



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO

**“CARACTERIZACIÓN GÉNÉTICA Y FUNCIONAL DE LA
RESPUESTA INMUNE CITOTOXICA EN PACIENTES CON
SUSCEPTIBILIDAD ANORMAL AL VIRUS DEL EPSTEIN BARR”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN MEDICINA MOLECULAR

QUE PRESENTA:

IBT. DANIELA OLIVIA LÓPEZ RIVERA

DIRECTOR

Dr. MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ

CO-DIRECTOR

Dr. SAÚL OSWALDO LUGO REYES

Cuernavaca, Morelos, México 2022.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL.

Tutor Principal: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz, (Facultad de Medicina – UAEM).

Co-Tutor: Dr. Saúl Oswaldo Lugo Reyes (Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría – INP).

Tutor Personal: Dr. José Luis Montiel Hernández, (Facultad de Farmacia – UAEM).

Vocal 1: Dra. Sara Elva Espinosa Padilla, (Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría – INP).

Vocal 2: Dr. Ricardo Valles Ríos, (Facultad de Medicina - UNAM).

Vocal 3: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia[†], (Facultad de Medicina – UAEM).

MIEMBROS DEL COMITÉ REVISOR DE TESIS.

Presidente: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama, (Facultad de Medicina – UAEM).

Secretario: Dr. José Luis Montiel Hernández, (Facultad de Farmacia – UAEM).

1er. Vocal: Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá, (Unidad de Investigación en Virología y Cáncer del Hospital Infantil de México Federico Gómez – HIMFG).

2do. Vocal: Dr. Saúl Oswaldo Lugo Reyes, (Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría – INP).

3er. Vocal: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz, (Facultad de Medicina – UAEM).

CRÉDITOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), bajo la tutoría del Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz, jefe del mismo laboratorio.

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se contó con el apoyo económico de una beca de maestría, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Beca número: 1075264.

Agradecimientos especiales a la fundación PEDIAMBULANTE A.C y a la Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias Primarias del Instituto Nacional de Pediatría, que, durante el desarrollo de este trabajo de investigación, se contó con el apoyo económico y técnico para la secuenciación del exoma completo de los pacientes.



AGRADECIMIENTOS

*A mi **director** de tesis, Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz, gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por brindarme las herramientas necesarias para la elaboración de este trabajo de investigación, gracias por lo estricto que fuiste conmigo, eso me motivo a superarme, gracias por la confianza brindada y por la amistad que creció a lo largo de este camino compartido.*

Gracias por tanto aprendizaje, fue un honor trabajar a tu lado.

*A mi **co-director** de tesis, Dr. Saúl Oswaldo Lugo Reyes, gracias por haberme apoyado y asesorado durante el proceso de mi proyecto de investigación, gracias por la confianza brindada y gracias por hacer realidad la publicación del artículo científico en el cual soy primer autor.*

*A los **integrantes de mi comité tutorial** y de **revisión de tesis**, especialmente a la Dra. Sara Elva Espinosa Padilla, por la confianza brindada, por su apoyo y motivación durante el desarrollo de mi tesis.*

*Al **laboratorio de la Dra. Angelica Santana**, en especial a Linda, por apoyarme con el manejo del citómetro y por su gran amabilidad y disponibilidad en cada uno de mis experimentos.*

*Al **laboratorio de la Dra. Ivonne Rosenstein**, en especial a Erika, por apoyarme con el manejo del citómetro en mis últimos experimentos.*

*A mis **compañeras de laboratorio**, Lucero, Jaqueline y especialmente a Guadalupe y Elizabeth con quienes compartí gratos momentos.*

*A mis **amigos y compañeros** de generación, con quienes compartí maravillosos momentos dentro y fuera de los laboratorios, en especial a mi amiga Atzin y mi amigo Zimri.*

*A mi **novio** Otoniel Ferrer Varo, por siempre confiar en mí, incluso cuando yo lo he dudado, gracias por tu apoyo y motivación, gracias por estar siempre para mí. Gracias por él: “Tú puedes, siempre puedes”*

*A mis **padres y hermanas**, gracias por ser la fortaleza de todos mis días, gracias por su apoyo incondicional, gracias por darme alas y permitirme usarlas, para llegar hasta donde yo me lo proponga, gracias por aceptar y apoyarme en cada una de mis decisiones, gracias por que por ustedes SOY y SERÉ...*

*A **Dios** por permitirme la vida, por darme sabiduría, paciencia y sensatez.*

DEDICATORIA

Esta etapa y logro de mi vida, la dedico desde lo más profundo de mi ser a la niña:

Daniela Olivia López Rivera,

quien es la única que sabe lo mucho que me costó llegar a donde estoy y ser lo que ahora soy. Desde el día de mi examen como aspirante al posgrado de medicina molecular hasta el día de mi titulación, hemos pasado por momentos vulnerables que me han llevado a querer tirar la toalla en más de una ocasión, sin embargo, hemos podido salir adelante y nos hemos demostrado que podemos y somos capaces de enfrentar cualquier situación desfavorable por más difícil que parezca.

Estoy muy orgullosa de lo que he conseguido, porque ha sido un logro muy personal y que significa mucho para mí.

INDICE

ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 VIRUS EPSTEIN-BAAR.....	1
1.2 PATOGENIA DEL EBV	2
1.3 CÉLULAS NATURAL KILLER	3
1.3.1 Mecanismos de activación.	4
1.3.2 Mecanismos Efectores.....	5
1.4 LINFOCITOS T.....	6
1.4.1 Linfocitos T CD4 ⁺	6
1.4.2 Linfocitos T CD8 citotóxicos	7
1.4.3 Mecanismos de activación de las células T citotóxicas	8
1.4.4 Mecanismos efectores	9
1.5 INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS	9
1.6 GENES AFECTADOS POR UNA DESREGULACIÓN INMUNE QUE OCASIONAN UNA INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA CON SUSCEPTIBILIDAD ANORMAL AL EBV.	10
1.7 PATOLOGIAS OCASIONADAS POR UNA RESPUESTA INMUNE ANORMAL AL EBV.....	12
1.7.1 Linfocitosis Hemofagocítica (HLH)	12
1.7.2 Síndromes Linfoproliferativos ligados al cromosoma X.....	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
4. JUSTIFICACIÓN.....	15
5. OBJETIVOS	16
5.1 OBJETIVO GENERAL	16
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
6. HIPÓTESIS.....	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS	17
7.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN	17
7.2 METODOLOGÍA.....	18
8. RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES.....	52

PERSPECTIVAS	53
LITERATURA CITADA	54

ABREVIATURAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
CAEBV	Virus Epstein-Barr Crónico Activo
CHS	Síndrome Chediak Higashi
CTL	Linfocito T citotóxico
EBV	Virus Epstein-Barr
HCMV	Citomegalovirus humano
HLH	Linfocitosis hemofagocítica
IDP	Inmunodeficiencia primaria
IFN- α	Interferón alfa
IFN- γ	Interferón gamma
IL-2	Interleucina 2
IL-10	Interleucina 10
KS	Sarcoma de Kaposi
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MI	Mononucleosis infecciosa
pb	Pares de base
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SNC	Sistema Nervioso Central
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
USG	Ultrasonido
WES	Secuenciación Masiva de Exoma

RESUMEN

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) o errores innatos de la inmunidad, son causados por variantes monogénicas de la línea germinal que impactan en el desarrollo, la diferenciación y/o en la función de células de la respuesta inmunitaria.

Esta condición no solo establece una susceptibilidad anormal a infecciones, sino que también predispone a cáncer, trastornos del sistema inmune como autoinmunidad, alergia o síndromes autoinflamatorios. Existen alrededor de 480 errores innatos de la inmunidad [1], cuyas variantes patológicas comprometen el funcionamiento del sistema inmune. Dentro de estos errores innatos, se conoce un grupo de más de 30 defectos genéticos cuyas mutaciones son causantes de una susceptibilidad anormal a infecciones por miembros de la familia Herpesviridae, como el virus Epstein-Barr (EBV).

El virus Epstein-Barr (EBV) es un agente viral con características oncogénicas y se ha relacionado con el desarrollo de linfomas, carcinomas y sarcomas. Se estima que cerca del 95% de la población mundial está infectada en su gran mayoría de forma asintomática. Sin embargo, en individuos inmunocomprometidos, así como aquellos con algún tipo de error innato de la inmunidad, el EBV puede causar neoplasias malignas o síndromes linfoproliferativos que pueden evolucionar a linfomas. El EBV también se asocia, con enfermedades inflamatorias como la mononucleosis infecciosa (MI), EBV crónico activo (CAEBV), hemofagocitosis linfohistiocitaria (HLH) y afecciones autoinmunes. De las más de 30 causas genéticas asociadas con una susceptibilidad anormal a infecciones por EBV, todas codifican para varios elementos que están involucrados en regular la función de linfocitos T y células NK, lo que sugiere que estos tipos celulares son fundamentales para el control de la infección por EBV.

En este trabajo se realizó una caracterización genética y funcional de células linfoides en pacientes en los que se ha identificado una causa genética que conlleva a una susceptibilidad anormal a infecciones por el virus EBV. Lo anterior, nos permitió conocer, por un lado, las principales causas genéticas que en la población mexicana resultan en una susceptibilidad anormal asociada a infecciones por EBV y por otro lado como las mutaciones en los genes identificados afectan las funciones efectoras de los linfocitos T y células NK como son la función citotóxica, la secreción de citocinas y la capacidad proliferativa. En este estudio se

evaluaron a 5 pacientes que fueron reclutados mediante ciertos criterios de selección. Los pacientes fueron reclutados por el Instituto Nacional de Pediatría de la ciudad de México (INP), posteriormente las muestras de sangre de estos, fueron canalizadas al laboratorio de Inmunología Molecular de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) en donde realizamos los estudios genéticos e inmunológicos correspondientes. Cabe destacar que todo fue mediante un consentimiento y/o asentimiento informado de los familiares y pacientes. De acuerdo a los resultados obtenidos, se identificaron 7 mutaciones diferentes en un corte de 5 pacientes. En nuestro primer paciente, se encontraron dos mutaciones en un gen (*CORO1A*) que causa susceptibilidad anormal al EBV, ambas son mutaciones no reportadas y consideradas como patógenas. En el segundo paciente, se encontró una mutación nueva en un gen clásico (*LYST*) que desencadena HLH con hipopigmentación. Por otro lado, en el paciente 3, se identificaron dos mutaciones nuevas heterocigotas compuestas en un gen clásico (*UNC13D*) responsable de desencadenar HLH familiar. Finalmente, identificamos en el cuarto y quinto paciente dos mutaciones diferentes en el mismo gen (*TREX1*), el cual no se ha reportado como responsable de causar susceptibilidad anormal a infecciones o desencadenar algún tipo de HLH, sin embargo, los pacientes presentaron un cuadro clínico asociado con Síndrome Hemofagocítico. Aunado a esto se realizaron estudios inmunológicos funcionales en las células de cada paciente, en donde se pudo observar que el impacto a nivel genético, tenía una repercusión en el estado funcional de las células de los pacientes que presentaron un tipo de error innato de la inmunidad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 VIRUS EPSTEIN-BAAR

El virus Epstein-Barr (EBV) es un miembro de la familia Herpesviridae, que incluye virus grandes con genomas de ADN de doble cadena de 130–250 Kbp. El EBV presenta características comunes de linfotropismo, que es la capacidad de establecer una infección latente en las células del huésped y la capacidad de inducir la proliferación de células infectadas de forma latente. La infección por los herpesvirus es una de las infecciones más comunes entre la población. El EBV infecta aproximadamente al 95% de la población adulta mundial, generalmente en un equilibrio libre de enfermedad. El EBV se caracteriza por un ciclo de replicación bipartida con fases líticas y latentes alternas. El primero suele originarse en las células epiteliales de la orofaringe con el objetivo de propagar el virus a nuevos huéspedes, mientras que el segundo promueve la infección persistente. El EBV tiene un tropismo importante por los linfocitos B en los que reside y expresa solo una pequeña parte de su carga genética (estado latente). En individuos sanos, el virus reside solo en los linfocitos B de memoria, que son células de larga vida y, por lo tanto, el sitio de persistencia del virus. En cambio, durante el ciclo lítico se expresan más de 100 proteínas virales, que se utilizan para formar partículas infecciosas que provocan la muerte de las células infectadas [2].

Aunque el EBV en individuos inmunocompetentes se asocia con linfomas de células B, T y NK, carcinoma nasofaríngeo y cáncer gástrico, el EBV en individuos con inmunodeficiencia primaria a menudo es un agente que induce patologías bien definidas como los síndromes linfoproliferativos y la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH) [3]. Recientemente, el EBV se ha asociado con otras patologías asociadas a infecciones crónicas, que conducen al desarrollo de linfomas de linfocitos T o de células NK u otras manifestaciones clínicas e inmunológicas menos definidas, pero en donde todas ellas se manifiestan como anomalías recurrentes en respuesta a la susceptibilidad al EBV. La infección por el EBV es exclusiva de los humanos, donde su control está mediado por células linfoides, principalmente células NK y linfocitos T [4]. Una alteración en la función de estas células, podría provocar una inadecuada defensa frente a células infectadas por virus, incluido el EBV.

1.2 PATOGENIA DEL EBV

La propagación del EBV está mediada por la saliva. Muchas personas contraen el virus en la infancia, es decir, cuando son bebés o niños pequeños, principalmente a través de los miembros de la familia. Otros se infectan en la adolescencia, generalmente a través de amigos o parejas. La infección durante la infancia no se asocia con síntomas evidentes, mientras que la infección en la adolescencia suele causar mononucleosis infecciosa [2].

Después de la infección inicial, el virus establece un estado de reposo llamado “latencia”, infectando a las células B naive. El EBV latente se puede reactivar, lo que ocasiona que se ejecute su ciclo lítico y se produzcan nuevos virus que son excretados en la saliva. Con menos frecuencia, la infección persistente por EBV puede causar diferentes tipos de cánceres: linfomas de células B, T y NK, carcinoma nasofaríngeo y cáncer gástrico

La entrada del virus en los linfocitos B es un proceso muy complejo que comienza con la unión de la glicoproteína viral gp350/220 al receptor de superficie de los linfocitos B, CD21. Los virus entran a la célula por endocitosis, cuando el virus entra en el citoplasma se produce un proceso de decapsidación y transporte del ADN al núcleo. Cuando la molécula de ADN viral llega al núcleo del linfocito B, se transforma en ADN circular y forma un episoma [3]. Después de la infección, los linfocitos B comienzan el ciclo celular y proliferan constantemente en un proceso llamado transformación o inmortalización, lo que da como resultado una línea celular linfoblastoide inmortalizada. La infección por el EBV de los linfocitos B se caracteriza por un estado de latencia vírica, en donde se producen varias moléculas: proteínas de membrana de infección latente (LMP1 y LMP2), antígenos nucleares (EBNA), dos pequeños fragmentos de ARN no codificantes (EBER), y otras moléculas de ARN que pueden codificar proteínas (BART) [2], [3].

El virus se propaga a través de la sangre, en la fase de infección aguda del EBV, más de 1 de cada 100 linfocitos B de sangre periférica están infectados. La infección por el EBV provoca una respuesta tanto celular como humoral, predominando la primera en el control de la infección. En las primeras etapas de la infección, la acción combinada de células NK y linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ controlan la proliferación de los linfocitos B infectados [3].

