inmunodeficiencia, enfermedad mitocondrial, defecto de migración neuronal.	c.1222_1224del	Delección Non-frameshift	Heterocigoto compuesto	5/78	0,007066	N/A ^{1,2,3,4}
		Inmunodeficiencia	c.C41G	Missense	Heterocigoto compuesto	74/174	0,000193	N/A ¹ Deletéreo ^{2,3,4}
MUC4	Mucina 4. Asociada a superficie celular. Es el mayor constituyente de la mucosa; participa en la protección de las células epiteliales, en su diferenciación y renovación celular.	Hernia diafragmática congénita, hiperqueratosis, inmunodeficiencia, osteoporosis, anomalías en el riñón y en el tracto urinario, retinopatía central.	c.A9821C	Missense	Homocigoto	16/16	0,003581	N/A ^{1,3} Benigno ² Normal ⁴
		Inmunodeficiencia, malformaciones en el cerebro, enfermedad múltiple en el ojo, síndrome de heterotaxia.	c.C9233A	Missense	Heterocigoto compuesto	5/21	0,003194	N/A ^{1,3} Benigno ² Normal ⁴
		Hernia diafragmática congénita, inmunodeficiencia, retraso mental, hipogonitismo, retardo sicomotor, enfermedad mitocondrial, defectos congénitos del corazón, obesidad.	c.A7117G	Missense	Heterocigoto compuesto	8/72	0,002807	N/A ^{1,3} Benigno ² Normal ⁴
NCAPD3	Complejo de condensina I y II. Participa en la segregación mitótica y el mantenimiento estructural de los cromosomas.	Retinopatía central, fibromatosis gingival hereditaria, inmunodeficiencia, enfermedad mitocondrial, enfermedad de Parkinson, osteoporosis.	c.G1981T	Missense	Heterocigoto compuesto	26/62	0,003195	N/A ¹ Deletéreo ^{2,3,4}
		Fallo agudo del hígado, retraso mental, síndrome de heterotaxia, inmunodeficiencia, alteraciones en el desarrollo.	c.G1412C	Missense	Heterocigoto compuesto	22/40	0,005614	N/A ¹ Deletéreo ^{2,3,4}

<i>PKD1</i>	Policistina I. Regula la permeabilidad en la membrana plasmática con los canales de calcio, además de participar en la homeostasis intracelular. Participa en el desarrollo de los túbulo renales	Síndrome de heterotaxia, inmunodeficiencia.	c.G8530A	Missense	Heterocigoto compuesto	53/117	0,000290	N/A ¹ Deletéreo ^{2,3,4} Patogénico ²
		Hernia diafragmática congénita, inmunodeficiencia, tartamudeo.	c.T8087G	Missense	Heterocigoto compuesto	15/33	0,000580	N/A ¹ Benigno ² Normal ^{3,4}
<i>PPIAL4F</i>	Está implicado en la isomertización de la prolina.	Características dismórficas cognitivas, inmunodeficiencia, enfermedad de Parkinson.	c.A27C	Missense	Heterocigoto compuesto	3/6	0,001646	N/A ^{1,2,3,4}
		Inmunodeficiencia, enfermedad de Parkinson, síndrome de megavejiga - microcolon-hipoperistalsis intestinal	c.A34G	Missense	Heterocigoto compuesto	3/6	0,000484	N/A ^{1,2,3,4}
<i>SPATA31 E1</i>	Su expresión se restringe a testículos. Tiene importancia en la espermatogénesis. Se asocia con enfermedades de mala reproducción.	Inmunodeficiencia, síndrome de Moebius	c.C580T	Missense	Heterocigoto compuesto	43/89	0,000387	N/A ^{1,3} Benigno ² Normal ⁴
		Atresia biliar, desorden bipolar, defectos congénitos del corazón, inmunodeficiencia	c.A2887G	Missense	Heterocigoto compuesto	83/163	0,001065	N/A ¹ Benigno ² Normal ^{3,4}
<i>MICALCL</i>	Coopera en la vía de MAPK1/ERK2 en una transducción intracelular en el desarrollo morfogénico en las espermatídes de los espermatozoides.	Inmunodeficiencia	c.1385_1411 del	Delección Non-frameshift	Heterocigoto simple	3/17	9,68E-05	N/A ^{1,2,3,4}
<i>INO80</i>	Codifica para una subunidad en el complejo de remodelamiento de la cromatina. Su expresión principalmente se da en médula ósea y testículos.	Inmunodeficiencia	c.G1282A	Missense	Heterocigoto simple	22/44	9,68E-05	N/A ¹ Benigno ² Deletéreo ^{3,4}
<i>SPATA33</i>	Codifica proteínas implicadas en la espermatogénesis.	Inmunodeficiencia	c.G19A	Missense	Heterocigoto simple	16/33	9,68E-05	N/A ^{1,3} Benigno ² Normal ⁴
<i>PKDCC</i>	Tiene actividad transferasa y tirosin-quinasa, la cual media la fosforilación de proteínas secretoras y endógenas.	Inmunodeficiencia	c.C308G	Missense	Heterocigoto simple	3/8	9,68E-05	N/A ^{1,3} Benigno ² Normal ⁴
<i>OR2A2</i>	Actúa en mucosa olfatoria, iniciando respuestas neuronales tan pronto como se generan los olores.	Inmunodeficiencia	c.C259A	Missense	Heterocigoto simple	7/32	9,68E-05	N/A ^{1,3} Benigno ² Normal ⁴
<i>GSAP</i>	Relacionado con interacciones en los sustratos producidos por la enfermedad de Alzheimer.	Inmunodeficiencia	c.G1528A	Missense	Heterocigoto simple	7/15	9,68E-05	N/A ¹ Benigno ² Normal ^{3,4}

Tabla 2. Especificaciones del gen de selección en el WES del paciente F 00461. *Número de reads con la variante/reads totales. ^aLos predictores utilizados: SIFT¹, Polyphen 2², LRT³, Mut Tatser⁴. N/A: No hay información en predictores. Missense: Mutaciones con cambio de sentido. Nonsense: Mutaciones sin sentido. Delección Non-frameshift: Mutación que indican que no hubo cambio de lectura. Delección Frameshift: Mutación que indica cambio en el marco de lectura. Las palabras que se encuentran en rojo son los genes que se incluyeron en el estudio para análisis posteriores.

Se le ordena prednisolona, bicarbonato de calcio, testosterona, omeprazol, ácido fólico, levotiroxina, carbonato de calcio, ensure, mineralin, espironolactona y calcitriol. Nuevamente a esta edad, ingreso a la UCI por trastorno hidroelectrolítico, presentando enfermedad diarreaica aguda, hipokalemia, descompensación por hipogammaglobulinemia por interrupción de la gamaglobulina intravenosa, además de resequedad en la piel. Nuevamente ingresa siete meses después por enfermedad celiaca, diarrea crónica, acompañado de poliuria, polidipsia y dolor abdominal. Continúa con acidosis metabólica. A los 18 años, además de los diagnósticos anteriores se diagnostica con trastorno hidroelectrolítico crónico, hiperparatiroidismo y acidosis tubular renal. Ingresa nuevamente por diarrea crónica y rinofaringitis. A los 19 años tiene infecciones en la piel y a los 20 años ingresa por infecciones gripales a repetición, con fiebre, no requiere hospitalización. A los 23 años se requiere hospitalización por neumonía y descompensación de electrolitos. Tenía verrugas vulgares en manos desde hace más de 3 meses. De los 24 años hasta la actualidad no refiere hospitalizaciones.

F 00837

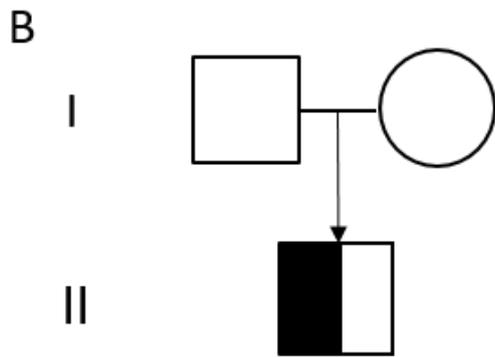
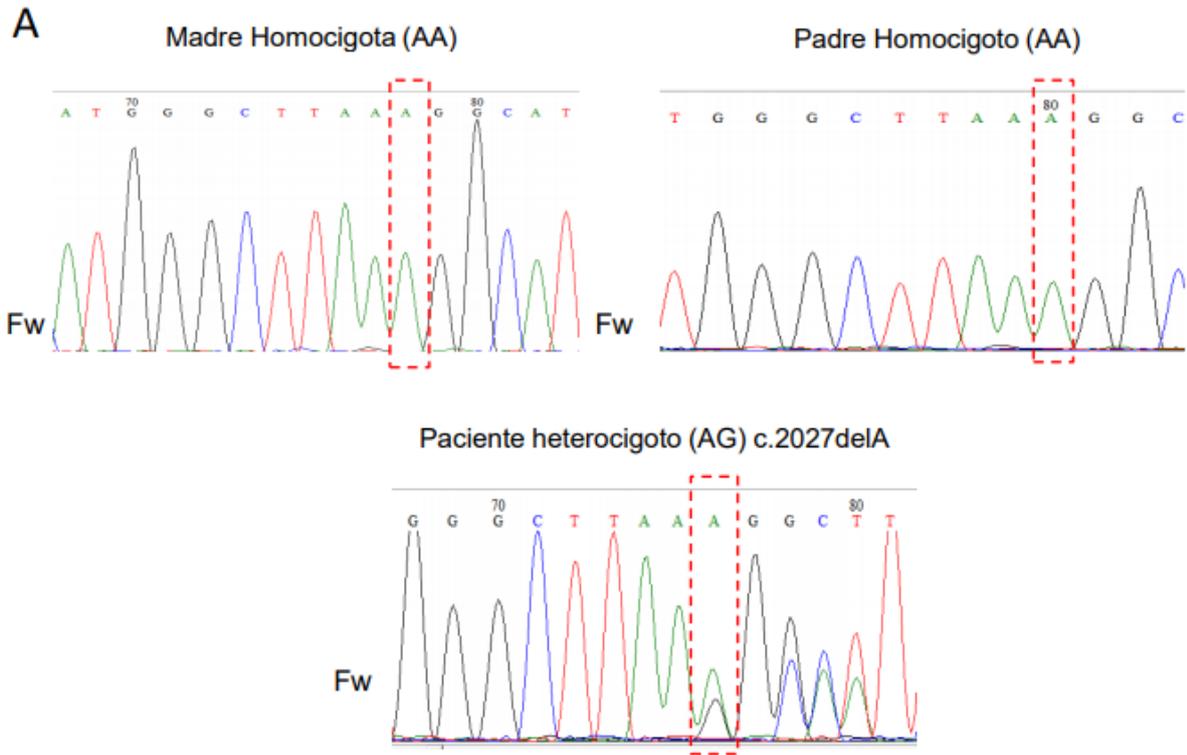
Paciente de sexo masculino nacido en 2013. Dentro de sus antecedentes familiares se encuentra que los padres son primos hermanos, por línea paterna. El bisabuelo materno fue asmático, y falleció por cardiopatía y la abuela materna sufre de hipotiroidismo. Dentro de sus antecedentes personales se encuentra que es producto de un primer embarazo sin ninguna complicación, parto a las 40 semanas + 5 días, vaginal y eutósico, nació con meconio grado 2, anoxia perineal. Debido a esto, tuvo su primera hospitalización por 7 días, presentando además ictericia e hipoglicemia.