En las primeras fases de la infección hasta el 50% de los linfocitos circulantes son activos frente a los antígenos del ciclo lítico del virus, mostrando anticuerpos específicos contra los antígenos de la cápside viral (VCA) y antígenos tempranos (EA). Una vez que se establece la infección latente, la respuesta inmune se dirige contra los antígenos latentes, particularmente EBNA3 [2], [3].

El EBV ha sido capaz de desarrollar diferentes estrategias para evadir la respuesta inmune, por ejemplo, produce la proteína BCRF1, que tiene una similitud del 70 % con la interleucina 10, de esta manera intenta inhibir la síntesis del IFN γ . Por otro lado, la producción por parte del EBV de la proteína BARF1, inhibe la expresión del IFN α de los monocitos. Otra estrategia del EBV es la hiperproducción de bcl-2 que evita la apoptosis de las células B infectadas por el virus. Finalmente, el EBV desarrolló una estrategia para persistir dentro de los linfocitos B de memoria, restringiéndolas a la expresión del EBNA1, que es resistente a la degradación por el proteosoma celular y evadiendo ser presentado como antígeno [2], [3].

1.3 CÉLULAS NATURAL KILLER

Como se ha mencionada anteriormente, las células NK y los linfocitos T citotóxicos juegan un papel crucial durante la infección del EBV en el hospedador. Desde las primeras etapas de la infección, la acción combinada de células NK y linfocitos T CD4+ y T CD8+ controlan la proliferación de los linfocitos B infectados. Por esta razón, la importancia de su estudio en este proyecto de investigación, al evaluar su mecanismo efector en células de pacientes con susceptibilidad anormal al EBV.

Las células citotóxicas naturales o natural killer (NK) representan una subpoblación de linfocitos que se encuentra en la sangre (5-10%) y en los tejidos linfoides, especialmente en el bazo y en gran cantidad en el hígado. Estas células derivan de la médula ósea y son linfocitos con numerosos gránulos citoplasmáticos, por lo que se les denomina linfocitos granulares grandes (LGL). Estos gránulos, que son un tipo de lisosomas especializados llamados gránulos líticos poseen un contenido rico en enzimas líticas y perforina, los cuales junto con otros elementos constituyen la maquinaria citotóxica de las células NK [4].

En los humanos las células NK se identifican en base a la expresión de la molécula de adhesión CD56 y por la ausencia de expresión del complejo CD3, el cual constituye el aparato de señalización de los linfocitos T. De acuerdo al nivel de expresión de CD56, las células NK son una población heterogénea, y se clasifican en dos poblaciones principales: NK CD56^{dim} y NK CD56^{bright}. Estas poblaciones se diferencian entre sí de acuerdo a la intensidad de expresión de los antígenos de superficie CD56 y CD16 y por su capacidad efectora citotóxica. Mientras las primeras representan el 90% de toda la población de NKs y tienen alta actividad citotóxica, las segundas representan la población minoritaria y presentan una baja capacidad citotóxica, pero son altamente eficientes en la producción de citocinas inflamatorias como el TNF- α .

1.3.1 Mecanismos de activación.

Las células NK son reconocidas por su capacidad innata de eliminar células infectadas por virus y células cancerosas, a través de un mecanismo conocido como citotoxicidad natural, el cual depende de la liberación de enzimas líticas y perforina hacia las células blanco. Adicionalmente, las células NK expresan la maquinaria necesaria para secretar citocinas inflamatorias como TNF- α e IFN- γ . A diferencia de los linfocitos T y B, en donde las funciones son dominadas por los receptores para el antígeno, la activación de las células NK no está dominada por un solo receptor, en vez de esto, las células expresan distintos receptores de superficie los cuales pueden inhibir o activar las funciones efectoras mediadas por estas células. Por lo tanto, un balance entre las vías de señalización que emanan de receptores de activación o inhibición determinan en última instancia si una célula NK se compromete a montar una respuesta efectora, en donde se incluye una actividad citotóxica y secreción de citocinas.

Se conocen una amplia familia de receptores activadores entre los que destacan, los receptores activadores con citotoxicidad natural (NCR), los receptores DNAM-1, algunos receptores de la familia KIR (Killer cell immunoglobulin-like receptors) y el receptor de lectina tipo C (NKG2D). Estos comparten un grupo de moléculas señalizadoras que contienen motivos activadores de tirosinas de inmunoreceptores (ITAMs), que, al ser inducidos, generan una cascada de fosforilación que finalmente activan a las NK y receptores de la familia SLAM [5].

Por otro lado, la célula NK también presenta receptores de inhibición en su superficie, los cuales atenúan las respuestas citotóxicas mediadas por las células NK. Entre los más estudiados se encuentran receptores de la familia KIR y receptores de lectina tipo C (NKG2A/B) estos poseen motivos inhibidores de tirosina de inmunoreceptores (ITIMs) en sus residuos citoplasmáticos.

Independientemente de los receptores que se involucren en la activación de las células NK, ésta sucede a través de una serie de eventos discretos en donde cada uno es regulado por un grupo de receptores y proteínas citosólicas. Esta serie de eventos secuenciales se describen como reconocimiento, polarización y degranulación.

1.3.2 Mecanismos Efectores

Para poder reconocer y establecer contactos con las células blanco, las células NK expresan receptores de superficie que regulan su adhesión a las células blanco y dependen de estas proteínas receptoras para distinguir una célula infectada de una normal. Todo esto dependerá del balance en la expresión e interacción con receptores inhibidores y receptores activadores. Los primeros reconocen una forma alélica específica de las moléculas de clase I del MHC (Major histocompatibility complex), que se expresa de modo constitutivo en todas las células normales, mientras que, los receptores activadores reconocen proteínas que se expresan *de novo* en respuesta a condiciones de estrés como las causadas por las infecciones virales y la transformación maligna de las células [5] [6].

Una vez que las células NK establecen un contacto con las células blanco se inicia una serie de eventos celulares en donde la célula NK se prepara para verter el contenido de sus gránulos líticos de manera focalizada y regulada.

El primero de estos eventos implica la reorganización de los gránulos, es decir, los gránulos se relocalizan en el citoplasma hacia el sitio cercano a la sinapsis inmunológica, en un evento conocido como polarización. El segundo evento es la fusión de la membrana que recubre los gránulos citotóxicos con la membrana plasmática, para que minutos después el contenido de los gránulos se libere hacia el espacio extracelular entre las dos células, en un evento conocido como degranulación. Ambos eventos están altamente coordinados altamente por una serie de proteínas que participan en el tráfico vesicular y son encargadas de regular el

movimiento de los gránulos citotóxicos hasta su destino final. El resultado de esto, es la formación de poros en la membrana de la célula blanco, lo que conlleva a muerte celular por un mecanismo que depende de la activación de caspasas (apoptosis) [6]. Además de perforinas y granzimas, los gránulos contienen TNF- β [6].

1.4 LINFOCITOS T

Los precursores de linfocitos T se originan en médula ósea, para posteriormente migrar al timo, en donde se lleva a cabo su desarrollo y maduración. Sólo el 5% de los linfocitos presentes en el timo permanecen viables para una adecuada respuesta inmune y pasan a la circulación hasta llegar a los órganos linfoides secundarios. Los linfocitos T pueden dividirse funcionalmente en células que proveen cooperación a otras células del sistema inmune y células que median actividad citotóxica. Las cooperadoras expresan el antígeno CD4 y las citotóxicas, el CD8. Las moléculas CD4 y CD8 tienen la función biológica de interactuar con la estructura molecular del complejo principal de histocompatibilidad clase II y clase I, respectivamente. Este proceso es vital durante la presentación antigénica y la posterior activación del sistema inmune.

1.4.1 Linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos TCD4⁺ pueden diferenciarse en diferentes subtipos según el patógeno y la respuesta inmunitaria que se esté desencadenando, por ejemplo, en el subtipo T_H1, que secretan IFN γ , regulan la defensa contra los microbios intracelulares, en linfocitos T_H2, que secretan IL-4 e IL-5, de tal manera que ayudan a las reacciones inmunitarias mediadas por la IgE e IgG1, así como a los eosinófilos y los mastocitos contra los helmintos, o también se pueden diferenciar en linfocitos T_H17, este subtipo de linfocitos favorecen la inflamación y promueven la defensa contra hongos y bacterias extracelulares [4]. Los linfocitos T efectores suelen vivir poco tiempo y mueren después de realizar su función. Cuando se elimina el antígeno, los estímulos que promueven la respuesta inmune disminuyen con el tiempo y mecanismos especiales de control pueden operar para limitar las respuestas efectoras. Por ejemplo, los linfocitos T_H1 y los macrófagos activados producen la IL-10, que inhibe la diferenciación de T_H1 y la activación de los macrófagos, de tal manera que esto ayuda a

disminuir la producción de los mismos linfocitos de tipo T_{H1} , evitando una producción descontrolada [4].

Las células T reguladoras (Treg) juegan un papel fundamental en el control de la respuesta inmune contra agentes infecciosos, proporcionando un equilibrio para activar los estímulos que destruyen a los patógenos sin causar daño al huésped. Sin embargo, en algunas infecciones virales persistentes el virus puede alterar la respuesta inmune induciendo una actividad Treg, que conduce a un punto de ajuste viral alto y facilita el establecimiento y mantenimiento de persistencia viral. En la infección por el EBV, este ha desarrollado un mecanismo de evasión en el que, en lugar de evitar su detección por linfocitos citotóxicos, lo que hace es alterar la respuesta inmune al estimular las células Treg que secretan IL-10, desactivando a los linfocitos T_{H1} , y de esta forma disminuir la respuesta inmune mediada por las Treg [7].

1.4.2 Linfocitos T CD8 citotóxicos

Los linfocitos T citotóxicos $CD8^+$ cumplen un papel central en la defensa inmunitaria, en particular contra células infectadas por virus, bacterias y protozoos; además, se ha demostrado su participación en la eliminación de algunas células que han sufrido algún tipo de transformación maligna y células con MHC I incompatible en trasplantes. Su función citotóxica se realiza a través de dos mecanismos básicos: citotoxicidad y liberación de citocinas.

De manera similar a las células NK, las células T $CD8^+$ emplean dos mecanismos, uno mediado por la exocitosis de gránulos líticos que contienen moléculas como perforina, la cual es capaz de insertarse en la membrana lipídica y formar poros, lo que resulta en el colapso de la membrana plasmática de la célula blanco y sirve de paso a otras moléculas de los gránulos líticos de la familia de las catepsinas, una de ellas la granzima B. Esto activa directamente la cascada de señalización de apoptosis mediada por caspasas. La expresión en la membrana del ligando FasL/CD95L en las células citotóxicas promueve otro mecanismo efector el cual induce el reconocimiento de su receptor Fas/CD95 presente en las células blanco, dando como resultado de este reconocimiento la apoptosis a través de la activación de la caspasa 8 en la célula blanco.

A pesar de las semejanzas en los mecanismos efectoros entre células NK y células T CD8⁺ citotóxicas, existen diferencias en los mecanismos de activación. Por una parte, en células T citotóxicas, el proceso de degranulación es iniciado por el reconocimiento de un antígeno a través del receptor de células T, mientras que en las células NK, es el resultado del equilibrio de distintas señales intracelulares que surgen de diferentes receptores de superficie en la célula blanco y la NK, los cuales interactúan creando una sinergia entre ellos mismos, dando pauta a una activación o inhibición de la respuesta efectora de las células NK. Por otro lado, las células T CD8⁺ requieren de entre 5 y 8 días después del reconocimiento de antígeno en los tejidos linfoides secundarios para diferenciarse en linfocitos T citotóxicos (CTLs), proliferar y migrar a los sitios de infección. Durante este tiempo, enzimas líticas como la granzima y la perforina, son sintetizadas y almacenadas en gránulos citotóxicos. Por su parte, las células NK poseen ya en condiciones basales, toda la maquinaria citotóxica lista para iniciar el proceso de degranulación [8].

1.4.3 Mecanismos de activación de las células T citotóxicas

La respuesta específica de las células T CD8⁺ contra un patógeno se inicia a través del reconocimiento de antígenos presentados por moléculas MHC I y señales coestimuladoras. Los linfocitos T responden únicamente ante antígenos proteicos unidos a proteínas de superficie de otras células que presentan el antígeno a este linfocito. Estos antígenos proteicos deben ser procesados, y convertidos en fragmentos peptídicos, que después son presentados en unión con el MHC I y reconocidos por el linfocito T CD8⁺. El reconocimiento del antígeno, se realiza mediante el receptor de células T (TCR por sus siglas en inglés), junto con otras proteínas transmembranales que se asocian no covalentemente al heterodímero alfa-beta, formando el llamado “Complejo TCR Funcional”. Estas proteínas se denominan complejo CD3 e incluyen a miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas de alta homología [6]. Además de estas proteínas asociadas al complejo TCR, se requiere de otras moléculas, coestimuladoras, especialmente miembros de la familia B7, que provienen de las APC (Antigen Presenting Cell) y que interactúan con algunas moléculas de superficie del linfocito T, principalmente con CD28, todo este conjunto de moléculas induce la activación del linfocito T CD8⁺ contra un antígeno.

1.4.4 Mecanismos efectores

Los linfocitos T citotóxicos, al igual que las células NK, llevan a la eliminación de la célula diana a través de una serie de eventos discretos, iniciando con una adhesión estrecha entre la célula blanco y la célula efectora, la polarización de la célula efectora y la liberación de sustancias almacenadas en gránulos preformados dentro de esta misma. Estos gránulos contienen proteínas, como la perforina, que generan poros a través de la membrana de la célula diana, lo cual permite el paso de agua y electrolitos, induciendo lisis osmótica. También estos gránulos son ricos en granzimas, que ingresan a la célula a través de los poros formados en la membrana de la célula diana, desencadenando la muerte celular mediante la fragmentación del DNA de la célula diana, mediante el mecanismo de apoptosis. Los linfocitos TCD8⁺ activados producen citocinas, como el IFN γ , que actúa sobre ellos mismos para aumentar su citotoxicidad, y sobre otras células NKs, macrófagos y neutrófilos, para amplificar la respuesta [8].

1.5 INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son errores congénitos que afectan al sistema inmunitario, y tienen la característica que causan una susceptibilidad anormal a las infecciones por microbios, así como al desarrollo de enfermedades autoinmunes, alergias, síndromes autoinflamatorios y mayor predisposición a ciertos tipos de cáncer. Si bien la mayoría de las manifestaciones patológicas se presentan durante la infancia, estos trastornos no son exclusivos de esta edad y también pueden presentarse en edad adulta.

En los humanos, las inmunodeficiencias primarias (IDPs) comprenden alrededor de 480 trastornos con defectos genéticos diferentes, que de acuerdo al Comité de Clasificación de Inmunodeficiencias Primarias de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS), se dividen en diez grupos dependiendo de su fenotipo clínico y características inmunológicas (Tabla 1) [1], [9], [10].

Tabla 1. Clasificación de las inmunodeficiencias primarias según el IUIS

1.	Inmunodeficiencias combinadas
2.	Síndromes con inmunodeficiencias
3.	Deficiencias predominantemente de anticuerpos
4.	Enfermedades de desregulación inmune
5.	Defectos congénitos de fagocitos: número o función
6.	Defectos en la inmunidad innata
7.	Trastornos autoinflamatorios
8.	Defectos en el sistema del complemento
9.	Fenocopias de inmunodeficiencias primarias
10.	Síndromes de falla medular

Estudios recientes han demostrado que las IDPs pueden ser más comunes de lo que se había descrito previamente y que hasta un 1-2% de la población puede verse afectada cuando se consideran todos los tipos y variantes [11]. Sin embargo, independientemente de la causa genética, la mayoría de los trastornos implican una mayor susceptibilidad a infecciones por microbios, inflamación sistémica, autoinmunidad, alergia y/o malignidad, por lo que, el diagnóstico correcto y oportuno representa un reto para los médicos [11].

1.6 GENES AFECTADOS POR UNA DESREGULACIÓN INMUNE QUE OCASIONAN UNA INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA CON SUSCEPTIBILIDAD ANORMAL AL EBV.

Las inmunodeficiencias primarias con susceptibilidad anormal al EBV son causadas por variantes patogénicas de un conjunto de genes, lo cual conlleva a una ausencia en la expresión de la proteína o a una función anormal de la misma. Esto a su vez causa un mal funcionamiento en las células citotóxicas, lo que en última instancia conlleva a una respuesta inmune desregulada. En la siguiente Tabla 2 se muestran algunos genes cuyas mutaciones resultan en una susceptibilidad anormal a infecciones por EBV.

Tabla 2. Afecciones genéticas que ocasionan una susceptibilidad anormal al EBV.

Gen Mutado	Proceso Afectado	Tipo de Herencia	Defectos de células NK/NKT	Defecto en células T	Defecto en células B	Virus Involucrados	Síntomas Clínicos
<i>PRF1</i>	Lisis mediada por células Citotóxicas	Autosómico Recesivo	Defectuoso	CTL defectuosos	Ninguna	EBV HCMV	HLH
<i>UNC13D</i>	Liberación de gránulos citotóxicos	Autosómico recesivo	Defectuoso	CTL defectuosos	Ninguna	EBV HCMV	HLH
<i>STX11</i>	Liberación de gránulos citotóxicos	Autosómico recesivo	Defectuoso	CTL defectuosos	Ninguna	EBV HCMV	HLH
<i>SH2D1A</i>	Señalización y adhesión de células T y NK	Ligado al cromosoma X	Activación defectuosa, NKT ausentes	CTL defectuosos	Memoria reducida	EBV	HLH
<i>STXBP2</i>	Liberación de gránulos citotóxicos	Autosómico recesivo	Defectuoso	CTL defectuosos	Ninguna	EBV HCMV	HLH
<i>BIRC4</i>	Inhibidor de la apoptosis, activador de NFκB	Ligado al cromosoma X	NKT podrían estar ausentes	Ninguno	Memoria reducida	EBV	HLH
<i>MAGT1</i>	Transportador de Mg ²⁺ , señalización del TCR, expresión de NKG2D	Ligado al cromosoma X	Activación de células NK defectuosas	CTL defectuosos	Memoria reducida	EBV	Linfoma de células B
<i>ITK</i>	Señalización del TCR	Autosómico recesivo	NKT disminuidas	Linfopenia crónica de células T	Ninguna	EBV	Linfoma de células B
<i>CD70</i>	Ligando CD27	Autosómico recesivo	NKT disminuidas	CTL reducidos	Memoria reducida	EBV HCMV	Linfoma de células B y Linfo-proliferación
<i>CORO1A</i>	Liberación de la proteína de unión actina de las células T del timo	Autosómico recesivo	NKT disminuidas	Células TCD4+ y TCD8+ disminuidas	Disgamma-globulinemia	EBV	Linfo-proliferación de células B
<i>RAB27A</i>	Receptor de quimiocinas	Autosómico recesivo	Actividad reducida	Reducido	Ninguna	EBV HCMV	HLH
<i>PIK3CD</i>	Señalización de las vías AKT-Mtor, metabolismo	Autosómica dominante	Activación dependiente, NKG2D defectuosa	Reducción de células TCD4+, Células TCD8+ senescentes	Memoria reducida Disgamma-globulinemia	EBV HCMV	Linfoma de células B y CAEBV
<i>CD16</i>	Señalización mediada por CD16	Autosómico recesivo	Activación dependiente de CD16 defectuosa	Ninguna	Ninguna	EBV	CAEBV y linfo-proliferación de células B
<i>LYST</i>	Trafico lisosomal	Autosómico recesivo	Actividad de células NK dañada	Actividad de CTL dañada	Ninguna	EBV	HLH, Linfo-proliferación
<i>WAS</i>	Proteína de reordenamiento del citoesqueleto rio abajo de CDC42	Ligado al cromosoma X	Actividad Reducida	Reducido	Reducido	EBV HCMV KSHV	HLH, Linfomas de células B, KS,
<i>ZAP70</i>	Cinasa que participa en la	Autosómico recesivo	Ninguno	Defecto en TCD4+	Reducido	EBV	Linfoma de células B

	señalización del TCR						
<i>CD27</i>	Señalización TNFR en células T y B de memoria	Autosómico recesivo	Disminución en NKT	Ninguna	Memoria reducida	EBV	HLH
<i>CTPS1</i>	Biosíntesis de fosfolípidos y ácidos nucleicos	Autosómico recesivo	Ausencia de iNKT	Reducción de células TCD4+	Memoria reducida y Disgamma-globulinemia	EBV	Reactivación recurrente de linfomas
<i>MST1</i>	Proteína proapoptótica, Serin/Treonincinasa	Autosómico recesivo	ninguna	Reducción de células TCD4+	Reducido	EBV HHV6	Linfoma de células B y Linfoproliferación
<i>RASGRP1</i>	Señalización MAPK, dinámica de la actina y del citoesqueleto, citotoxicidad de NKs	Autosómico recesivo	Actividad de células iNK y NK disminuida	Reducción de células TCD4+	Memoria reducida y Disgamma-globulinemia	EBV, CMV	Linfoma de células B y Linfoproliferación
<i>AP3B1</i>	Complejo de proteínas relacionado con el adaptador 3 Subunidad Beta 1	Autosómico recesivo	Actividad de células NK disminuida	CTL reducidos	Ninguna	EBV	HLH
<i>AP3D1</i>	Complejo proteico relacionado con el adaptador 3 Subunidad Delta 1	Autosómico recesivo	Actividad de células NK disminuida	CTL reducidos	Ninguna	EBV	HLH

Fuente: Tomado y modificado de Cruz-Muñoz and Fuentes Pananá (2018) [12].

De manera general, dos de las principales manifestaciones clínicas que se desprenden de una respuesta inmune anormal en contra de EBV son la linfocitosis hemofagocítica y los síndromes linfoproliferativos.

1.7 PATOLOGIAS OCASIONADAS POR UNA RESPUESTA INMUNE ANORMAL AL EBV

1.7.1 Linfocitosis Hemofagocítica (HLH)

Como ya se ha mencionado anteriormente, una de las manifestaciones clínicas que ocasiona una Inmunodeficiencia primaria con susceptibilidad al virus Epstein-Barr, es la linfocitosis hemofagocítica, el cual se caracteriza por una fiebre alta asociada con hepatoesplenomegalia y signos neurológicos que van desde confusión y convulsiones hasta coma. La HLH es el resultado de una respuesta inmune anormal y descontrolada que implica la expansión y activación continua de células TCD8⁺, histiocitos y macrófagos responsables de la fagocitosis de las células sanguíneas [13]. Esta activación continua de células T citotóxicas y macrófagos resultan en una producción descontrolada de grandes cantidades de

citocinas inflamatorias como la IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ y TNF- α , lo cual desencadena necrosis celular en los órganos infiltrados e insuficiencia orgánica, afectando la actividad citotóxica de los linfocitos y resultando en los signos clínicos de la HLH [14]. En la Figura 1, se representa la fisiopatología de la HLH, en un sujeto sano y en un sujeto normal.

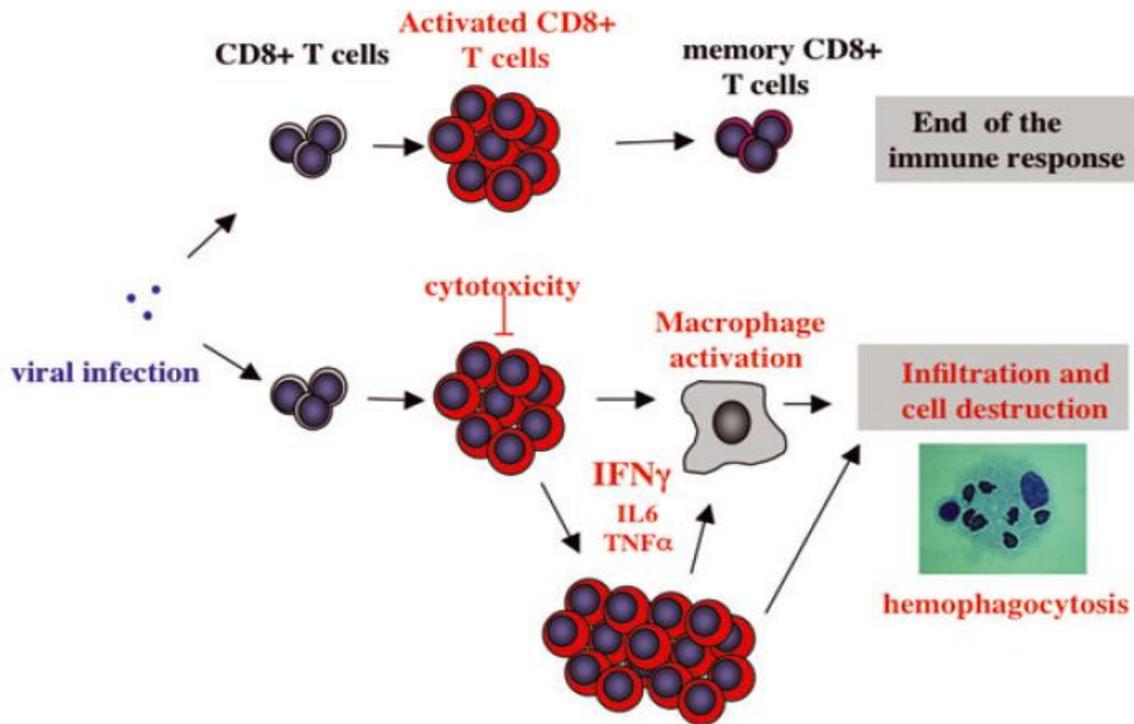


Figura 1. Fisiopatología de HLH en un sujeto sano y en un sujeto con una infección viral. Fuente: Tomado de Saint Basile et al. (2011).

En humanos se han identificado varios errores genéticos que causan esta predisposición a la enfermedad causada por una infección de EBV. entre estos tenemos a mutaciones en el gen *PRF1* que tiene como función principal el mecanismo de la creación de poros en la membrana de la célula diana, lo cual es fundamental en el proceso de citotoxicidad mediada por gránulos líticos de las células citotóxicas, lo cual da inicio a la lisis celular.

Por otro lado, los genes: *UNC13D*, *STX11* y *STXBP2* son responsables de la Linfohistiocitosis Hemofagocítica Familiar (FHL) y codifican para proteínas que están involucrados en la regulación de la exocitosis normal de los gránulos líticos de las células NKs y TCD8⁺. En pacientes con mutaciones en estos genes, el contenido de estos gránulos no se libera en la sinapsis inmunológica y las células diana no pueden ser destruidas.

El desarrollo de HLH también está asociado a síndromes de hipopigmentación en donde los genes implicados son *RAB27A* y *LYST*, los cuales codifican para proteínas que regulan el tráfico vesicular y la fusión de los gránulos citotóxicos a la membrana plasmática. La consecuencia de estas mutaciones es la presencia de defectos severos en la capacidad de desgranulación de células T y NK. Las mutaciones genéticas en *RAB27A* y *LYST* son responsables de síndrome de Gricelli y del síndrome de Chediak-Higashi respectivamente.

1.7.2 Síndromes Linfoproliferativos ligados al cromosoma X

El síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP), es una inmunodeficiencia hereditaria rara con una incidencia de 1 a 2 casos por millón de nacidos vivos varones. XLP se caracteriza principalmente por una triada clave de síntomas que incluyen, una susceptibilidad extrema a la infección por EBV (que conduce a una mononucleosis infecciosa fulminante con las características de la HLH), disgamaglobulinemia y linfomas [15].

Los XLP son una de las manifestaciones patológicas que resultan de una susceptibilidad anormal al EBV, impactando en la función normal de las células citotóxicas del sistema inmune. Se conoce que las mutaciones en los genes *SH2D1A* y *BIRC4* que codifican para las proteínas SAP (Proteína asociada a SLAM) y XIAP (Inhibidor de la deficiencia de la proteína de apoptosis ligada al cromosoma X), respectivamente, son las causantes de desencadenar el XLP-1 y XLP-2. La proteína SAP es un componente importante de las vías de señalización que involucran a los receptores de la familia SLAM en las células T y NKs. Por otro lado, XIAP es un inhibidor de la apoptosis y está involucrado en la activación de la vía de señalización NFκB.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las inmunodeficiencias primarias son errores congénitos del sistema inmune que resultan en más de 480 fenotipos, los cuales no solo predisponen a infecciones de manera recurrente sino también a otros tipos de padecimientos, como inflamación sistémica y crónica, autoinmunidad, hipersensibilidad y cáncer. Por lo anterior, las inmunodeficiencias primarias están asociadas con un alto nivel de morbilidad y mortalidad y constituyen un importante problema de salud pública en México y en el mundo.

En los últimos años se ha documentado una serie de errores monogénicos de la respuesta inmune que confieren un mayor riesgo de desarrollar una susceptibilidad anormal a infecciones, por ejemplo, las asociadas con la infección por EBV, la cual ocurre dentro de una actividad inflamatoria incrementada y una actividad deficiente de las poblaciones linfoides. En este escenario, para comprender mejor los mecanismos por los cuales estos errores congénitos conllevan a un desarrollo y/o función anormal de las poblaciones linfoides, especialmente de linfocitos T y células NK, es necesario generar estrategias de evaluación, que nos permitan identificar sus componentes, así como conocer sus modos de acción, los cuales son determinantes para controlar la infección por el EBV.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los genes asociados a una susceptibilidad anormal a EBV en la población infantil mexicana y cómo estas influyen en las funciones efectoras de los linfocitos citotóxicos?