Sin lactancia materna sustituido por NAN3. Cuando tenía 3 meses de vida tuvo bronquiolitis sin hospitalización. A los 4 meses se hospitalizó por segunda vez, por 4 días debido a fiebre alta, encontrándose *Staphylococcus hominis* en los hemocultivos. Se manejó con antibióticos. A los 9 meses presentó el segundo episodio de bronquiolitis, con tratamiento con Montelukast por 30 días, reemplazado por Becort 50, cada 12 horas por alteración del sueño. También tuvo tratamiento con salbutamol debido a una crisis de tos. A los 11 meses fue hospitalizado por tercera vez por 4 días, debido a gripa, disminución del apetito y fiebre. Se encontró *Streptococcus pneumoniae* en sangre que se manejó con cefotaxime y ceftriaxona. A los 13 meses el paciente tuvo vómito, fiebre y a la semana presentó exantema por lo cual hospitalizan 3 días (cuarta hospitalización). Durante esa hospitalización se remite al servicio de inmunología que encuentra C3 disminuido (11 mg/dl; valores normales reportados por el laboratorio: 90-180 mg/dl) con niveles de C4 normales en suero. Debido a esto, se le realizó de CH50 y AH50 observándose una capacidad hemolítica ausente del complemento sérico. Ambos padres presentan valores de C3 sérico disminuido con C4 normal. A los dos años, el paciente refiere episodios gripales, enfermedad diarreica aguda, vómito con broncoconstricción. Posteriormente presentó alergia cutánea al parecer al contacto con plantas, manejado con cetirizina e hidrocortisona. Tres meses después nuevamente consulta por episodio gripal, con rinorrea, fiebre. A los 3 años reportan que durante ese año presentó 4 infecciones virales y estuvo hospitalizado. También a los 3 años se le realiza hemocultivo y resulta positivo para *Streptococcus viridans* multisensible. Se le realiza una biopsia renal a los 4 años, diagnosticando una glomerulonefritis

membranoproliferativa mediada por complejos inmunes. Se le realizan ANAs y resultan negativos. Finalmente, el paciente se le diagnostica Deficiencia de la fracción C3 del complemento.

Cada paciente que fue analizado, presentaba diferentes fenotipos clínicos, sin embargo, tres de los cuatro pacientes analizados (F 00670-I-H2, F 00461 y F 00108) presentaron en común que tienen ICV, al evidenciar que todos tienen disminución en las inmunoglobulinas.

Subpoblaciones de linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB)



C

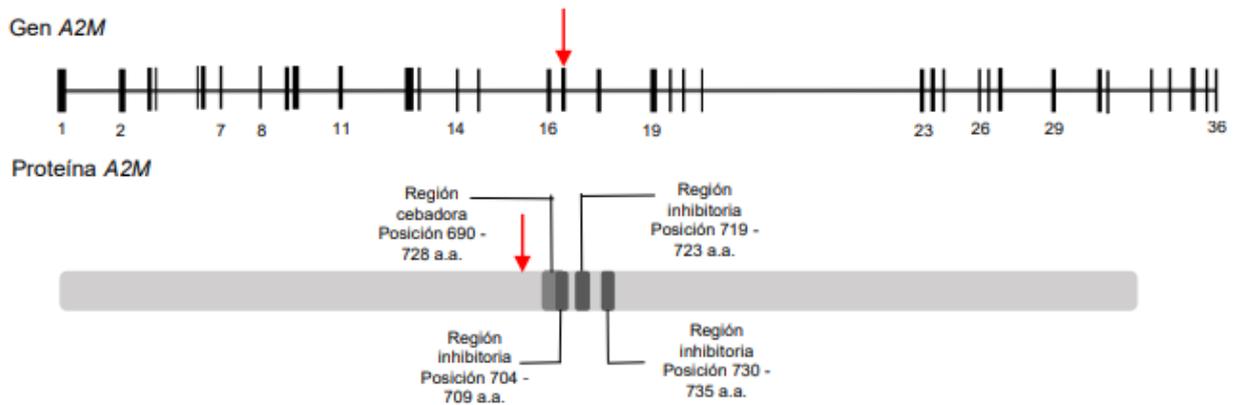


Figura 2. Confirmación del defecto genético en *A2M* en el paciente F 00461. A. Secuenciación por Sanger realizada en el cual se confirma la mutación heterocigota en *A2M* en el paciente y el patrón homocigoto en sus padres. B. Pedigree de la familia del paciente. C. Representación esquemática del gen *A2M* (arriba), con 36 exones, localización 12p13.31 y la proteína que codifica (abajo). Las flechas rojas representan la ubicación de la mutación y el sitio estimado donde se afecta la proteína. Fw: *Forward*, a.a.: Aminoácidos.

Los episodios recurrentes de infecciones en el paciente F 00670-I-H2, generaban sospechas acerca de que algún componente inmunológico estaba afectado. Efectivamente cuando se analizaron sus resultados de las subpoblaciones de linfocitos T y B, se puede evidenciar que tiene una leucopenia a expensas de los linfocitos T ayudadores de memoria central (CD4+CCR7+CD45RA-), de los linfocitos T citotóxicos vírgenes (CD8+CCR7+CD45RA+) y de los linfocitos T citotóxicos de memoria central (CD8+CCR7+CD45RA-), todos disminuidos en valores absolutos y relativos, mientras que los linfocitos T de memoria efectora (CD4+CCR7-CD45RA-) se encuentran aumentados en valores absolutos y relativos. Esto indica que el paciente tiene una respuesta aumentada en los linfocitos T CD4+ (ayudadores) de memoria efectora, pero no en los T CD4+ (ayudadores) de memoria central, en los linfocitos T CD8+ (citotóxicos) vírgenes al igual que en los LT CD8+ de memoria central, por lo que no tiene una buena respuesta contra las infecciones persistentes y una aumentada respuesta efectora contra las infecciones. Las subpoblaciones de los linfocitos B también se encuentran alterados, los linfocitos B de memoria (CD27+), los linfocitos B de memoria con cambio de isotipo

(IgD-/CD27+) y los plasmoblastos circulantes (IgD-/CD38++) se encuentran muy disminuidos, los linfocitos B vírgenes (IgD+/CD27-) y los linfocitos B transicionales (CD24+/CD38++) están aumentados en valores absolutos y relativos. Estas alteraciones en las subpoblaciones explican el daño en el sistema inmune que tiene el paciente.

El paciente F 00461 también presentaba infecciones a repetición, por lo que se le realizó un estudio de las subpoblaciones de linfocitos T y B, encontrando que en los linfocitos T ayudadores vírgenes (CD4+CCR7+CD45RA+), los linfocitos T ayudadores de memoria central (CD4+CCR7+CD45RA-), los linfocitos T citotóxicos vírgenes (CD8+CCR7+CD45RA+) y los linfocitos T citotóxicos de memoria central (CD8+CCR7+CD45RA-) estaban disminuidos, mientras que los linfocitos T de memoria efectora (CD4+CCR7-CD45RA-) se encuentran muy aumentados. Esto indica que el paciente tiene una deficiente respuesta en los linfocitos TCD4 (ayudadores) y los TCD8 (citotóxicos), tanto los vírgenes como los de memoria, por lo que no tiene una buena respuesta contra las infecciones persistentes y una aumentada respuesta efectora contra

las infecciones. Las subpoblaciones de los linfocitos B presentan diversas alteraciones. Los linfocitos B se encuentran muy disminuidos, tanto en valores absolutos como relativos, al igual que los linfocitos B de memoria (CD27+), los linfocitos B vírgenes (IgD+/CD27-), los linfocitos B IgM de memoria (IgD+/CD27+) y los linfocitos B de memoria con cambio de isotipo (IgD-/CD27+). Debido a esta disminución, los valores en la concentración de las inmunoglobulinas

producidas por los linfocitos B, también disminuyen y esto apoya los resultados obtenidos en la medición de estas.

Solamente fue posible hacer las mediciones de las subpoblaciones de los linfocitos T y B para los anteriores dos pacientes, por lo cual, los pacientes F 00108 y F 00837 no tienen estos resultados.

Tabla 3.

Gen	Función del gen	Enfermedades relacionadas	Variante	Tipo de mutación	Genotipo	Reads ^a	Frecuencia	Predictor ^b
CHD7	Pertenece a la familia de las helicasas. Se expresa principalmente en cerebro, médula ósea y nódulos linfoides.	Síndrome de CHARGE, miopatías heredadas, cáncer pancreático, escoliosis idiopática familiar.	c.T307A	Missense	Heterocigoto simple	8/14	0.0052	Tolerante ¹ Benigno ² Normal ³ Deletéreo ⁴
SPINK5	Codifica para un multidominio de inhibidores de serin proteasas. Tiene un rol importante en la morfogénesis de la piel y el cabello, además de tener actividad antimicrobiana y antiinflamatoria en las mucosas.	Síndrome de Netherton, alergias, rinosinusitis, dermatitis atópica, asma.	c.C802T	Missense	Heterocigoto simple	7/17	0.0066	Tolerante ¹ Deletéreo ² Normal ^{3,4}
			c.A2915G	Missense	Heterocigoto simple	6/13	0.01	Tolerante ¹ Benigno ² Normal ^{3,4}
TCF3	Codifica para un miembro de la familia de la proteína E clase I. Tiene un rol importante en la linfogénesis y esta proteína es requerida para el desarrollo de los linfocitos T y B.	Leucemia linfoblástica de linfocitos B, leucemia aguda, carcinoma cervical, carcinoma nasofaríngeo, linfoma tipo Hodgkin, cáncer pancreático, agammaglobulinemia.	c.882_884del	Delección Non-frameshift	Heterocigoto simple	5/12	0.001	N/A ^{1,2,3,4}
UNC13D	Relacionado con la maduración vesicular durante la exocitosis y está involucrado en la regulación de la secreción de gránulos citolíticos.	Linfocitocitosis hemofagocítica Tipo 3, inmunodeficiencia primaria, síndrome proliferativo autoinmune, artritis idiopática.	c.G547A	Missense	Heterocigoto simple	8/12	0.0008	Tolerante ¹ Patogénico ² Deletéreo ^{3,4}
NCF4	Hace parte del sistema fagocítico NADPH oxidasa, un importante componente en la defensa del hospedero. Es expresado primordialmente en células de linaje mieloide.	Cáncer colorectal, enfermedad granulomatosa crónica, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn.	c.C172T	Missense	Heterocigoto simple	13/22	0.0012	Deletéreo ^{1,2,4} Normal ³

IL12RB1	Es requerido para la actividad de la IL12.	Susceptibilidad incrementada a infecciones por micobacterias y salmonella, enteropatía severa, hipogammaglobulinemia, alergias, cáncer gástrico, neurofibromatosis, susceptibilidad mendeliana a micobacterias.	c.C552T	Missense	Heterocigoto simple	9/15	0,0004	N/A ^{1,2,3,4}
---------	--	---	---------	----------	---------------------	------	--------	------------------------

Tabla 3. Especificaciones del gen de selección en el WES del paciente F 00108. ^aNúmero de reads con la variante/reads totales. ^bLos predictores utilizados: SIFT¹, Polyphen², LRT³, Mut Tasser⁴. N/A: No hay información en predictores. Missense: Mutaciones con cambio de sentido. Delección Non-frameshift: Mutación que indican que no hubo cambio en el marco de lectura. Las palabras que se encuentran en rojo son los genes que se incluyeron en el estudio para análisis posteriores.

Análisis del exoma (WES)

F 00670-I-H2

Al paciente se le realizó un WES en el cual se priorizaron para el análisis, variantes en genes relacionados con el sistema inmune. Algunos de estos genes, además de estar relacionados con inmunodeficiencias, también tienen relación con otras enfermedades como atresia biliar, defectos en la maduración ovárica, defectos congénitos del corazón, síndrome de CHARGE, entre otros (Tabla 1). El principal gen candidato a IDP fue el gen *TNFRSF9*, en el cual el paciente tiene una variante en el *splicing* siendo esta una mutación homocigota deletérea; su frecuencia en la población según 1000 genomas es de tan sólo 0,00029, lo cual indica su disminuida prevalencia en la población. El análisis de los *reads*, indica que en 32 de los *reads* reportados por el equipo, los 32 tenían esta variante. Para observar su patrón de herencia, se hizo necesario también analizar sus padres y hermana donde se encuentra la mutación, pero de forma heterocigota (Fig.1 A). La mutación se buscó en diferentes bases de datos (Ensembl y ExAC) encontrando que ya estaba previamente reportada.

Luego de analizar el WES, se hizo la verificación de la mutación encontrada en el exoma, por medio de secuenciación por Sanger, el cual dio como resultado que el paciente tiene una mutación homocigota (c.100 +1G>A), esto quiere decir que sus dos alelos heredados, se encuentran afectados y

sus padres poseen la mutación, pero esta de manera heterocigota recesiva, por lo cual sólo le heredaron cada uno, el alelo afectado a este paciente. La hermana heredó el alelo, pero también de manera heterocigota (Fig. 1 A y B).

El gráfico C de la figura 1, muestra la ubicación de la mutación en el gen *TNFRSF9*, el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 1 (1p36.23). La mutación se ubica al finalizar el exón 3, en un sitio donador de *splicing*. Se realizó una representación gráfica en la cual se muestra el posible sitio de afectación inicial de la proteína, en el dominio TNFR-Cys 3 entre la posición 87 - 118 de los aminoácidos (a.a), más exactamente en la posición del aminoácido 100.

F 00461

Al paciente se le realizó un WES en el cual se le identificó variantes en distintos genes con enfermedades relacionadas con inmunodeficiencias, defectos neuronales, enfermedad de Parkinson, osteoporosis, síndrome de heterotaxia, entre otros (Tabla 2). El principal gen candidato a IDP fue el gen *A2M*, en el cual el paciente tiene una variante heterocigota, siendo esta una mutación *Frameshift* tipo delección; indicando que la mutación genera un cambio en el marco de lectura del ADN. Su frecuencia en la población según 1000 genomas es de 9.68E-05, aún menor que la encontrada en el anterior paciente. El análisis de los *reads*, indica que de los 88 *reads* secuenciados, 50 tenían esta

variante sugiriendo un patrón heterocigoto. Para precisar su patrón de herencia, se hizo necesario también analizar sus padres en los cuales no se observó la mutación (Fig.2 A). La

mutación se buscó en diferentes bases de datos (Ensembl y ExAC) encontrando que aún no ha sido reportada.

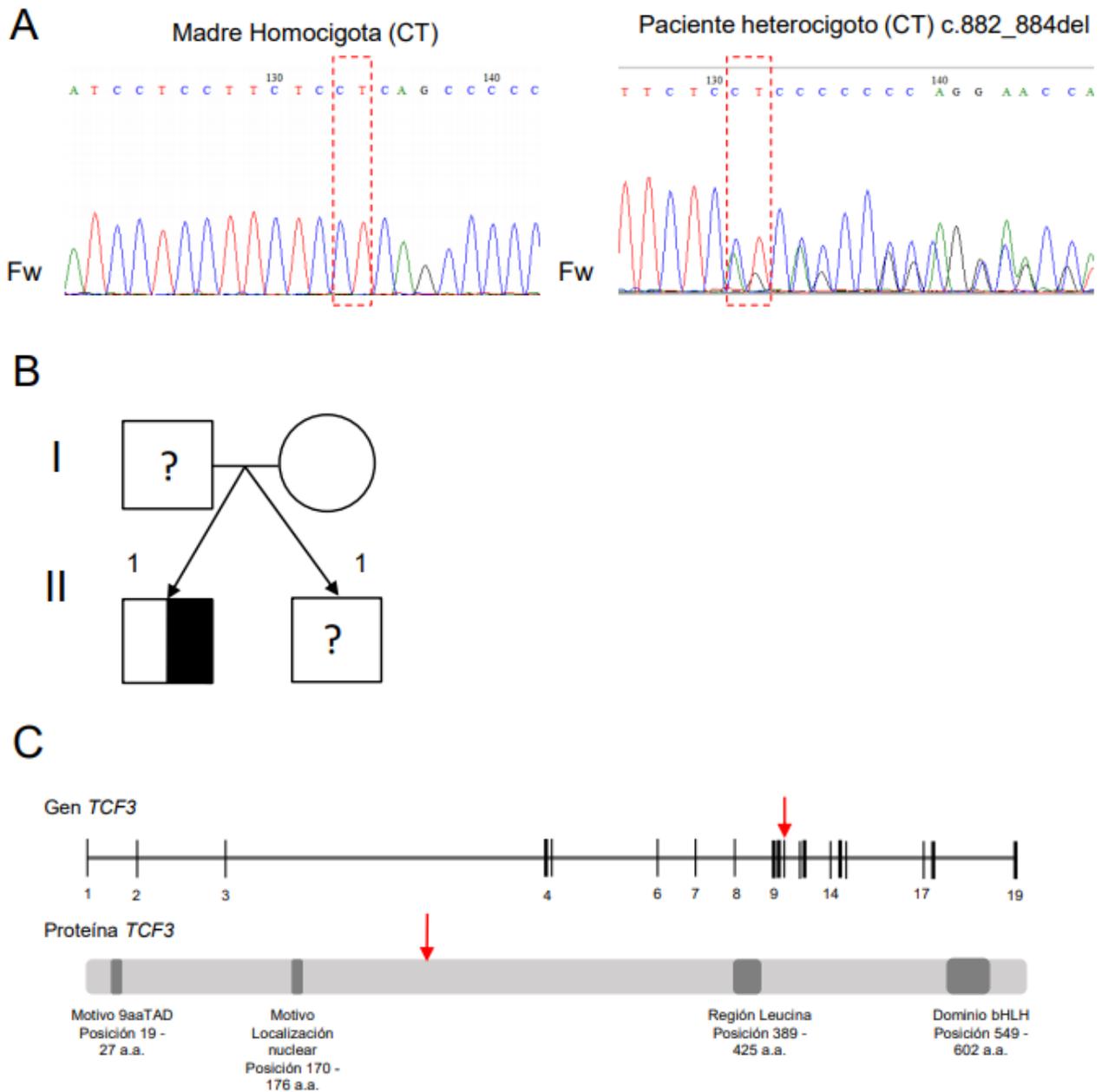


Figura 3. Confirmación del defecto genético en *TCF3* en el paciente F 00108. A. Secuenciación por Sanger realizada en el cual se confirma la mutación heterocigota en *TCF3* en el paciente y el patrón homocigoto en su madre; en el padre y en el hermano mellizo dicigótico no se tiene información. B. Pedigree de la familia del paciente. C. Representación esquemática del gen *TCF3* (arriba), con 19 exones, localización 19p13.3 y la proteína que codifica (abajo). Las flechas rojas representan la ubicación de la mutación y el sitio estimado donde se afecta la proteína. Fw: *Forward*, a.a.: Aminoácidos.