4. JUSTIFICACIÓN

Entre otras funciones, los linfocitos T y NK juegan un papel central como armas efectoras de la respuesta inmune contra infecciones virales, por lo que el estudio de las inmunodeficiencias primarias que conllevan a una susceptibilidad anormal a infecciones por EBV resulta importante para identificar elementos centrales que regulan los mecanismos efectores de los linfocitos T y células NK, así como conocer sus modos de acción. Este estudio se centrará esencialmente en conocer cómo distintos errores genéticos, que confieren una susceptibilidad anormal a infecciones por EBV afectando el fenotipo y la función

efectora de los linfocitos T y células NK, así como analizar las características genéticas y moleculares que causan esta predisposición anormal.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar las alteraciones genéticas y su impacto sobre la función de linfocitos T y células NK en pacientes con susceptibilidad anormal al EBV.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar por secuenciación masiva las posibles causas genéticas que confieren susceptibilidad anormal al EBV
2. Evaluar la respuesta efectora citotóxica en células T CD8+ y células NKs.
3. Evaluar la respuesta proliferativa de células T

6. HIPÓTESIS

Las entidades genéticas en la población infantil mexicana, asociada con una susceptibilidad anormal a EBV son altamente heterogéneas y podría representar un reservorio de nuevos genes, nuevas mutaciones o genes distintos a los clásicos asociados en desencadenar HLH, impactando diferencialmente sobre eventos discretos que regulan las funciones efectoras de los linfocitos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio descriptivo transversal: Evaluamos a 5 pacientes pediátricos que presentaban susceptibilidad anormal al EBV. Los pacientes presentaban diagnóstico y datos clínicos referidos del médico tratante.

Población de estudio

El ámbito de reclutamiento fue la unidad de Inmunodeficiencias Primarias del Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México. Se incluyeron 5 pacientes pediátricos que provenían de diferentes estados de la república. Cada uno de estos pacientes cumplía con los criterios de selección que se describen en el siguiente apartado. Todos los pacientes y familiares dieron su consentimiento y/o asentimiento para participar en el estudio.

7.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión

Se analizaron 5 pacientes de entre 0 meses y 18 años de edad provenientes de diferentes centros de salud y hospitales de la república mexicana, que aceptaron participar en el estudio por consentimiento informado y/o asentimiento informado, y que presentara los siguientes criterios de inclusión:

- I. Evidencia de infección activa por EBV demostrada por RT-qPCR.
- II. Cualquiera de las siguientes manifestaciones clínicas: Mononucleosis infecciosa de difícil resolución y tratamiento, Infección activa crónica (asintomática con persistencia serológica o carga de EBV) y/o Hemofagocitosis linfohistiocitaria.

Criterios de exclusión:

Pacientes con diagnóstico de enfermedades autoinmunes bien definidas y/o pacientes con alguna inmunodeficiencia adquirida.

7.2 METODOLOGÍA

Secuenciación masiva de exoma

La secuenciación de exoma completo (WES) se realizó con la plataforma Illumina HiSeq (Admera Health, New Jersey; Psomagen, Inc, Maryland), que proporciona una alta uniformidad en la cobertura con más del 90% de los datos de la biblioteca IDT Xgen, genoma humano versión 38, con un promedio de 50-100X de profundidad mínima de lectura.

Los datos crudos fueron procesados y analizados en el Instituto Nacional de Pediatría usando Galaxy in the cloud para control de calidad, recorte, alineación con el genoma, filtrado de duplicados de PCR, detección y anotación de variantes; así como Variant effect predictor de Ensembl para anotar, curar y filtrar las variantes por frecuencia y consecuencias; e Integrative Genomic Viewer (Broad Institute) para visualizar cobertura, profundidad y variantes. Se priorizaron variantes extremadamente raras (menores a 1 en 1,000 en bases de datos poblacionales como gnomADe o novedosas) y de impacto moderado a alto (nonsense, frameshift, o missense con parámetros de patogenicidad CADD, SIFT, PolyPhen), en genes conocidos causantes de inmunodeficiencia y susceptibilidad a EBV, o genes involucrados en el sistema inmunitario.

Células: Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron mediante separación por Ficoll-Paque™ Premium, con este procedimiento los eritrocitos y granulocitos quedaron en el fondo del tubo, mientras que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) permanecieron en la fase intermedia entre el Ficoll y el sobrenadante que contiene las plaquetas y el suero diluido con PBS 1X [16]. Posteriormente se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ en medio RPMI enriquecido con suero fetal bovino (FBS) inactivado al 5%, L-glutamina, estreptomycin y penicilina (Gibco™), y 2-Mercaptoetanol (Gibco™) 1X. El conteo de células se realizó en cámara de Neubauer, utilizando azul de tripano (Trypan blue solution, 0.4%, Gibco™) como colorante de viabilidad.

Extracción de ADN y Amplificación de genes de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa para secuenciación.

A partir de muestras de sangre con anticoagulante EDTA de los pacientes, se realizaron extracciones de DNA genómico, utilizando el kit “Blood DNA isolation mini kit (NORGEN Biotek Corp)”, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente el DNA extraído se analizó en el BioDrop para obtener la cuantificación y pureza de cada muestra. De la misma forma a partir de cada una de las muestras de DNA se verificó la integridad mediante corrimiento electroforético, en geles de agarosa al 1.2% con buffer TAE 1X por 60 min a 100 Volts. Posteriormente, los geles fueron revelados en una solución de bromuro de etidio 1X. Las bandas se visualizaron en un sistema de fotodocumentación, en donde se observaron bandas propias del DNA genómico.

A partir del DNA extraído de las muestras de sangre de los pacientes y familiares, se amplificó el DNA utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación del fragmento de interés se llevó a cabo mediante el protocolo de reacción de la enzima Amplificasa de Biotecmol y usando el termociclador Thermal cycler de BioRad. Para todas las amplificaciones se utilizó una concentración de oligonucleótidos de 10 μ M, y una concentración de 50 ng/ μ L de ADN.

Análisis de proteínas por Western blot

Las células PBMC del paciente 1, un control sano y la línea celular YTS (línea celular derivadas de leucemias de células NK humanas) (5×10^6) se lisaron con buffer de lisis TNE-T (1M Tris base pH 7.5, 0.5 M EDTA pH 8.5, 100 mM NaCl y 0.5% Tween 20) más inhibidores de proteasas (Complete ULTRA Tablets, Mini, EASY pack-roche Life Science). Los lisados totales se corrieron en geles de poliacrilamida al 8%. Posteriormente, se transfirieron a membranas de Immobilon (Millipore), las cuales se incubaron con el anticuerpo para *COROIA* (anticuerpo policlonal anti rabbit) a una dilución de 1:2000, seguido del anticuerpo secundario correspondiente IgG anti rabbit a una dilución 1:2000. El método de detección fue por quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

Líneas Celulares

La línea celular P815 (línea celular mastocítica de ratón) y K562 (línea celular de leucemia mielógena humana) se utilizaron como células blanco en los ensayos de degranulación. Las células se mantuvieron a 37°C, 5% de CO₂ en medio RPMI enriquecido con suero fetal bovino (FBS) inactivado al 5%, L-glutamina, estreptomicina y penicilina (Gibco™), y 2-Mercaptoetanol (Gibco™) 1X.

Debido al mecanismo de citotoxicidad dependiente de anticuerpo que lleva a cabo la línea celular P815, esta fue estimulada con anticuerpos específicos anti-CD3 previamente a los ensayos de degranulación.

Ensayos de degranulación en la expresión del marcador CD107a

Las funciones de las células NK y linfocitos T, se evaluaron por ensayos de degranulación. Se utilizó la línea celular P815 como células blanco para estos ensayos.

Para el ensayo de degranulación, las células efectoras NKs y T CD8⁺ se incubaron con células P815 + antiCD3 en placas de 96 pozos por un tiempo de 3 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, las células fueron marcadas con un cocktail de anticuerpos monoclonales (mAb): anti-CD3, anti-CD8, anti-CD56 y anti-CD107a. La mezcla se incubó por un tiempo adicional de 30 min a 4 grados centígrados en la oscuridad. Finalmente, las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo (BD FACSCantoII®) utilizando diferentes estrategias de adquisición. Con base en la expresión de CD107a en la superficie celular, estos ensayos nos permitieron conocer el estado funcional de células citotóxicas (NK y T CD8⁺).

Ensayo de proliferación.

Para determinar el estado funcional de los linfocitos T, las PBMC se marcaron con una sonda fluorescente (CFSE) y se estimularon con anticuerpos agonistas dirigidos contra CD3 y/o CD28 y PHA. Después de 72 horas, las células se marcaron con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 y se adquirieron mediante citometría de flujo, utilizando diferentes estrategias de adquisición.

8. RESULTADOS

PACIENTE 1

REPORTE DE CASO

Se trata de un paciente masculino de 7 años de edad con un hermano menor sano, de padres no consanguíneos. A los 2.8 años de edad comenzó con gastroenteritis, dolor abdominal, vómito de contenido gastroalimentario, petequias, fiebre y episodios recurrentes de neumonía y crisis convulsiva. El paciente fue referido al Hospital Infantil de México, Federico Gómez, en donde se le diagnostica adenomegalias, acolia y hepatoesplenomegalia. Se le realizó aspirado de médula ósea y punción lumbar que refería infiltración de SNC. Se detectó EBV en líquido cefalorraquídeo. Se dio diagnóstico final de linfocitosis hemofagocítica con asociación a EBV con infiltración a sistema nervioso central. Los estudios inmunológicos revelaron un aumento significativo en el número de células TCD3⁺ y TCD8⁺. Además, se encontró un elevado número de copias para el EBV mediante PCR. Los estudios representativos del paciente se muestran en la Tabla 3. Estos hallazgos clínicos e inmunológicos sugieren una asociación con mutaciones en genes que causan susceptibilidad anormal al EBV.

Tabla 3. Estudios representativos del paciente 1

Población de linfocitos	Resultados		Valor de referencia
CD3+	74.68%	23338 cel/mm ³	865-2465 cel/mm ³
CD4+	31.10%	1060 cel/mm ³	457-1536 cells/mm ³
CD8+	34.12%	1060 cel/mm ³	280-1189 cells/mm ³
CD19+	20.47%	584.45 cel/mm ³	1400 cells/mm ³)
CD20+	20.37%	581.60 cel/mm ³	1400 cells/mm ³)
CD16+	1.62%	46.03 cel/mm ³	400 cells/mm ³)
CD56+	1.04%	29.55 cel/mm ³	400 cells/mm ³)
Inmunoglobulinas (mg/dl)	Resultados		Valor de referencia
IgM	4.5	Indetectable	21.4-108.5 mg/dL
IgG	975		230-808 mg/dL
IgA	1.4	Indetectable	10-49.8 mg/dL
IgE	0.1	Indetectable	0-29 UI ⁷ /ml
PCR (copias/mL)	Resultados		Valor de referencia
EBV PCR	1,115,000 copias/mL		<200 copias/mL

Identificación de mutaciones en *CORO1A*.

Con el fin de evaluar si las manifestaciones clínicas e inmunológicas observadas en este paciente se debían a una mutación ocasionada en algún gen que ocasiona susceptibilidad al EBV. Primero se realizó una secuenciación de exoma completo en donde los resultados mostraron dos mutaciones en el gen *CORO1A*, que estudios previos han relacionado con el desarrollo de Inmunodeficiencias primarias que causan susceptibilidad anormal al EBV [17][18].

Una de las mutaciones encontradas, se identificó en el exón 5 en la ubicación c.596 A>G y la otra mutación en el intrón 8 ubicada en la posición c.1008-31 G>A. Con el propósito de corroborar estas nuevas mutaciones en la secuencia del gen *CORO1A*, se amplificaron fragmentos del exón 5 y el intrón 8 del gen *CORO1A* utilizando ADNg del paciente 1 y de los familiares.

El patrón de las bandas amplificadas del paciente 1 y sus familiares se muestra en la Figura 2a), donde se observa un fragmento de 475pb, que es el tamaño del amplicón esperado para el Intrón 8 y de 270pb para el amplicón del exón 5 mostrado en la Figura 2b). Posteriormente, las bandas amplificadas se purificaron utilizando el kit favorprep GEL/PCR purification mini kit de FAVORGEN siguiendo las instrucciones del fabricante y se enviaron a secuenciar por el método de Sanger.

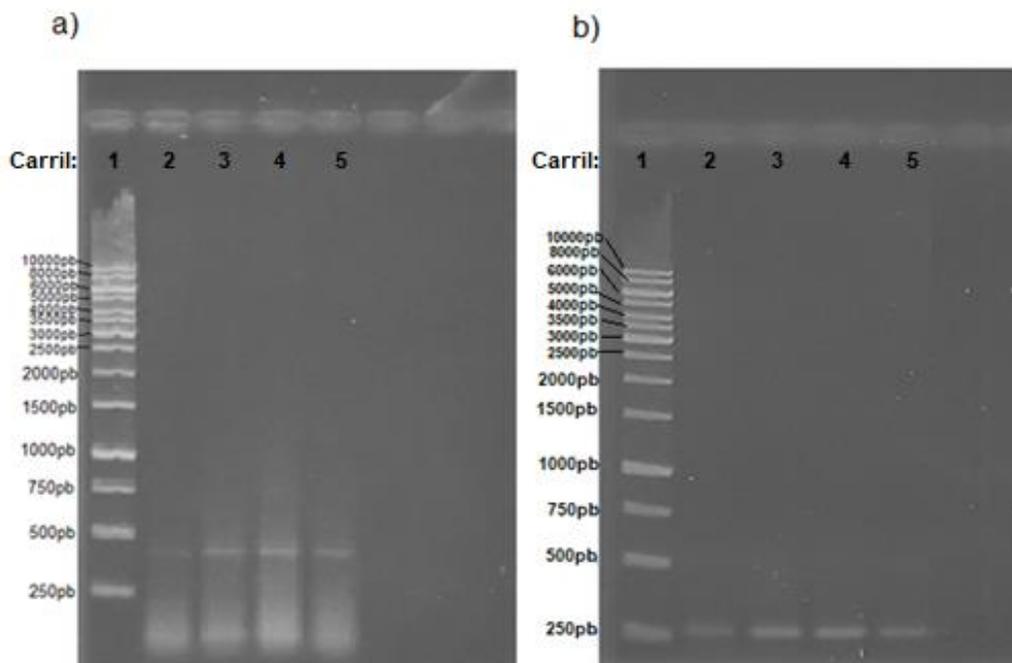


Figura 2. Análisis electroforético. Corrimiento electroforético de los productos de PCR punto final, para la amplificación de un fragmento del gen *CORO1A*, usando como molde DNA genómico del paciente 1 y sus familiares. a) amplicones para el Intrón 8 del gen *CORO1A* de un tamaño de 475pb. Carril 1: Marcador de peso. Carril 2: Amplicón del Paciente 1, Carril 3: Familiar 1, Carril 4: Familiar 2 y Carril 5: Familiar 3. b) amplicones para el exón 5 del gen *CORO1A* de un tamaño de 270 pb. Carril 1: Marcador de peso. Carril 2: Amplicón del Paciente 1, Carril 3: Familiar 1, Carril 4: Familiar 2 y Carril 5: Familiar 3. Corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.2% en TAE 1X.

El electroferograma obtenido de la secuenciación de Sanger (Figura 3) mostró una mutación heterocigota del gen *CORO1A* en el exón 5 en donde existe un cambio de una adenina por una guanina (c.596 A>G). Esta mutación sólo se encontró en el paciente y en la madre. Por otro lado, la mutación encontrada en el intrón 8 (Figura 4), indica un cambio de guanina por adenina (c.1008-31 G>A), esta mutación intrónica se encontró tanto en el paciente como en los familiares.