Luego de analizar su WES, se hizo la confirmación de la mutación encontrada en el exoma, por medio de secuenciación por Sanger, el cual dio como resultado que el paciente tiene una mutación heterocigota

(c.2027delA), esto indica que uno de sus dos alelos heredados, se encuentra afectado por una delección; sin embargo, sus padres no tienen la mutación (Fig. 2 A y B).

El gráfico C de la figura 2, muestra la ubicación de la mutación en el gen *A2M*, el cual se encuentra en el cromosoma 12 (12p13.31), en el exón 17. Se realizó una representación gráfica de dónde se presenta el posible sitio inicial de afectación en la proteína, la cual podría estar antes de la región cebadora (Posición 690 - 728 a.a.), más exactamente en la posición del aminoácido 676.

Pruebas funcionales

En el paciente además se realizaron mediciones de la proteína A2M en suero, obteniendo un resultado de 101 mg/dl, el cual se encuentra disminuido con base a los valores de referencia para la edad que están dentro de un rango de 130 y 300 mg/dl.

F 00108

Al paciente se le realizó un WES en el cual se le identificó variantes en distintos genes con enfermedades relacionadas con inmunodeficiencias, miopatías heredadas, alergias, rinosinusitis, dermatitis atópica, entre otros, todas relacionadas con el sistema inmune (Tabla 3). El principal gen candidato a IDP fue el gen *TCF3*, en el cual el paciente tiene una variante heterocigota, siendo esta una mutación *Frameshift* tipo deleción; indicando que la mutación genera un cambio en el marco de lectura del ADN. Su frecuencia en la población según 1000 genomas es de 0.0052. El análisis de los *reads*, indica que de los 12 *reads* secuenciados, 5 tenían esta variante. Para precisar su patrón de herencia, se analizaron genéticamente sus padres, pero sólo logramos obtener el consentimiento de la madre para realizar los análisis, en la cual, no se presenta la mutación (Fig.3 A). La mutación se buscó en diferentes bases de datos (Ensembl y ExAC) encontrando que aún no ha sido reportada.

Luego de analizar su WES, se hizo la confirmación de la mutación encontrada en el exoma, por medio de secuenciación por Sanger, el cual dio como resultado que el

paciente tiene una mutación heterocigota (c.882_884del), esto indica que uno de sus dos alelos heredados, se encuentra afectado por una deleción, pero la madre no presenta la mutación. (Fig. 3 A y B).

El gráfico C de la figura 3, muestra la ubicación de la mutación en el gen *TCF3*, el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 19 (19p13.3). La mutación se encuentra en el exón 11. Se realizó una representación gráfica de la posible localización de la mutación en la proteína, después del motivo de localización nuclear (posición 170 - 176 a.a.), más exactamente en la posición del aminoácido 243.

Modelamiento de proteína TCF3

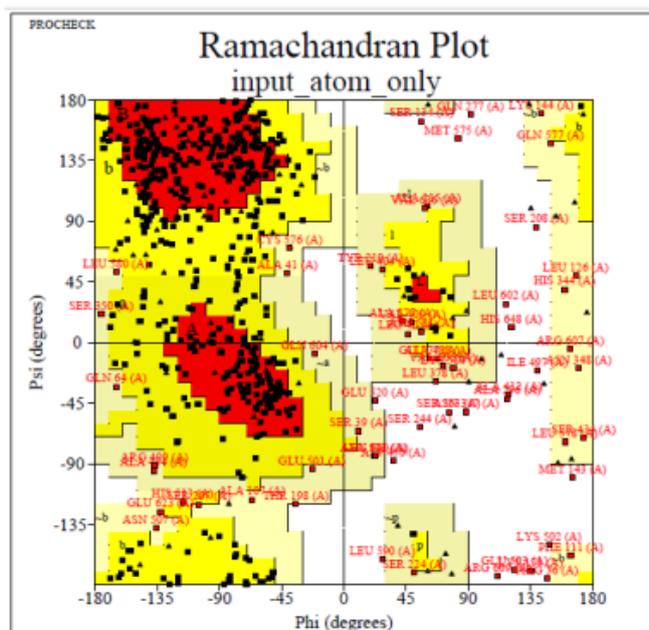
Para el modelamiento de la proteína *TCF3*, se utilizó el software online disponible por Swiss Model Protein PDB (<https://swissmodel.expasy.org/>), en el cual, se obtuvo el gráfico de Ramachandran que se utiliza para observar los residuos de aminoácidos de la proteína que se desea modelar, se evalúa la calidad de la estructura o el modelo, se observa la distribución de la estructura secundaria y se visualiza los ángulos producidos por cada aminoácido y su efecto directo en la conformación de la proteína.

Nosotros modelamos la proteína *wild type* (*WT*) y la proteína con la mutación encontrada previamente, esto con el fin de observar el cambio estructural en ella. En el gráfico A de la Figura 4, los residuos de aminoácidos están en un 55,5% en la zona favorable que es la roja, es decir, es el porcentaje en el cual la estructura secundaria (hélices α y láminas β) de la proteína es favorable y los residuos restantes están formando ángulos forzados, lo que indica que el modelo de la proteína no es el adecuado, porque puede que estas localizaciones de estos residuos no sean las reales, estos residuos deben de estar en su mayoría en la zona favorable y por el contrario, se observa en el gráfico que se presenta gran dispersión en la zona amarilla y

la zona de color pastel. A su vez, el gráfico B realizado para la proteína *TCF3* en su modelo *mutada*, los residuos de aminoácidos están en un 43,1% en la zona favorable, lo cual indica que apenas este porcentaje de los residuos

están formando hélices α y láminas β , entonces los demás residuos están formando ángulos forzados, lo que indica que el modelo de la proteína no es el adecuado.

A



B

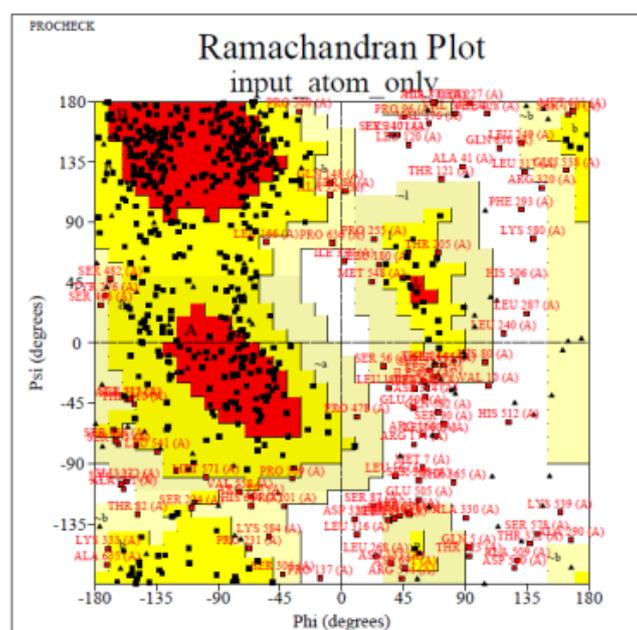


Figura 4. A. Gráfico de Ramachandran para la proteína *TCF3* en su modelo *wild type*. B. Gráfico de Ramachandran para la proteína *TCF3* en su modelo *mutada*. Este gráfico fue realizado en el programa En ambos gráficos se puede observar las estructuras secundarias de las proteínas; en el segundo cuadrante se observan las combinaciones de aminoácidos en las hélices α izquierda; en el tercer cuadrante se hallan las hélices α derecha y en el primer cuadrante las combinaciones de las láminas β . El ángulo Phi (ϕ) es la rotación en torno al enlace Carbono α - Nitrogeno y el ángulo Psi (ψ) es la rotación en torno al enlace Carbono α - Carbono. La zona color pastel representa las zonas no permitidas para los aminoácidos; la zona amarilla representa una zona permitida, en donde los átomos tienen permitido estar más cercanos y la zona roja se refiere a las conformaciones donde no hay impedimentos estéricos y se forman las láminas β y las hélices α . Esto es un resultado del modelamiento realizado en el software online Swiss Model Protein.

F 00837

Este paciente tiene un protocolo diferente de para abordar su estudio genético. Inicialmente, en estudios previos realizados por el GIDP de la UdeA, se había identificado que el paciente cumplía con los requisitos para tener una deficiencia del complemento (Tabla 4, medición de CH50 y AH50 sin sueros para complementar). Estos dieron como resultado que el paciente tenía una deficiencia en el componente del complemento C3. Para identificar cuál de los factores estaban disminuidos, se realizaron pruebas de CH50 con complementación, en la que se tenían sueros deficientes de cada factor y se mezclaban con el suero del paciente; si había lisis, era porque el suero del paciente complementaba el suero con la

deficiencia de complemento específica y viceversa. Como resultado de esto, se obtuvo que, en la vía clásica del complemento, el único suero en el que no se obtuvo lisis luego de la complementación fue en el suero deficiente en C3, concluyendo, que el paciente al no tener este factor, no podía complementar el suero deficiente (Tabla 4).

Luego de tener estos resultados, se realizaron otros estudios por medio de Western Blot, para confirmar la deficiencia de esta proteína C3 en el suero del paciente, teniendo como resultado que no había proteína o se encontraba totalmente disminuida en el suero del paciente comparado con otro suero de otro paciente que se conocía que no era deficiente de C3 y con el suero humano normal en los

cual se observan bandas a diferentes tamaños moleculares, que corresponden a las diferentes fracciones de la proteína C3 clivada (Fig. 5 A). Para validar la prueba, se realizó la medición de este mismo suero, pero con otro anticuerpo que reconociera el factor del complemento C9, el cual tuvo como resultado efectivamente que el paciente tenía C9 y por lo tanto se observó la banda de 63 kDa en el Western Blot (Fig. 5 B). Para comprobar que hubiera proteína en las diferentes líneas del Western blot, se realizó la prueba de Rojo de Ponceau el cual arrojó resultados positivos tanto para el suero del paciente como para los sueros de otro paciente (O) o el suero humano normal (Fig. 5 C).

Como previamente habíamos identificado que el paciente tenía la deficiencia en C3, entonces se le realizó el WES y se priorizó el análisis de las variantes en este gen. Se hizo la confirmación de la mutación encontrada en el exoma, por medio de secuenciación por Sanger, el cual dio como resultado que el paciente tiene una mutación homocigota (cT2333C), esto indica que sus dos alelos heredados, se encuentra afectados por una mutación tipo *missense*. Los padres también tienen la mutación, pero esta se expresa de forma heterocigota. De esta manera se infiere que se heredó la mutación, debido a su gran componente familiar, porque los padres del paciente, son primos hermanos por pariente paterno (Fig. 6 A y B).

Tabla 4.

Sueros para complementar ^a	Medición CH50	Medición AH50
Ninguno	Nula	Nula
C1	Lisis completa	N/A
C2	Lisis completa	N/A
C3	Nula	N/A
C4	Lisis completa	N/A
C5	Lisis completa	N/A
C6	Lisis completa	N/A
C7	Lisis completa	N/A
C8	Lisis completa	N/A
C9	Lisis completa	N/A

Tabla 4. Actividad lítica del complemento con el suero del paciente F 00837. CH50: Actividad hemolítica al 50% de la vía clásica del complemento. AH50: Actividad hemolítica al 50% de la vía alternativa del complemento. a. Suero sin complementar. b. Ensayo de complementación con sueros deficientes de cada componente del complemento de la vía clásica.

El gráfico C de la figura 6, muestra la ubicación de la mutación en el gen C3, el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 19 (19p13.3). La mutación se encuentra en el exón 18. Se realizó una representación gráfica de la posible ubicación de la mutación en la proteína, después del dominio de anafilotoxinas (posición 693 - 728 a.a.), más exactamente en la posición del aminoácido 778.

Discusión

El objetivo del presente estudio era caracterizar molecularmente genes candidatos a IDP obtenidos a partir de WES. Después de analizar el WES de los pacientes incluidos en el estudio, se seleccionaron las variantes en los genes que fueran potencialmente deletéreas, se confirmaron mediante secuenciación por Sanger las

variantes seleccionadas y se realizó el modelamiento *In Silico* en la proteína *TCF3*, pero lamentablemente no fue un buen modelamiento con base en los resultados obtenidos de los gráficos de Ramachandran, además de realizar pruebas cuantitativas y funcionales en el paciente F 00108, realizando una medición de *A2M*, la cual estuvo disminuida.

El principal gen candidato para IDP que se seleccionó en el paciente F 00670-I-H2 fue *TNFRSF9*, cuya proteína (CD137) participa en la expansión clonal, la supervivencia y el desarrollo de los linfocitos T, células NK y células dendríticas (Eun et al., 2015) y también en la activación de monocitos (Kienzle y Von Kempis, 2000). Esta proteína hace parte de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (*TNFR* por sus siglas en inglés), además su región transmembranal contiene sitios de fosforilación y su dominio extracelular contiene repeticiones ricas en cisteína, lo cual es muy característico de los miembros de la familia *TNFR* (Schwarz et al., 1993). Se expresa en células dendríticas foliculares

(Lindstedt et al., 2003), en la superficie de las células NK aumentando los niveles de CD54 y CD69 (Lin et al., 2008); además CD137 ligando (CD137L) se expresa en la superficie de los monocitos, los cuales son potentes activadores de los linfocitos (Michel y Schwarz, 2000). En algunos estudios realizados en ratones *knockout* para este gen se observa que induciendo shock séptico con LPS derivado de *Escherichia coli* a los ratones, reducen los niveles de citoquinas como la IL-4, IFN- γ y TNF- α , generando una respuesta retardada en la activación de los linfocitos T, además de reducir la actividad citolítica de las células NK; sugiriendo que CD137 tiene un rol importante en la respuesta proinflamatoria de citoquinas, tanto como las respuestas de tipo Th2 dependientes de IL-4 (Vinay et al., 2004). Estos hallazgos se pueden relacionar con el fenotipo clínico del paciente, ya que este tiene una respuesta retardada a infecciones teniendo en cuenta las subpoblaciones de linfocitos y además tuvo infecciones a repetición durante gran parte de su vida.

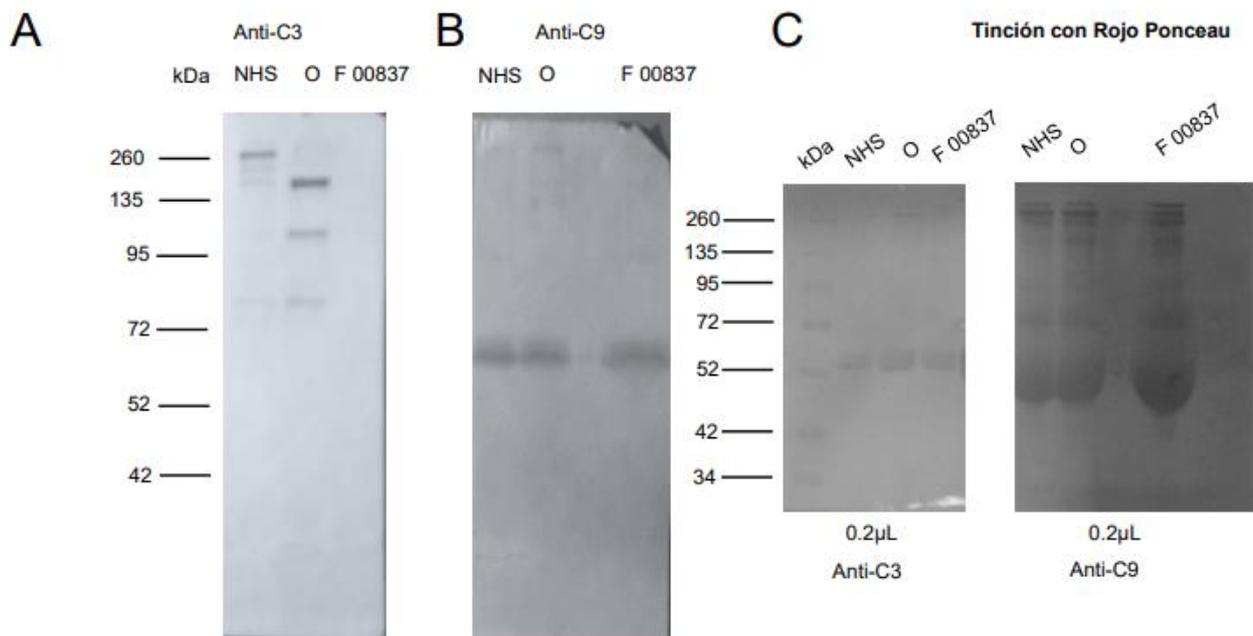
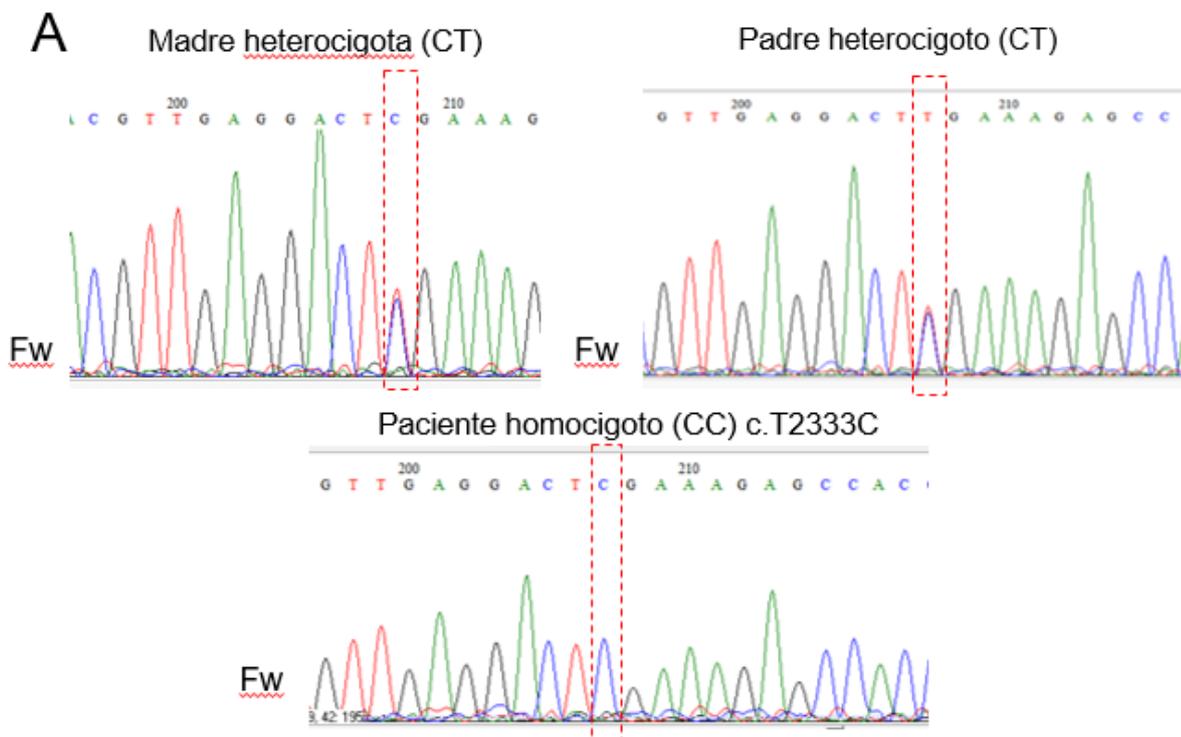