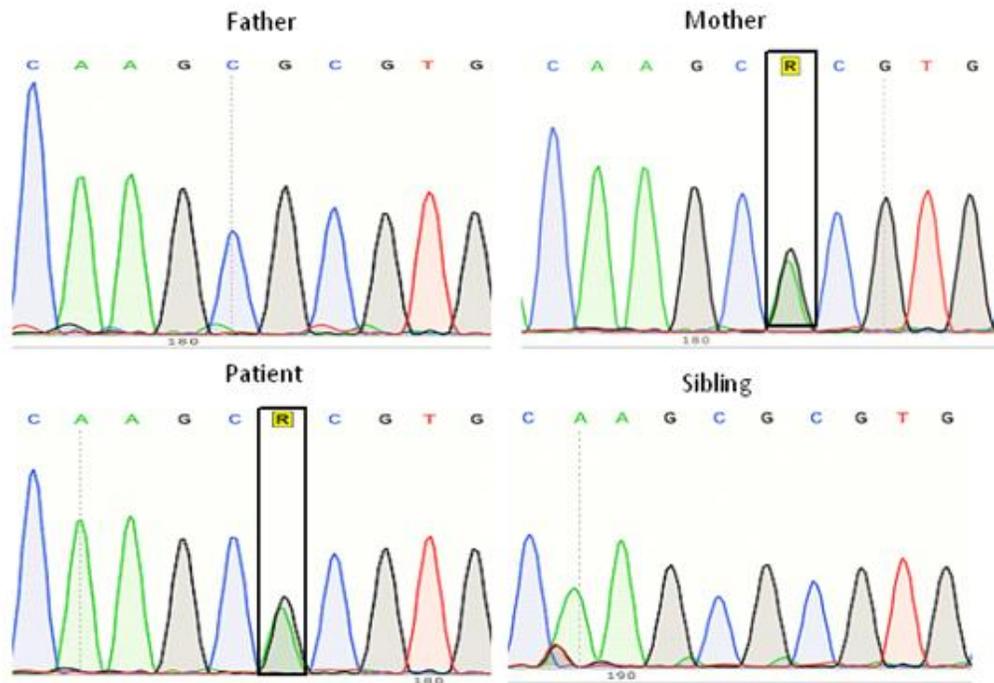


Figura 3. Electroferogramas obtenidos mediante secuenciación de Sanger para las mutaciones en el exón 5 del gen CORO1A en el paciente 1 y sus familiares. Esta mutación se localizó en la posición c.596 A>G (R199H).

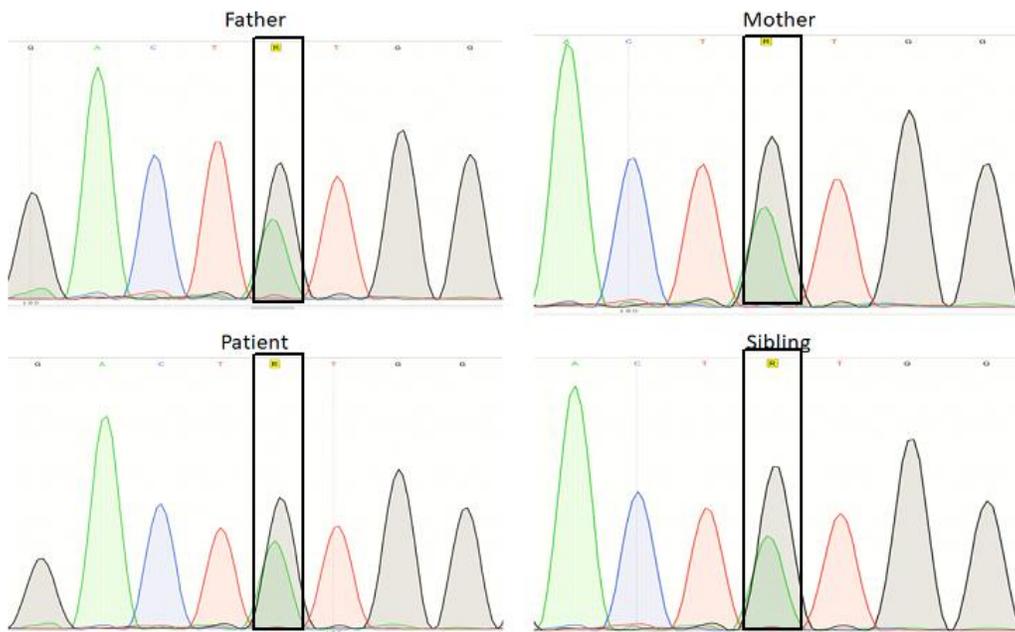


Figura 4. Electroferogramas obtenidos mediante secuenciación de Sanger para las mutaciones en el intrón 8 del gen CORO1A en el paciente 1 y sus familiares, la mutación se ubica en la posición c.1008-31 (G>A).

En la Figura 5, se presenta la segregación familiar de los alelos para la mutación en el gen *CORO1A* del exón 5 y del intrón 8. En el inciso a) se muestra la heterocigosis de la mutación encontrada en la madre y el paciente, mientras que, en el inciso b) se muestra la heterocigosis encontrada en el paciente y en los familiares.

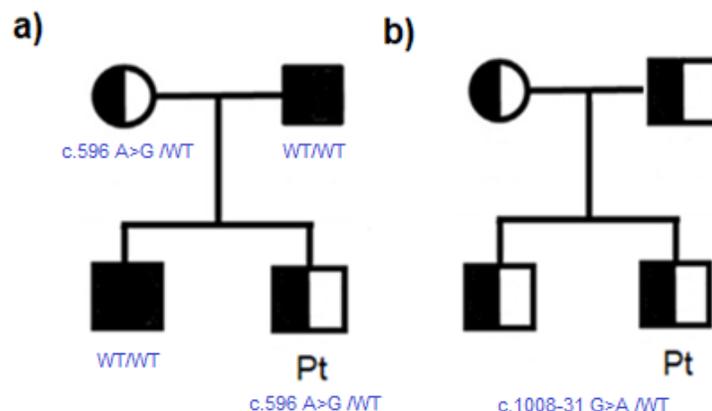


Figura 5. Segregación familiar del paciente 1, de las mutaciones encontradas en el gen *CORO1A* en el exón 5 e intrón 8 a) Segregación familiar de la mutación heterocigota del exón 5 en el gen *CORO1A*. b) Segregación familiar de la mutación del intrón 8 en el gen *CORO1A*.

Análisis de la expresión de la proteína CORONINA1A en las PBMC del paciente 1 mediante Western blot.

Para evaluar si las mutaciones identificadas en el gen *CORO1A*, influyen sobre la expresión de la proteína, se evaluó mediante la técnica de Western blot la presencia de la proteína en PBMCs del paciente. Los lisados se analizaron por SDS-PAGE como se describe en Materiales y Métodos.

En la Figura 6, se presenta la inmunotransferencia realizada para la proteína CORONINA1A. Nuestros resultados mostraron que la expresión de esta proteína no se vió afectada en el paciente al compararse con los controles, lo que indica que las mutaciones encontradas en el gen no influyen en la expresión anormal para la proteína CORONINA1A.

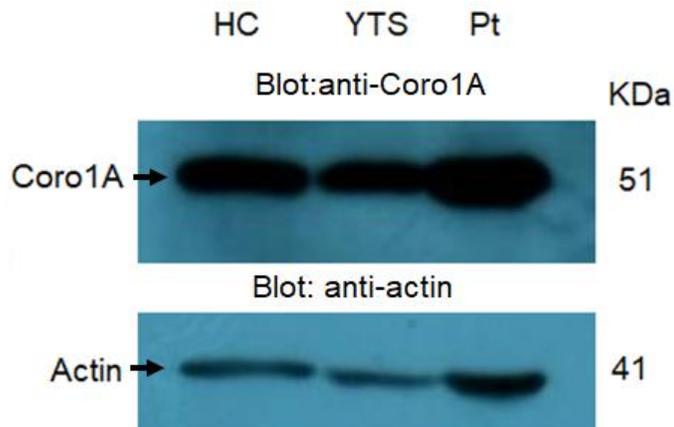


Figura 6. Análisis de la expresión de la proteína CORONINA1A en las PBMCs del paciente 1, un control sano y la línea celular YTS mediante Western blot. HC: control sano, YTS: línea celular derivada de células NKs, Pt: paciente 1. Teniendo como control de carga la expresión de la proteína Actina.

Ensayos de degranulación en la expresión del marcador CD107a.

Posteriormente, con el objetivo de evaluar si las mutaciones coincidían con una deficiencia en capacidad citotóxica de las células del paciente, se realizó un ensayo de degranulación en células TCD8⁺ activadas con IL-2 y PHA durante 72 horas (Figura 7). Se utilizó como células blanco la línea celular P815 + antiCD3 para el diagnóstico diferencial de un posible caso de degranulación anormal debido a la mutación del gen *CORO1A*, analizando la expresión del marcador CD107a. Como se observa en la Figura 7, se obtuvieron valores de Δ CD107a para el paciente de 10.91, en base a los valores de referencia utilizados en el laboratorio de inmunología molecular, concluimos que la degranulación no puede ser considerada anormal.

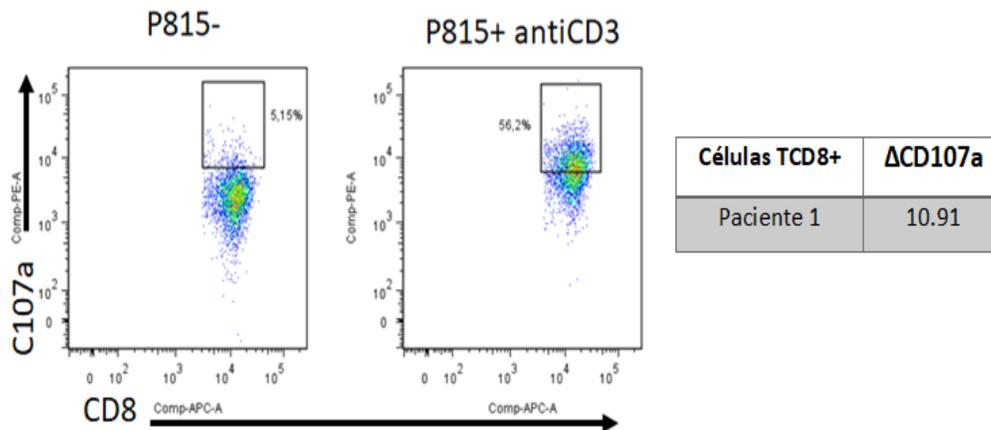


Figura 7. Ensayo de degranulación en células TCD8⁺ del paciente 1 contra células blanco P815, evaluando la expresión del marcador CD107a.

Subpoblaciones de linfocitos T

Las células T que recirculan en la periferia se distribuyen en 5 subpoblaciones (Figura 8): células T naive (N; fenotipo CCR7⁺/CD45RA⁺), células T de memoria central (CM: CCR7⁺/CD45RA⁻), células T de memoria efectora (EM: CCR7⁻/CD45RA⁻) y células T de memoria efectora RA⁺ (EMRA⁺: CCR7⁻/CD45RA⁺) [19].

Por otro lado, se evaluaron las diferentes subpoblaciones de células T del paciente y de un control sano, utilizando los marcadores CD45RA y CCR7. Estos resultados indican que el paciente tenía una expresión visiblemente mayor comparado con el control en la subpoblación en sus células de memoria efectora (CCR7⁻CD45RA⁻) y en las células T de memoria efectora RA⁺ (CCR7⁻CD45RA⁺). Por el contrario, en las células T naive (CCR7⁺/CD45RA⁺) del paciente, se encontró claramente disminuida su expresión en comparación del control.

Asimismo, se evaluó la expresión del marcador CD45RO para la población de células TCD4⁺ de memoria, observando una expresión visiblemente mayor de células positivas en el paciente. Se conoce que la respuesta de memoria de las células T protege contra la reexposición del hospedador a un antígeno específico, por lo que la expansión de estas células pudo indicar que el paciente ha presentado una constante reactivación del virus EBV y por ende sus porcentajes aumentados en las subpoblaciones de linfocitos T de memoria, los cuales han tratado de responder ante el antígeno.

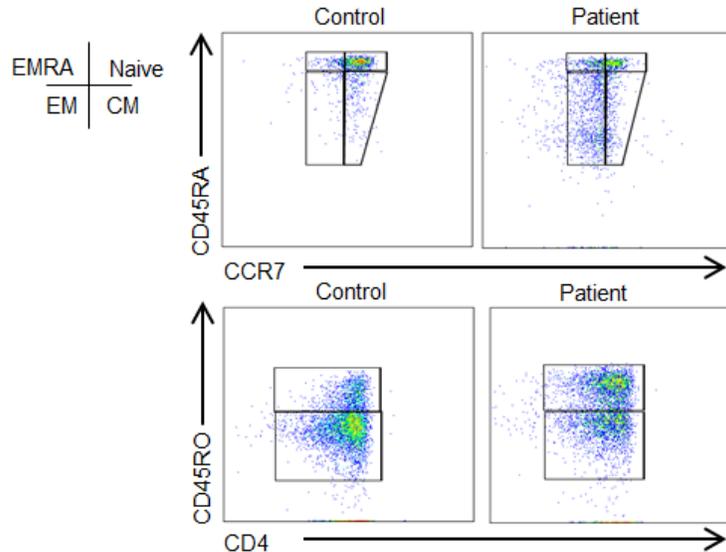


Figura 8. Fenotipificación de las subpoblaciones de linfocitos T en muestras del paciente 1 y un control sano.

Análisis del marcador CD57 en linfocitos T que identifica células en estado senescentes diferenciadas terminalmente con capacidad proliferativa reducida y propiedades funcionales alteradas.

Se conoce que las células T con el fenotipo $CD8^+/CD57^+$ y $CD4^+/CD57^+$ carecen de capacidad proliferativa y estos fenotipos aumentan en frecuencia con la activación inmunitaria crónica así como durante en el envejecimiento normal [20].

Con la finalidad de conocer el estado senescente y alterado de las células $TCD4^+$ y $TCD8^+$ del paciente, se evaluó la expresión del marcador CD57 en estas poblaciones celulares. En base a los resultados obtenidos, se observó que los linfocitos del paciente expresaron un porcentaje positivo para el marcador CD57, en los linfocitos T $CD8^+$ y T $CD4^+$. Por su parte el control no se presentó esta positividad en la expresión del marcador CD57. Estos datos sugieren que las células T del paciente estuvieron presentando procesos alterados en su capacidad proliferativa y una constante activación crónica de estos linfocitos, lo que lleva a un estado de senescencia o agotamiento celular, esta hipótesis se puede sustentar con el hecho de los resultado del análisis de subpoblaciones de linfocitos T, presentaban valores que indicaron un alto número de células de memoria y en un bajo número de células T naive en el paciente así como en los porcentajes de células TEM.

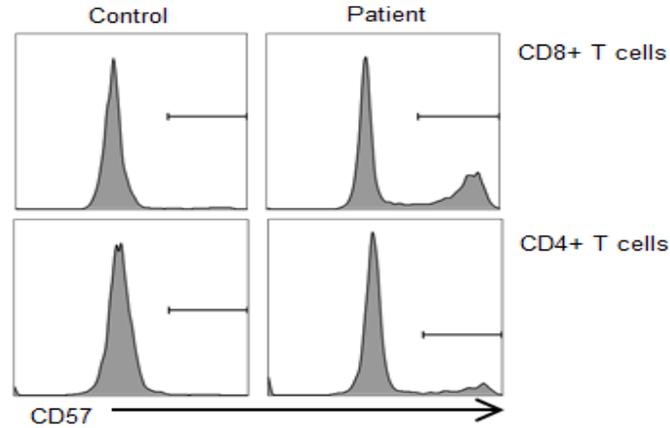


Figura 9. Evaluación de la presencia del marcador CD57 en células TCD8+ y TCD4+ de control sano y paciente 1.

Ensayo de Proliferación

Se realizó un ensayo de proliferación, evaluando diferentes estímulos a diferentes concentraciones en las células T del paciente 1 y un control sano. En la figura 10; se muestran los resultados obtenidos del ensayo, en donde se analizaron estímulos antigénicos y un estímulo mitógeno. Se puede observar que en las 3 concentraciones subóptimas del AntiCD3 (0.3 ug/mL, 1 ug/mL y 3 ug/mL) tanto el control como el paciente presentaban un porcentaje positivo en la proliferación de las células T. Sin embargo, fue evidente que la respuesta de las células del control sano fue más sensibles al tratamiento. Por su parte, en la condición AntiCD3CD28, las células del control y del paciente mostraron una respuesta similar. Finalmente, el estímulo con PHA indujo la proliferación en células del control, pero no en las células del paciente (77% vs. 15%).

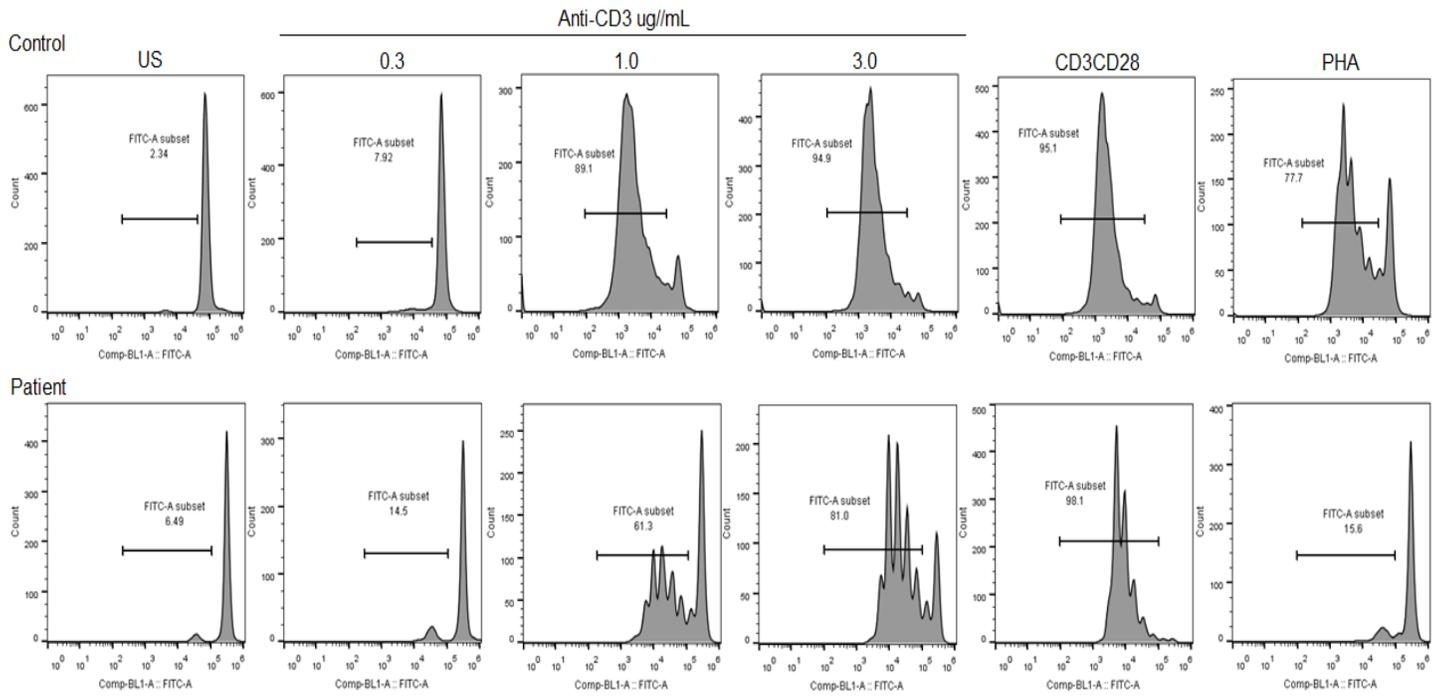


Figura 10. Ensayo de proliferación de células T, utilizando diferentes estímulos y concentraciones.

PACIENTE 2
REPORTE DE CASO

Se trata de un paciente masculino nacido de 3.2 años de edad, con diagnóstico de Síndrome Chediak Higashi y en concordancia con las características fenotípicas relacionadas a este síndrome.

El paciente contaba con presencia de cabello plateado, piel muy blanca desde el nacimiento y con aparición de manchas oscuras en la piel al exponerse al sol. Se describe que el paciente acudió al pediatra a causa de fiebre persistente de 39°C y aparición de una masa cervical izquierda, pétreo, dolorosa. Las evaluaciones de laboratorio y USG de cuello y tórax revelaron resultados negativos a blastos en serie blanca con granulaciones en serie mieloide, histiocitos fagocitando y se considera como, probable síndrome de Chediak Higashi. La microscopía de cabello presentó datos compatibles con Chediak Higashi atípico. El USG de cuello reveló múltiples adenopatías en cuello que sugieren un proceso linfoproliferativo. Asimismo, el paciente presentó alta carga viral del EBV: 435, 130 copias/mL.

Tabla 4. Estudios representativos del paciente 2

Población de linfocitos	Resultados	Valor de referencia
Leucocitos	2780 cel/uL	5000-13000 cel/uL
Linfocitos	78.80%	35- 65%
Linfocitos absolutos	2192 cel/uL	3500-6600 cel/uL
Linfocitos T	50.99%	65-84%
CD3+	1117 cel/uL	1610-4230 cel/uL
Linfocitos T citotóxicos	18.34%	14-34%)
CD3+/CD4+/CD8+	402 cel/uL	330-2200 cel/uL
Relación CD4+/CD8+	1.66	1-3.20
Linfocitos B	41.72%	9-33%
CD19+	914 cel/uL	430- 3200 cel/uL
CD20+	914 cel/uL	430-3200 cel/uL
Células NK	7.30%	8-15%
CD3-/CD16+/CD56+	160 cel/uL	220-720 cel/uL
PCR	Resultados	Valor de referencia
Carga viral del EBV	435, 130 copias/mL	<200 copias/mL

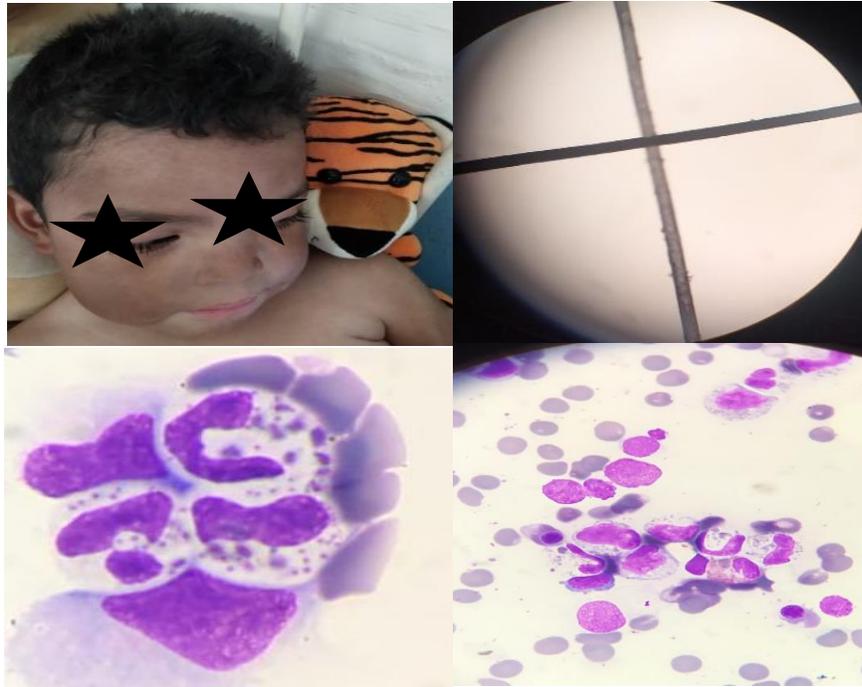


Figura 11. Imágenes características del síndrome de Chediak-Higashi. En la imagen superior izquierda se muestran la pigmentación de la piel del paciente. En la imagen superior derecha se muestra el análisis microscópico del cabello del paciente con un control observando que el cabello del paciente se ve más grueso y con hipopigmentación. En las imágenes inferiores, se muestran los lisosomas gigantes, característicos de este síndrome [21].

Como en el caso pasado, aquí también se procedió a realizar, en primer lugar, la secuenciación masiva de exoma y de acuerdo con los resultados obtenidos se identificó una mutación homocigota en el gen *LYST* en la posición c.3574 cambiando una guanina por una timina (G>T).

Para corroborar estos resultados se procedió a realizar la amplificación de un fragmento del gen *LYST* a partir de muestras de DNAg del paciente 2 y sus padres mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa. Posteriormente se purificaron las bandas obtenidas de la amplificación (Figura 12) mediante el Kit Favorprep GEL/PCR purification mini kit de Favorgen® siguiendo las instrucciones del fabricante. Los purificados se mandaron a secuenciar mediante el método de Sanger.

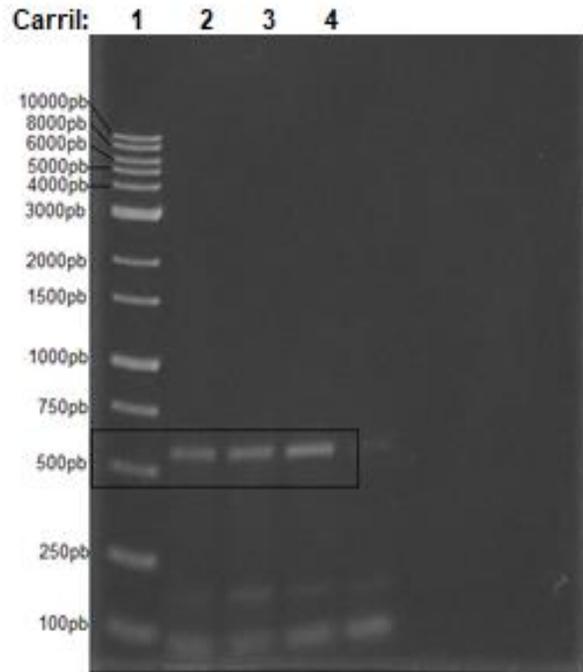


Figura 12. Análisis electroforético de los productos de PCR punto final para la amplificación de un fragmento del gen *LYST* de tamaño de 550 pb usando como molde ADN genómico del paciente 2 y sus familiares. Carril 1: Marcador de peso. Carril 2: Amplicón del Paciente 2, Carril 3: Familiar 1, Carril 4: Familiar 2 y Carril 5: Familiar paciente 2. Corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.2% en TAE 1X.

Los electroferogramas obtenidos mostraron la mutación del gen *LYST* en el paciente 2 (Figura 13), en donde se observó la mutación homocigota con un cambio de base G>T (c.3574), mientras que para los padres se observó una heterocigosis en los alelos del gen, razón por la cual los padres no presentan el fenotipo asociado con la enfermedad.

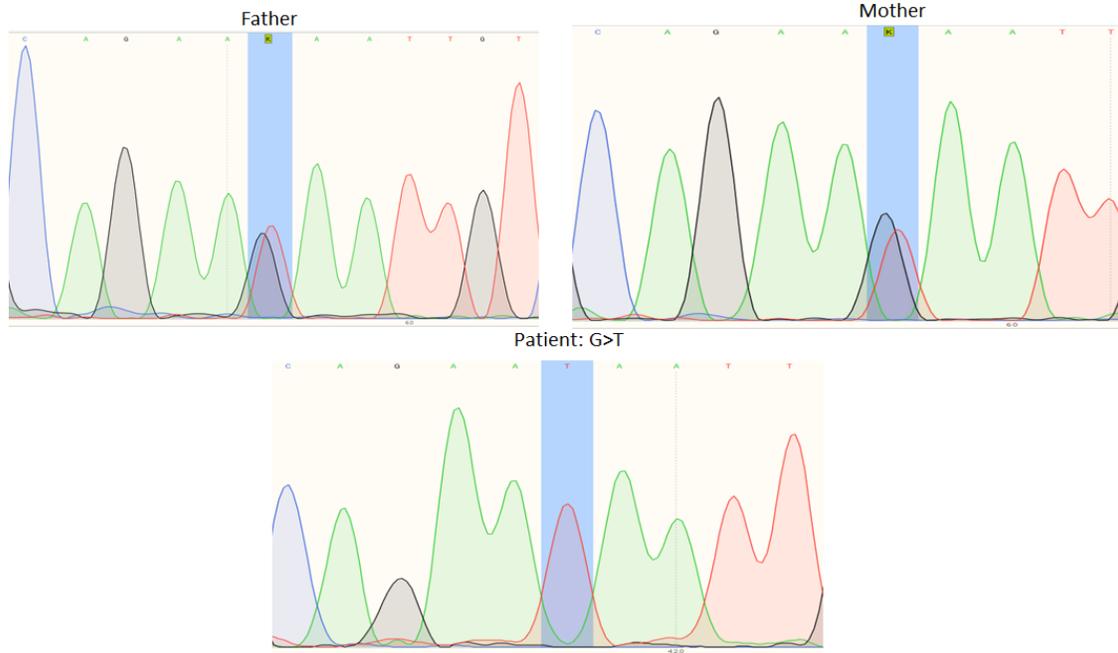


Figura 13. Electroferogramas obtenidos mediante secuenciación de Sanger para la mutación c.3574 G>T en el gen *LYST* del paciente 2 y sus padres.

En la Figura 14, se muestra la segregación familiar del paciente 2 en donde se observa que ambos padres tienen alelos heterocigotos para la mutación encontrada en el gen *LYST*, mientras que el paciente 2 presenta una homocigosis en sus alelos, lo cual desencadena el fenotipo de la enfermedad causada por la mutación en el gen *LYST*.

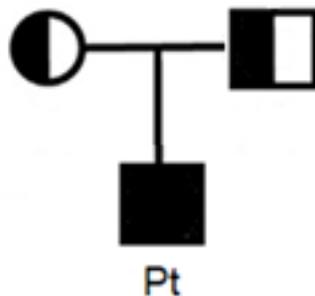


Figura 14. Segregación familiar del paciente 2 de la mutación encontrada en el gen *LYST* mediante secuenciación de Sanger.

Ensayos de degranulación en la expresión del marcador CD107a.