Figura 5. Western Blot para las proteínas C3 y C9. Medición de C3 (A) y C9 (B) por Western Blot en el paciente F 00837, en otro paciente (o) y en suero humano normal (SHN). C. Tinción de Ponceau. kDa: Tamaño de la proteína expresada en kiloDalton.

El principal gen candidato para IDP que se seleccionó en el paciente F 00461 fue *A2M*. Este gen codifica para una glicoproteína con capacidad de inhibir de la serina, treonina y metaloproteasas y citoquinas proinflamatorias, clivando estas proteínas, adicionando grupos SH, sugiriendo un cambio conformacional en la proteína y de esta manera inhibiéndola (Sottrup-jensen, 1989). Se expresa en tejidos vasculares, incluyendo músculo liso (Rodríguez-Calvo et al., 2015), además en otros estudios realizados en ratones adultos se observa que dos de los mayores sitios de expresión de la proteína *A2M* se encuentra en el hígado y el cerebro, en este último distribuido en todo el cerebro excepto la corteza y la región del hipocampo (Lorent et al., 1995). De manera interesante, en un estudio por serie de casos se detectó un paciente con enfermedad pulmonar crónica desde su niñez, el cual presentaba un polimorfismo en el gen, siendo heterocigoto

para la mutación, el cual podría ser responsable de la disminución de esta proteína en el suero y probablemente la causa de su enfermedad (Poller et al., 1989); un caso muy similar al encontrado en el presente estudio. En otros estudios relacionados con la enfermedad del Alzheimer, han asociado la expresión de *A2M* en el cerebro que está relacionada con los niveles de expresión y la fosforilación de la calcineurina en el cerebro, una proteína responsable de la activación de la transcripción de la IL-2, siendo responsable al mismo tiempo de la estimulación y crecimiento de los LT (Varma et al., 2017). Aunque no hay más estudios que relacionen la *A2M* con las IDP, el presente trabajo abre la posibilidad que este gen sea importante en la correcta homeostasis y funcionamiento del pulmón, lo cual debe ser investigado en mayor profundidad.



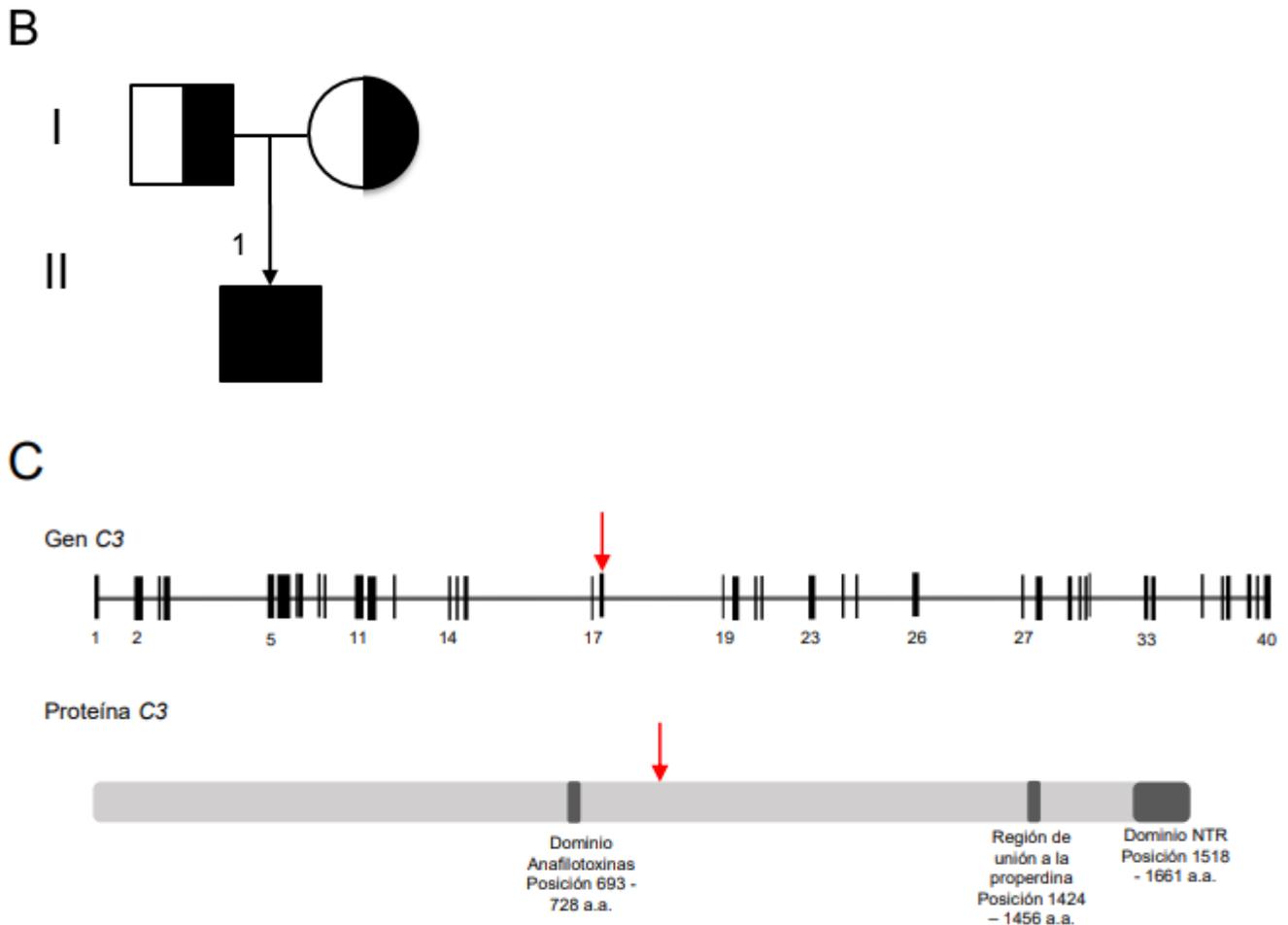


Figura 6. Confirmación del defecto genético en C3 en el paciente F 00837. A. Secuenciación por Sanger realizada en la cual se confirma la mutación heterocigota en C3 en los padres y la mutación homocigótica en el paciente. B. Pedigree de la familia del paciente. C. Representación esquemática del gen C3 (arriba), con 40 exones, localización 19p13.3 y la proteína que codifica (abajo). Las flechas rojas representan la ubicación de la mutación y el sitio estimado donde se afecta la proteína. Fw: *Forward*, a.a.: Aminoácidos.

El principal gen candidato para IDP que se seleccionó en el paciente F 00108 fue *TCF3*, es un factor de transcripción perteneciente a la familia de las proteínas E, el cual es importante para el desarrollo de los linfocitos B, la ausencia de este gen produce anomalías en estadios tempranos de los linfocitos T $\alpha\beta$, reduciendo la cantidad de estos en los timocitos. Adicionalmente, este gen es requerido para la señalización de TNF- α , IL-1 α e IL-7 y su ausencia está relacionada con el desarrollo de linfomas debido a una inestabilidad cromosomal que promueve la activación del proto-oncogen c-myc (Bain et al., 1997). En otros estudios, se relaciona este gen con la progresión de carcinoma cervical de células escamosas (CSCC por sus

siglas en inglés) (Luo et al., 2017). Además, estudios en ratones, indican que las E proteínas, incluyendo este gen, es necesario para el mantenimiento del sitio hipersensible a DNAsa tipo I (DHS por sus siglas en inglés), la cual está encargada de la actividad transcripcional de los factores de transcripción, la regulación de las inmunoglobulinas en los plasmoblastos y células plasmáticas promoviendo su alta secreción en el plasma (Wöhner et al., 2016). El paciente presenta diversas alteraciones en su sistema inmune, comenzando a temprana edad con una anemia hemolítica autoinmune, infecciones a repetición que lo llevan a padecer enfermedad diarreica crónica, padeciendo a su vez, rinitis alérgica. El

fenotipo inmunológico del paciente concuerda con los hallazgos en la literatura, debido a que el paciente presenta una disminución en los LB de memoria, lo cual genera una disminución en las inmunoglobulinas, sumando a esto que el paciente padecía diversos desequilibrios, como tiroiditis, desnutrición crónica, generando de esta manera infecciones como neumonía. En un estudio realizado en el 2013, se identificaron 4 pacientes con mutaciones de novo en esta misma proteína, las cuales eran autosómicas

dominantes para la agammaglobulinemia que padecían los pacientes (Boisson et al., 2013); este estudio indica que TCF3 es muy importante en el desarrollo de los precursores de los linfocitos B. El paciente al tener esta mutación puede estar afectando la producción de esta proteína de gran importancia, pero se hacen necesarios más estudios para medir la concentración de la proteína en sangre y determinar de esa manera si realmente la está afectando.