Posteriormente se realizaron ensayos funcionales en linfocitos TCD8⁺ y células NKs para evaluar si la mutación encontrada en el paciente 2 se asocia con la función de degranulación en sus células citotóxicas. Estudios previos reportan que estos procesos pueden verse afectados, por mutaciones del gen *LYST*, sugiriendo que una activación anormal de los linfocitos T y los macrófagos, o una secreción de citocinas pre-inflamatorias descontrolada dando como resultado una respuesta citotóxica anormal de células NKs y TCD8⁺ [22].

Para evaluar el mecanismo de degranulación en células NKs y TCD8⁺ se analizó la expresión del marcador CD107a de la proteína perforina presente en estas células.

En la Figura 15, se muestra el análisis de degranulación en células NKs, en donde se evaluó este mecanismo en las células NKs del paciente 2 y en un control sano. Para el caso de las células del donador sano. El nivel relativo de marcador Δ CD107a fue de 24.55; observándose que las líneas de contorno se desplazan hacia la población más positiva de CD107a. Por su parte, las células del paciente 2 alcanzaron un nivel relativo de Δ CD107a de 3.90. En base a los valores de referencia en el laboratorio de inmunología molecular, concluimos que la degranulación puede ser considerada deficiente.

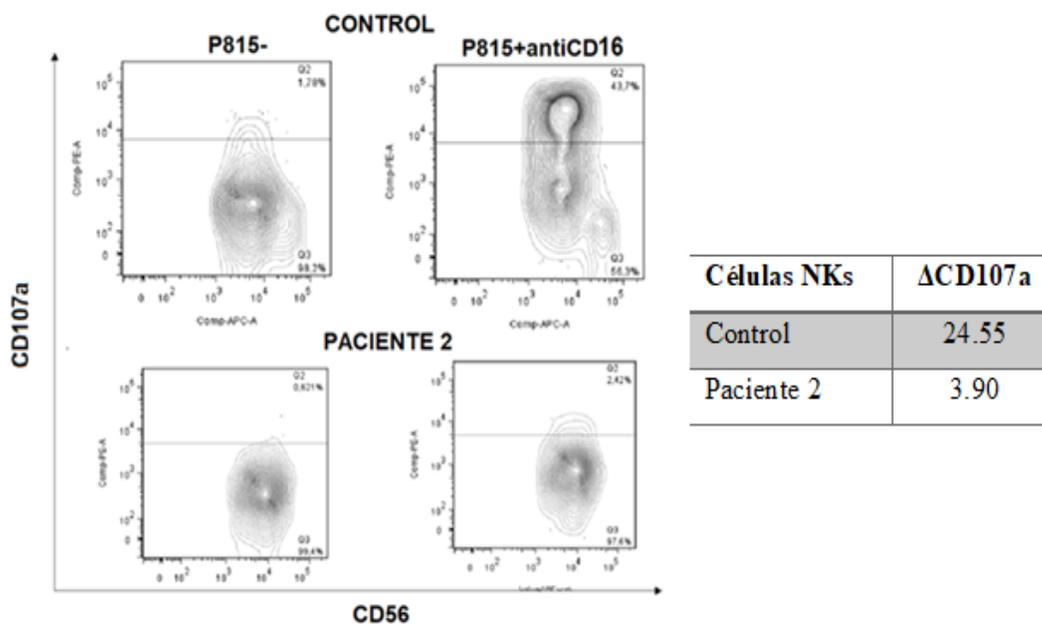


Figura 15. Ensayo de degranulación en células NKs del paciente 2 contra células blanco P815, evaluando la expresión de la proteína CD107a.

Por otro lado, para el ensayo de degranulación en células TCD8⁺ estimuladas con IL-2 y PHA por 72 horas (Figura 16), se observaron resultados similares que en el ensayo de células NKs. Mientras que, para el donador sano, el nivel relativo de Δ CD107a fue de 9.84, el paciente presentó un valor menor de Δ CD107a de 1.38. Todo esto sugiere que el paciente 2 presenta una respuesta de degranulación defectuosa tanto de células NK como de células T citotóxicas.

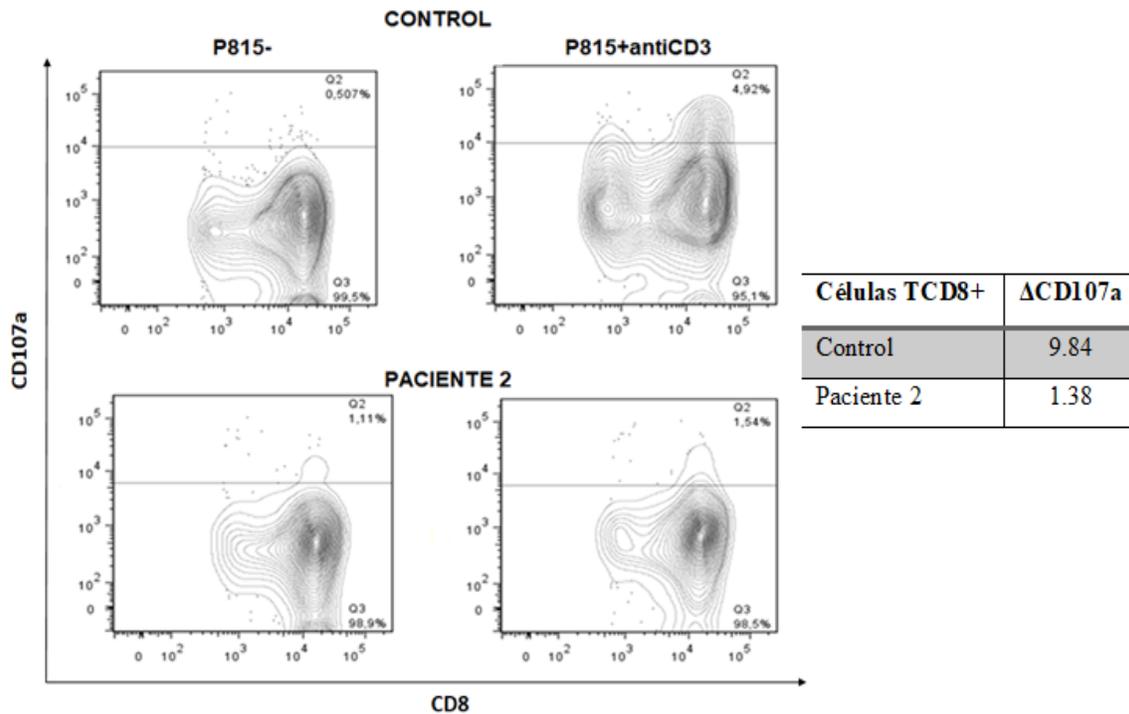


Figura 16. Ensayo de degranulación en células TCD8⁺ activadas del paciente 2 contra células blanco P815, evaluando la expresión de la proteína CD107a.

PACIENTE 3

REPORTE DE CASO

Se trata de un paciente femenino, de 1.3 años de edad cuyo diagnóstico de Linfohistiocitosis Hemofagocítica Familiar fue propuesto debido al hecho de que su hermano finado presentaba un fenotipo similar. Su primer síntoma fue un pico febril de 38°C, visceromegalias con presencia de células hemofagocitando en medula ósea, posteriormente fue diagnosticada con desnutrición crónica grave y presentó antecedentes de pancreatitis y convulsiones con compromiso a nivel de SNC.

Posteriormente, como en los pacientes previos, se le realizó un panel de secuenciación del exoma y de acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que la paciente tiene dos mutaciones heterocigotas en el gen *UNC13D*, una mutación en el exón 11 (c.859del) y la otra en el exón 13 (c.1072dup).

Ensayos de degranulación en la expresión del marcador CD107a.

Para evaluar el mecanismo de degranulación en células NKs, se analizó la expresión del marcador CD107a de la proteína perforina en las células NKs.

En la Figura 17, en comparación con el control sano, donde se presentan niveles de Δ CD107a de 61.72, las células del paciente 3 presentaron un valor de Δ CD107a de 1.86, presentando líneas de contorno desplazadas hacia la población más negativa de CD107a. En base a estos resultados se puede concluir que el mecanismo de degranulación es defectuoso en el paciente.

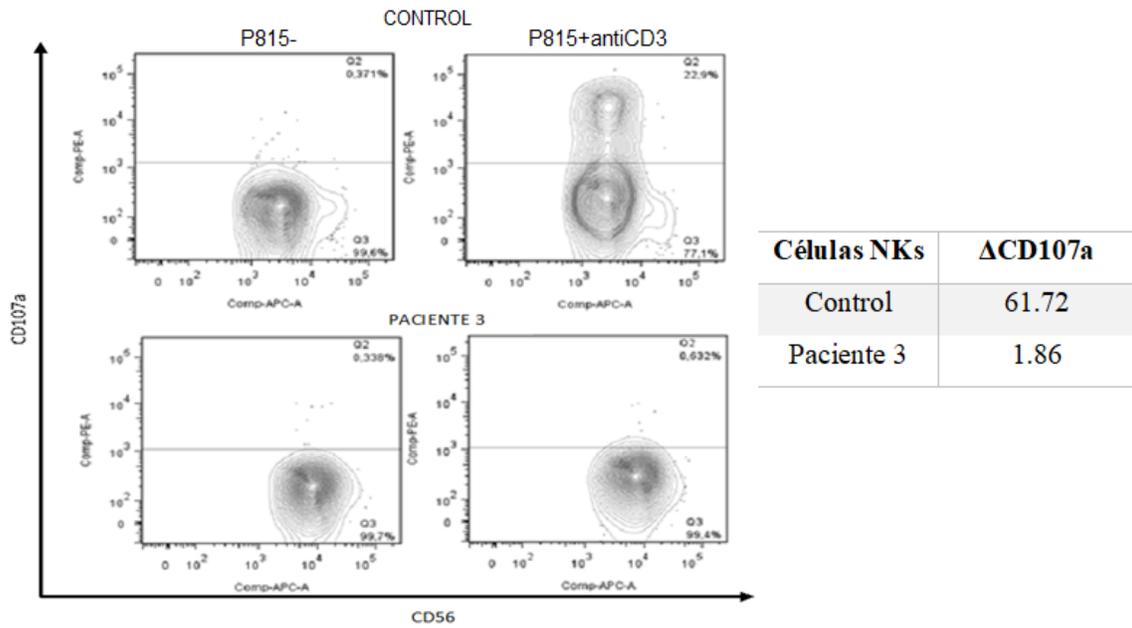


Figura 17. Ensayo de degranulación en células NKs del paciente 3 contra células blanco P815, evaluando la expresión de la proteína CD107a.

PACIENTE 4

REPORTE DE CASO

Se trata de un paciente femenino de 3.6 años de edad, con diagnóstico de Linfocitosis Hemofagocítica. La paciente inició con disuria y dificultad para orinar asociada con fiebre. Además, presentaba diferentes infecciones, incluidas; candidiasis oral, IgM positiva para *Mycoplasma pneumoniae* y cultivo de médula ósea positivo para *Micrococcus luteus*. Posteriormente, desarrolló un cuadro clínico de colitis neutropénica y desnutrición severa. Se le realizó aspirado de médula ósea y biopsia de hueso, dando como resultado hemofagocitosis e hipocelularidad, detención en la maduración de la serie mieloide sin evidencia de blastos por inmunohistoquímica, diseritropoyesis, dismegacariopoyesis y fibrosis grado II/IV de Bauermeister. Posteriormente, la paciente fue trasladada al Instituto Nacional de Pediatría, en donde, se le realizaron análisis de laboratorio los cuales revelaron la presencia de esplenomegalia, citopenias (plaquetas menores a $100,000/\text{mm}^3$, neutrófilos menores a $1000/\text{mm}^3$, anemia), hipertrigliceridemia mayor a 265 mg/dl e hipofibrinogenemia menor a 150 mg/dl.

De acuerdo con estos datos clínicos y ante la sospecha de un caso de Inmunodeficiencia primaria, se realizó un panel de secuenciación de exoma y de acuerdo con los resultados obtenidos se encontró una mutación heterocigota en el gen *TREX1* ubicado en el exón 2 (c.80 C>T).

Ensayos de degranulación en la expresión del marcador CD107a.

Para evaluar el mecanismo de degranulación en células NKs, se evaluó la expresión del marcador CD107a de la proteína perforina en las células NKs.

Los resultados obtenidos del ensayo de degranulación (Figura 18) muestran que en las células NKs del control sano se presentó un ΔCD107a de 61.72 mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a. Por el otro lado, el ΔCD107a del paciente 4 fue de 34.55, observando que, si bien no puede considerarse como una respuesta de degranulación defectuosa, es una respuesta baja comparada con el control.

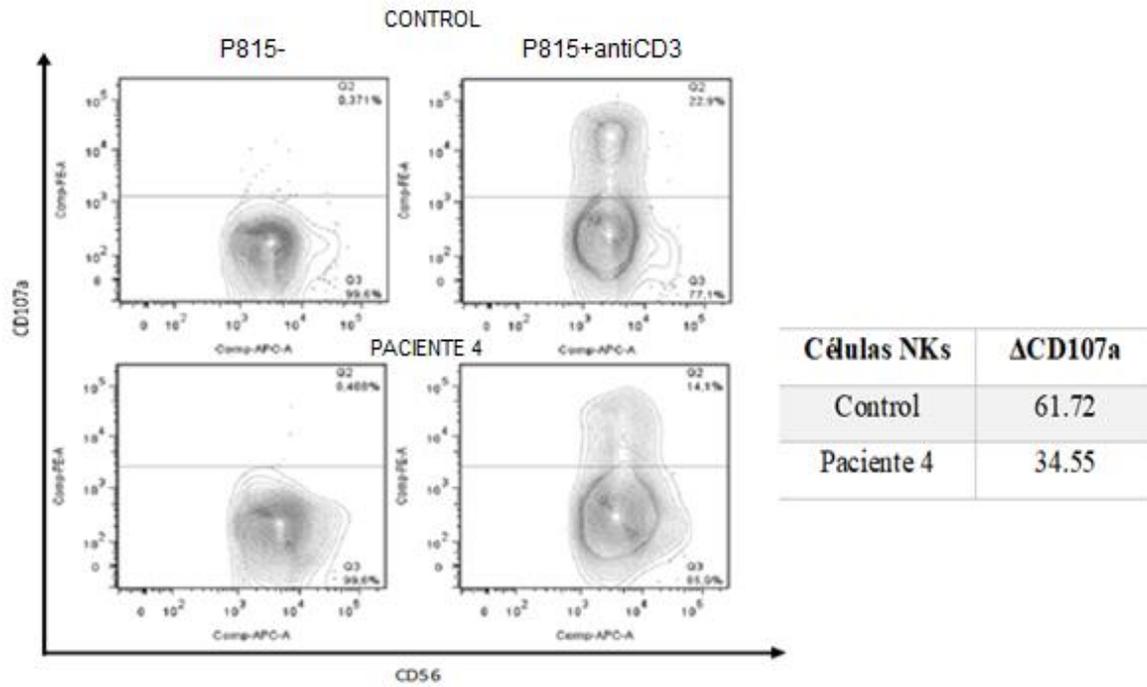


Figura 18. Ensayo de degranulación en células NKs del paciente 4 contra células blanco P815, evaluando la expresión de la proteína CD107a.