Células	Valores de Paciente ^a F 00670-I-H2	Valores de Paciente ^a F 00461	Valores de referencia relativos	Valores de referencia absolutos
Leucocitos	10230	6325	-----	5.900 (4.600-7.100) ^b
Linfocitos Totales	2680 (26.2)	1569 (24.8)	32(28-39) ^c	2.300 (1.200-4.100) ^c
Linfocitos CD3+	1860 (69.4)	1115 (71,1)	67 (50-91) ^c	1.500 (780-3.000) ^c
Linfocitos CD3+/CD4+	965 (36.0)	787 (50,2)	42 (28-64) ^c	1000 (500-2.000) ^c
CD4+CCR7+CD45RA+ (ayudadores vírgenes)	261 (27,0)	44 (5,6)	46 (16-100) ^c	500 (100-2.300) ^c
CD4+CCR7+CD45RA- (ayudadores de memoria central)	111 (11,5)	52 (6,7)	42 (18-95) ^c	430 (180-1.100) ^c
CD4+CCR7-CD45RA- (memoria efectora)	538 (55,8)	670 (85,1)	5 (1-23) ^c	53 (13-220) ^c
Linfocitos CD3+/CD8+	772 (28,8)	257 (16,4)	22 (12-40) ^c	500 (200-1.200) ^c
CD8+CCR7+CD45RA+ (citotóxicos vírgenes)	144 (18,6)	40 (15,4)	44 (20-95) ^c	220 (78-640) ^c
CD8+CCR7+CD45RA- (citotóxicos de memoria central)	4 (0,5)	1 (0,4)	5 (1-20) ^c	24 (5-120) ^c
CD8+CCR7-CD45RA- (memoria efectora)	315 (40,8)	90 (34,9)	36 (14-98) ^c	16 (40-640) ^c

Tabla 5. Subpoblaciones de linfocitos T (LT) para dos de los pacientes incluidos en este estudio. ^aValores absolutos expresados en 10³ células/ml y relativos (porcentajes en paréntesis) para cada paciente. Los valores en negrilla y subrayados representan desviaciones de los valores esperados para la edad. ^b Valores de referencia según Hannel L. et al. 1992. Immunology Today, 13 (6): 215-218. ^c Valores de referencia según Schatorjé EJH, et al. Scand. J Immunol. 2012 vol. 75 (4) pp. 436-44. Los valores de referencia se presentan como la media aritmética y el rango (en paréntesis).

El principal gen candidato para IDP que se seleccionó en el paciente F 00837 fue C3, este gen codifica para la proteína C3, que participa en la cascada del complemento, que está involucrado en la vía clásica, alternativa y de las lectinas. Esta proteína es clivada y se convierte en C3a y C3b. C3a es una anafilotoxina y C3b junto con C3 y C5 tienen

funciones de opsonización e inducción de la fagocitosis. Esta es una proteína muy importante para la modulación y proliferación de los LT, es necesaria para una correcta función celular de las células Th1, C3a por ejemplo tiene una acción directa sobre los LT promoviendo la inflamación y la respuesta a infecciones (Clarke y Tenner, 2014). El

paciente en la historia clínica se relata que ha sufrido infecciones piógenas durante su corto trayecto de vida, encontrándose diferentes tipos de *Streptococcus*, además de padecer de glomerulonefritis membranoproliferativa, una enfermedad que causa complejos inmunes en el riñón y se caracteriza por proteinuria, hipertensión, hematuria y daño en la función renal en el 50% de los pacientes que padecen esta enfermedad; la cual, según un estudio que realizaron en la Hospital Universitario de Zurich, Switzerland, Suiza, 7 de los 7 pacientes en una media de edad de

7.3 años presentaban una aumentada disminución en la cantidad de C3 medida en el plasma, además de otras alteraciones (Spartà et al., 2018). Nuestro paciente, tiene un déficit en esta proteína de gran importancia para la respuesta inmune y la activación de las cascadas del complemento, además de presentar una mutación homocigota T2333C en este gen heredada de sus padres que también presenta la mutación de manera heterocigota, lo cual abre la posibilidad a más estudios en este paciente.

Células	Valores de Paciente ^a F 00670-I-H2	Porcentaje esperado para adultos 25-50 años	Valor absoluto esperado para adultos 25-50 años	Valores de Paciente ^a F 00461	^c Media del porcentaje esperado para 11-18 años	^c Media del valor absoluto esperado para 11-18 años
Linfocitos CD19+ (LB)	309 (12.6)	12% (6-19) ^b	200 (100-500) ^b	72 (5.3)	15.09 (9.1-21)	328 (172-543)
Linfocitos CD19+/CD21+ (LB maduros)	294 (12.0)	-	-	52 (3.82)	-	-
#CD27+ (de memoria)	28 (8.9)	28.4(22.6-40.3) ^c	64(40-94) ^c	3 (4.64)	21.3 (10.2-35.6)	66 (29-118)
#IgD+/CD27- (virgenes)	280 (90.7)	65.1(58.0-72.1) ^c	29(18-40) ^c	64 (88.6)	75.27 (63.3-87.9)	252 (117-429)
#IgD+/CD27+ (Linfocitos IgM de memoria)	26 (8.4)	15.2(13.4-21.4) ^c	35(22-54) ^c	3 (3.86)	11 (6.1-16.9)	34 (16-49)
#IgD-/CD27+ (memoria con cambio de isotipo)	2 (0.5)	13.2(9.2-18.9) ^c	29(18-40) ^c	<1 (0.78)	10.32 (4.1-18.7)	32 (13-69)
IgD+/CD38+ (centroblastos)	33 (10.7)	-	-	6 (9.04)	-	-
#IgD-/CD38++ (plasmoblastos circulantes)	0 (0.1)	1.0(0.6-1.6) ^d	2(1-3) ^d	<1 (0.13)	0.7 (0.0-10) ^e	2.1 (0.2-21) ^e
#CD24++/CD38+ (transicionales)	32 (10.5)	2.0(1.0-3.6) ^d	4(2-6) ^d	6 (9.04)	11 (4-33) ^e	31 (5.9-170) ^e

Tabla 6. Subpoblaciones de linfocitos B (LB) para dos de los pacientes incluidos en este estudio. ^aValores absolutos expresados en 10³ células/ml y relativos (porcentajes en paréntesis) para cada paciente. Los valores en negrilla y subrayados representan desviaciones de los valores esperados para la edad. Valores de referencia según ^bJournal of Pediatrics, 1997; 130(3): 388-393, ^cClinical Immunology, 2009; 131(1): 50-59, ^dScandinavian, Journal of Immunology 74, 502-510, ^eSchatorje E.J.H et al. Clinical Immunology, 2011. Los valores de referencia se presentan como la media aritmética y el rango (en paréntesis).

Finalmente, el presente estudio es un reporte de casos de 4 pacientes con características clínicas similares y que comparten una enfermedad en común que es la Inmunodeficiencia común variable, excepto para F 00837 que padece Deficiencia del complemento. Nosotros reportamos 3 nuevas mutaciones en genes que pueden estar afectando directamente la funcionalidad de

las proteínas y su disminución en el plasma lo que conlleva a tener los fenotipos inmunológicos expresados para cada uno de los pacientes incluidos en el estudio. Algunas de las limitaciones que tuvimos fue que en el paciente F 00108 sólo obtuvimos sangre total de la mamá y por supuesto el paciente, para los análisis posteriores, pero no

obtuvimos del padre del paciente, ni tampoco de su hermano gemelar.

El presente estudio abre nuevas posibilidades a investigar más a fondo por medio de análisis funcionales a las proteínas expresadas en estos pacientes para comprobar su verdadera disfuncionalidad y de esta manera proponer tratamientos más efectivos para cada uno de los pacientes.

Agradecimientos

A todo el equipo del grupo IDP de la Universidad de Antioquia por permitirme realizar y desarrollar mi tesis de pregrado, especialmente a Catalina Martínez por su dedicación, compromiso y ayuda a desarrollar gran parte de los resultados del presente trabajo; a Jesús Álvarez por facilitarme los datos asistenciales de los pacientes, al Doctor Julio César Orrego por acceder a la revisión de las historias clínicas y su disposición a atender nuestras dudas; a Sebastián Gutiérrez por ayudarme a realizar varios procedimientos en el laboratorio y la interpretación de varios resultados y a Claudia Milena Trujillo, por su paciencia, tolerancia y compromiso al aceptar ser mi asesora de este trabajo, sin su perseverancia y su colaboración durante todo este tiempo, no habría sido posible desarrollarlo con calidad y excelencia.

Referencias

- Bain, G., I. Engel, E.C.R. Maandag, H.P. te Riele, J.R. Volland, L.L. Sharp, J. Chun, B. Huey, D. Pinkel, y C. Murre. 1997. E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol. Cell. Biol.* 17:4782–4791. doi:10.1103/PhysRevD.85.084004.
- Boisson, B., Y.D. Wang, A. Bosompem, C.S. Ma, A. Lim, T. Kochetkov, S.G. Tangye, J.L. Casanova, y M.E. Conley. 2013. A recurrent dominant negative E47 mutation causes agammaglobulinemia and BCR- B cells. *J. Clin. Invest.* 123:4781–4785. doi:10.1172/JCI71927.
- Bonilla, F.A., I. Barlan, H. Chapel, B.T. Costa-Carvalho, C. Cunningham-Rundles, M.T. de la Morena, F.J. Espinosa-Rosales, L. Hammarström, S. Nonoyama, I. Quinti, J.M. Routes, M.L.K. Tang, y K. Warnatz. 2016. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 4:38–59. doi:10.1016/j.jaip.2015.07.025.
- Bonilla, F.A., y R.S. Geha. 2003. 2. Update on primary immunodeficiency diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117:571–581. doi:10.1016/j.jaci.2005.09.051.
- Boyle, J.M., y R.H. Buckley. 2007. Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. *J. Clin. Immunol.* 27:497–502. doi:10.1007/s10875-007-9103-1.
- Choi, M., U.I. Scholl, W. Ji, T. Liu, I.R. Tikhonova, P. Zumbo, A. Nayir, A. Bakkaloğlu, S. Ozen, S. Sanjad, C. Nelson-Williams, A. Farhi, S. Mane, y R.P. Lifton. 2009. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:19096–19101. doi:10.1073/pnas.0910672106.
- Clarke, E. V., y A.J. Tenner. 2014. Complement modulation of T cell immune responses during homeostasis and disease. *J. Leukoc. Biol.* 96:745–756. doi:10.1189/jlb.3MR0214-109R.
- Condino-Neto, A., R.U. Sorensen, A.C. Gómez Raccio, A. King, F.J. Espinosa-Rosales, y J.L. Franco. 2015. Current state and future perspectives of the Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID). *Allergol. Immunopathol. (Madr).* 43:493–497. doi:10.1016/j.aller.2014.05.007.
- Cunningham-Rundles, C. 2010. How I treat common variable immune deficiency. *Blood.* 116:7–15. doi:10.1182/blood-2010-01-254417.
- Elorz Lambarri, J., J.M. García Martínez, y A. Bilbao Aburto. 2004. Inmunodeficiencias

- primarias. *An. Pediatría*. 60:19–23.
- Eun, S.-Y., S.-W. Lee, Y. Xu, y M. Croft. 2015. 4-1BB Ligand Signaling to T Cells Limits T Cell Activation. *J. Immunol.* 194:134–141. doi:10.4049/jimmunol.1401383.
- Fuentes, J., E. Jiménez, y S. Espinosa. 2016. Inmunodeficiencias del complemento. *Alergia, Asma e Inmunol. Pediátricas*. 25:84–88.
- Javier, F.C., C.M. Moore, y R.U. Sorensen. 2000. Distribution of primary immunodeficiency diseases diagnosed in a pediatric tertiary hospital. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 84:25–30. doi:10.1016/S1081-1206(10)62736-6.
- Kainulainen, L., J. Nikoskelainen, y O. Ruuskanen. 2001. Diagnostic findings in 95 Finnish patients with common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* 21:145–149. doi:10.1023/A:1011012023616.
- Kienzle, G., y J. Von Kempis. 2000. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int. Immunol.* 12:73–82. doi:10.1093/intimm/12.1.73.
- Lay-Son, R.G., y P.L. León. 2015. Perspectivas actuales sobre el diagnóstico genómico en pediatría. *Rev. Chil. Pediatr.* 86:3–11. doi:10.1016/j.rchipe.2015.04.002.
- Lin, W., C.J. Voskens, X. Zhang, D.G. Schindler, A. Wood, E. Burch, Y. Wei, L. Chen, G. Tian, K. Tamada, L.X. Wang, D.H. Schulze, D. Mann, y S.E. Strome. 2008. Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: Insights into “agonistic” effects of anti-CD137 monoclonal antibodies. *Blood*. 112:699–707. doi:10.1182/blood-2007-11-122465.
- Lindstedt, M., B. Johansson-Lindbom, y C.A.K. Borrebaeck. 2003. Expression of CD137 (4-1BB) on human follicular dendritic cells. *Scand. J. Immunol.* 57:305–310. doi:10.1046/j.1365-3083.2003.01217.x.
- Lorent, K., L. Overbergh, D. Moechars, B. de Strooper, F. van Leuven, y H. van den Berghe. 1995. Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience*. 65:1009–1025. doi:https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00555-J.
- Luo, L., H. Zhang, S. Nian, C. Lv, B. Ni, D. Wang, y Z. Tian. 2017. Up-regulation of Transcription Factor 3 Is Correlated With Poor Prognosis in Cervical Carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer*. 27:1422–1430. doi:10.1097/igc.0000000000001032.
- Michel, J., y H. Schwarz. 2000. Expression of soluble CD137 correlates with activation-induced cell death of lymphocytes. *Cytokine*. 12:742–746. doi:10.1006/cyto.1999.0623.
- Ng, S.B., E.H. Turner, P.D. Robertson, S.D. Flygare, A.W. Bigham, C. Lee, T. Shaffer, M. Wong, A. Bhattacharjee, E.E. Eichler, M. Bamshad, D.A. Nickerson, y J. Shendure. 2009. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*. 461:272–276. doi:10.1038/nature08250.
- Pettigrew, H.D., S.S. Teuber, y M.E. Gershwin. 2009. Clinical significance of complement deficiencies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173:108–123. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04633.x.
- Picard, C., W. Al-Herz, A. Bousfiha, J.L. Casanova, T. Chatila, M.E. Conley, C. Cunningham-Rundles, A. Etzioni, S.M. Holland, C. Klein, S. Nonoyama, H.D. Ochs, E. Oksenhendler, J.M. Puck, K.E. Sullivan, M.L.K. Tang, J.L. Franco, y H.B. Gaspar. 2015. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J. Clin.*

- Immunol.* 35:696–726.
doi:10.1007/s10875-015-0201-1.
- Picard, C., H. Bobby Gaspar, W. Al-Herz, A. Bousfiha, J.L. Casanova, T. Chatila, Y.J. Crow, C. Cunningham-Rundles, A. Etzioni, J.L. Franco, S.M. Holland, C. Klein, T. Morio, H.D. Ochs, E. Oksenhendler, J. Puck, M.L.K. Tang, S.G. Tangye, T.R. Torgerson, y K.E. Sullivan. 2018. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J. Clin. Immunol.* doi:10.1007/s10875-017-0464-9.
- Poller, W., J. Barth, y B. Voss. 1989. Detection of an alteration of the $\alpha 2$ gene in a patient with chronic lung disease and serum $\alpha 2$ deficiency. *Hum. Genet.* 83:93–96. doi:10.1007/BF00274157.
- Rodríguez-Calvo, R., B. Ferrán, J. Alonso, I. Martí-Pàmies, S. Aguil, O. Calvayrac, C. Rodríguez, y J. Martínez-González. 2015. NR4A receptors up-regulate the antiproteinase alpha-2 macroglobulin (A2m) and modulate MMP-2 and MMP-9 in vascular smooth muscle cells. *Thromb. Haemost.* 113:1323–1334. doi:10.1160/TH14-07-0645.
- Romero, D.S.F., y M.C. Juri. 2013. ARTÍCULO ORIGINAL INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE EPIDEMIOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN 69 PACIENTES. 315–323.
- Schwarz, H., J. Tuckwell, y M. Lotz. 1993. A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis-factor receptor family. *Gene.* 134:295–298. doi:10.1016/0378-1119(93)90110-O.
- Sims, D., I. Sudbery, N.E. Ilott, A. Heger, y C.P. Ponting. 2014. Sequencing depth and coverage: Key considerations in genomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 15:121–132. doi:10.1038/nrg3642.
- Sottrup-jensen, L. 1989. α -Macroglobulins: Structure, Shape, and Mechanism of Proteinase Complex Formation*. *Biol. Chem.* 264:11539–11542.
- Spartà, G., A. Gaspert, T.J. Neuhaus, M. Weitz, N. Mohebbi, U. Odermatt, P.F. Zipfel, C. Bergmann, y G.F. Laube. 2018. Membranoproliferative glomerulonephritis and C3 glomerulopathy in children: change in treatment modality? A report of a case series. *Clin. Kidney J.* 11:479–490. doi:10.1093/ckj/sfy006.
- Varma, V.R., S. Varma, Y. An, T.J. Hohman, S. Seddighi, R. Casanova, A. Beri, E.B. Dammer, N.T. Seyfried, O. Pletnikova, A. Moghekar, M.R. Wilson, J.J. Lah, R.J. O'Brien, A.I. Levey, J.C. Troncoso, M.S. Albert, y M. Thambisetty. 2017. Alpha-2 macroglobulin in Alzheimer's disease: A marker of neuronal injury through the RCAN1 pathway. *Mol. Psychiatry.* 22:13–23. doi:10.1038/mp.2016.206.
- Vélez, A.C., D.M. Cataño, R.D. Gómez, J.C. Orrego, M. Moncada, y J.L. Franco. 2015. Inmunodeficiencia común variable: caracterización clínica e inmunológica de pacientes e identificación de subgrupos homogéneos con base en la tipificación de subpoblaciones de linfocitos B. *Biomédica.* 35:101–116. doi:10.7705/biomedica.v35i1.2401.
- Vinay, D.S., B.K. Choi, J.S. Bae, W.Y. Kim, B.M. Gebhardt, y B.S. Kwon. 2004. CD137-Deficient Mice Have Reduced NK/NKT Cell Numbers and Function, Are Resistant to Lipopolysaccharide-Induced Shock Syndromes, and Have Lower IL-4 Responses. *J. Immunol.* 173:4218 LP-4229.
- Wöhner, M., H. Tagoh, I. Bilic, M. Jaritz, D.K. Poliakova, M. Fischer, y M. Busslinger. 2016. Molecular functions of the transcription factors E2A and E2-2 in controlling germinal center B cell and plasma cell development. *J. Exp. Med.* 213:1201–1221. doi:10.1084/jem.20152002.