PACIENTE 5

REPORTE DE CASO

Se trata de un paciente masculino de 5 años de edad. A los 2 años comenzó con episodios recurrentes de fiebre, neumonía, hipertensión sistémica y pulmonar. Posteriormente, tuvo episodios HLH, bronquiectasia, falla renal aguda, lesiones en la piel y eczema. El paciente también presentaba infecciones con *Aspergillus fumigatus*, *Alcaligenes sp.* y *Enterococcus faecium*. Se le realizaron análisis de laboratorio que evidenciaron una carga viral alta del EBV (7286 copias/mL), Ferritina >1000 ng/mL, pancitopenia y valores normales en suero de Igs. El paciente fue diagnosticado médicamente con HLH con asociación al EBV y bronquiectasia.

Mediante secuenciación de Exoma se identificó una mutación heterocigota en el gen *TREX1* en el exón 1, ubicada en la posición c.221T>G, (p. Met19Arg). Debido a que no había sido reportada en base de datos poblacionales o en otros pacientes, se asume que la mutación puede ser *de novo*.

Para corroborar estos resultados se procedió a realizar la amplificación de un fragmento del gen *TREX1*, utilizando como muestras DNAg del paciente 5 mediante la técnica de PCR. Posteriormente se purificaron las bandas obtenidas de la amplificación mediante el Kit Favorprep GEL/PCR purification mini kit de Favorgen siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los purificados se mandaron a secuenciar mediante el método de Sanger para corroborar la mutación encontrada. En la Figura 19, se muestra el resultado de la secuenciación de Sanger para la región de interés del gen *TREX1*, en donde se confirma la mutación heterocigota T>G (c.221T>G) encontrada en el paciente 5.

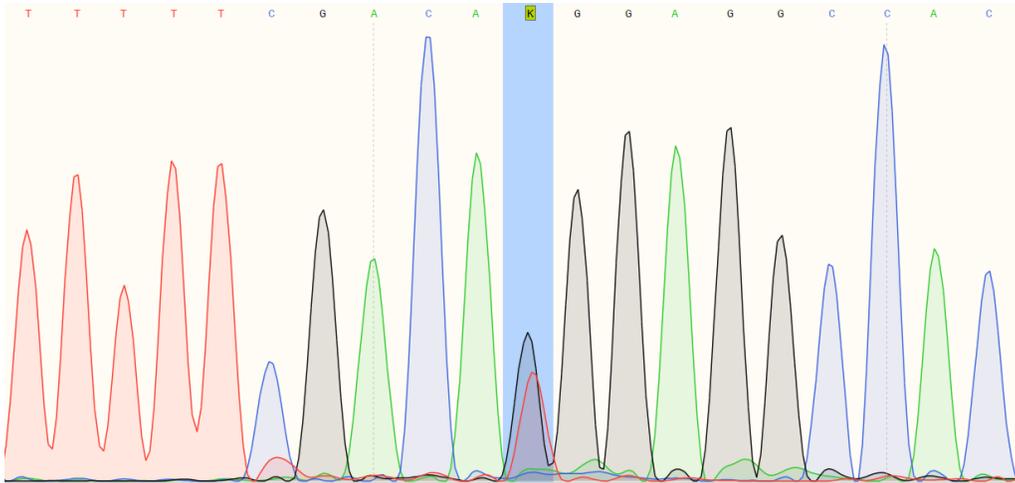


Figura 19. Electroferogramas de la secuenciación de Sanger para el gen *TREX1*, donde se observa la mutación heterocigota T>G (c.221T>G), en el paciente 5.

Ensayos de degranulación en la expresión del marcador CD107a.

Para evaluar el mecanismo de degranulación en células TCD8⁺ y NKs, se analizó la expresión del marcador CD107a de la proteína perforina.

En la Figura 20, se muestra el análisis de degranulación en células TCD8⁺, utilizando como células blanco la línea celular P815, en donde el control sano mostró un Δ CD107a de 59.73, observando las líneas de contorno desplazadas hacía la población más positiva de CD107a. Por su parte, las células del paciente 5 presentó un valor de Δ CD107a de 47.50, presentando líneas de contorno desplazadas hacía la población positiva de CD107a. En base a estos resultados, se puede sugerir que las células TCD8⁺ del paciente presenta un mecanismo de degranulación normal.

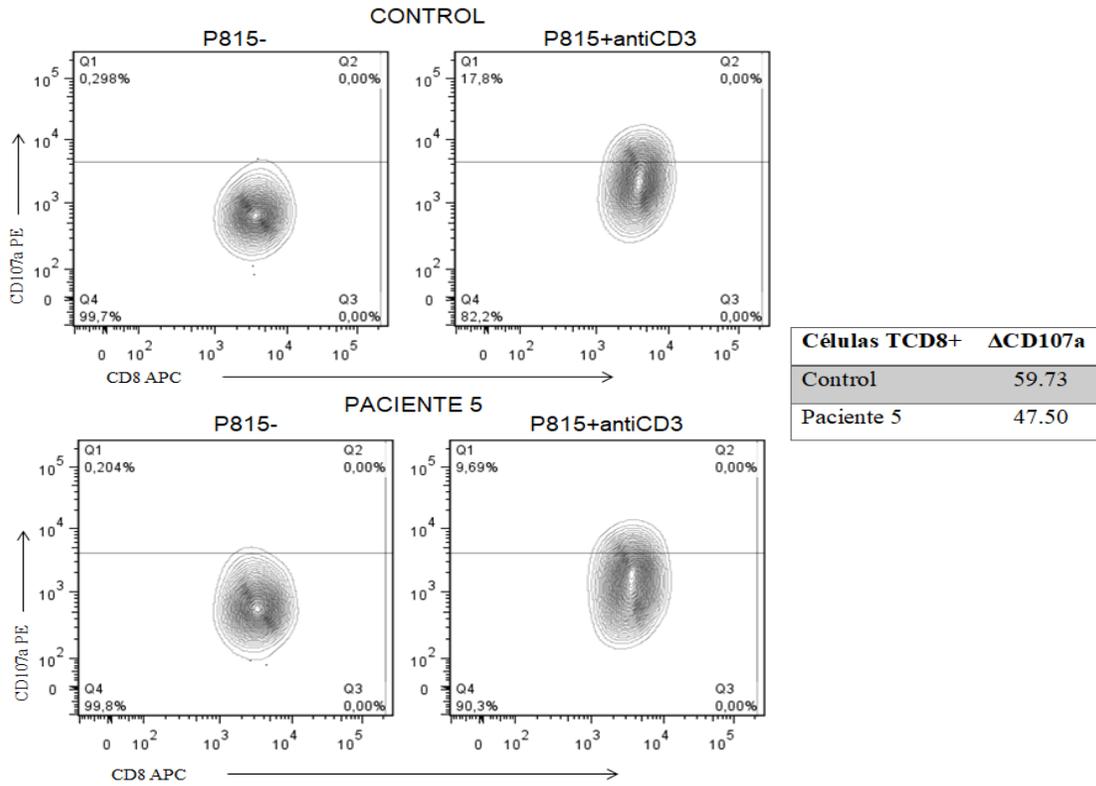
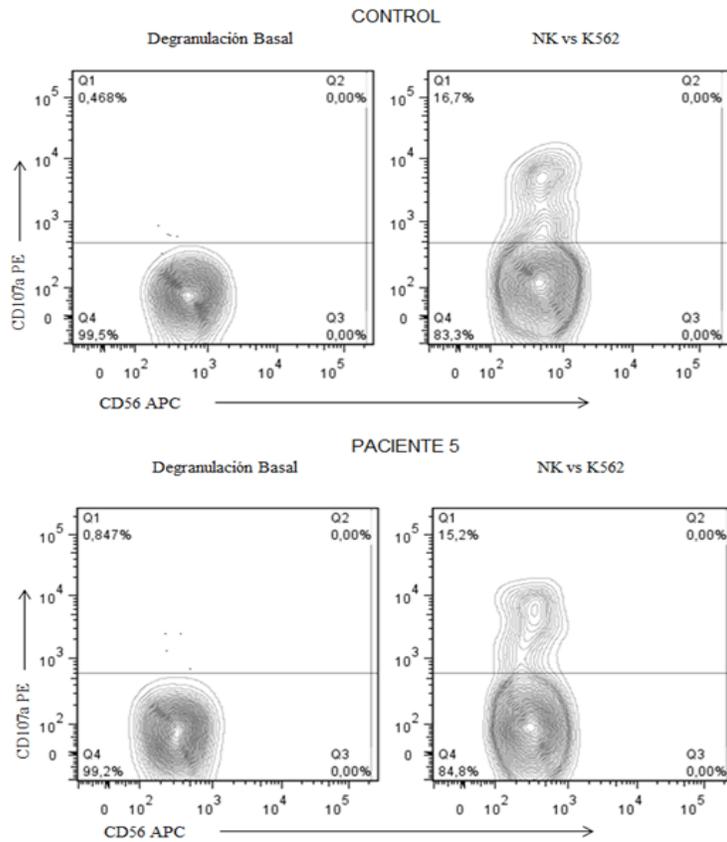


Figura 20. Ensayo de degranulación en células TCD8⁺ del paciente 5 contra células blanco P815, evaluando la expresión de la proteína CD107a.

En la Figura 21, se muestra el análisis de degranulación en células NKs, utilizando como células blanco la línea celular K562. El control sano mostró un Δ CD107a de 35.68, presentando las líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a, por otro lado, el paciente 5 presentó un valor de Δ CD107a de 17.94 presentando líneas de contorno desplazadas hacia la población positiva de Δ CD107a, lo que indica que el paciente presenta un mecanismo de degranulación normal en células NKs al ser comparado con el paciente.



Células NKs	Δ CD107a
Control	35.68
Paciente 5	17.94

Figura 21. Ensayo de degranulación en células NKs del paciente 5 contra células blanco K562, evaluando la expresión de la proteína CD107a.

DISCUSIÓN

Las inmunodeficiencias primarias, son un grupo de enfermedades que se desencadenan por diferentes variantes monogénicas de la línea germinal que afectan la función del sistema inmune. Dentro de este grupo de enfermedades se encuentran aquellas que se originan debido a mutaciones en genes que causan susceptibilidad al EBV. Una de las manifestaciones clínicas características de esta susceptibilidad a infecciones, son las enfermedades linfoproliferativas y los síndromes de Linfocitosis hemofagocítica (HLH). Sin embargo, en los últimos años se han descrito mutaciones que no causan ninguna de estas manifestaciones características de una IDP con susceptibilidad al EBV, y solo se asocian con infecciones crónicas a virus, hongos y/o bacterias.

En el presente trabajo hemos identificado mutaciones en 5 pacientes con criterios clínicos de HLH y/o susceptibilidad anormal a EBV, a los cuales se les realizaron estudios genéticos y funcionales en linfocitos T y células NK. De acuerdo con los estudios genéticos se encontraron diferentes entidades genéticas asociadas como causa de una inmunodeficiencia primaria.

En dos pacientes las entidades genéticas correspondieron a genes asociados con HLH familiar en el contexto de inmunodeficiencia primaria con susceptibilidad al EBV. En un tercer paciente se identificó un gen asociado a desencadenar susceptibilidad anormal al EBV. Finalmente, en dos pacientes, se encontraron entidades genéticas que no han sido reportadas como causantes de HLH familiar o con una susceptibilidad al EBV. Lo anterior resulta de interés debido a que hemos caracterizado a dos pacientes los cuales presentaron manifestaciones clínicas asociadas a una IDP, en donde el padecimiento característico es la presencia de varios episodios de HLH. De acuerdo a los estudios genéticos, estos pacientes presentaron mutaciones heterocigotas en un gen común. Los estudios genéticos han sido clave en el diagnóstico de cada paciente ya que estos han dado pauta en determinar qué tipo de ensayos fueron prioritarios realizar en cada paciente. Aunado a esto se realizó ensayos funcionales en sus células citotóxicas, así como ensayos bioquímicos para evaluar la expresión de la proteína de acuerdo a las mutaciones encontradas, según sea el caso de cada paciente.

En el paciente 1, descubrimos dos mutaciones nuevas en el gen *COROIA* a partir de secuenciación de exoma y su confirmación por Sanger. Esto indicó la presencia de dos mutaciones heterocigotas compuestas. Una mutación se localizó en el exón 5 donde resultó en un cambio de una adenina por una guanina (c.596 A>G) que a nivel de aminoácidos resultó en un cambio de una arginina por una histidina (R199H). La segunda mutación se localizó en el intrón 8 en donde resultó en un cambio de una guanina por una adenina (c.1008-31 G>A).

Todos los familiares son portadores de la mutación en el intrón 8 de forma heterocigota; solo la madre y el paciente tienen la mutación en el exón 5. Sin embargo, siendo el paciente el único en desarrollar sintomatología y un cuadro clínico de linfocitosis hemofagocítica asociado con el Virus Epstein-Barr. Estos resultados sugieren que la transcripción de ARNm podría encontrarse en un estado anormal, sin embargo, falta comprobar esta hipótesis realizando un análisis de transcripción del cDNA.

Estudios realizados en otros pacientes han reportado mutaciones compuestas heterocigotas en el gen *COROIA*. Una de estas mutaciones (c.248_249delCT) causó un cambio de marco de lectura en el codón 83 (prolina sustituida con arginina), lo cual conlleva a un término prematuro de la transcripción de un ARNm anormal [23]. Por otro lado, otra mutación localizada en el exón 11 (c.1077delC) resultó en la delección de un nucleótido de citosina, lo que provocó un desplazamiento del marco de lectura del codón 360. En consecuencia, los 44 codones adicionales se transcribieron de forma anormal antes del codón de parada, en la unión entre la extensión C-terminal y el dominio CC. Además, esta mutación del exón 11 se encuentra dentro de un bucle altamente conservado entre la hélice y la región única de la extensión C-terminal (CE) y es responsable de la estabilización de la estructura de la hélice tridimensional de la proteína CORONINA1A [23].

Con el fin de analizar la expresión de la proteína CORONINA1A, se realizó un ensayo de Western Blot en el paciente 1. Los resultados demostraron que la expresión de la proteína no se vio afectada al compararse con los controles. Esto sugiere que las mutaciones encontradas no afectan la expresión ni el tamaño de la proteína.

De acuerdo con la literatura sobre mutaciones en *COROIA*, se han reportado 3 mutaciones en donde la expresión de la proteína está ausente y solo 1 mutación en donde la expresión se

encuentra disminuida. El primer paciente reportado presentó una delección heterocigota de 2pb en el exón 3 del gen *COROIA*, que condujo a un cambio de marco y un truncamiento prematuro (P83RfsX10). En el otro alelo, se encontró una delección heterocigota de *novó* de 600 Kb del cromosoma 16p11.2 la cual abarcó todo el gen de *COROIA*. Debido a esto el paciente presentó una ausencia completa funcional de la proteína CORONINA1A, lo cual se vio reflejado en un fenotipo clínico grave, manifestado por una inmunodeficiencia combinada grave (SCID) de fenotipo T- B+NK+ y caracterizado por infecciones recurrentes graves, desarrollo tardío en el crecimiento y trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) [24] [25].

En contraste con este paciente, en otro estudio se reportaron a tres hermanos con una mutación homocigótica que resultó en un cambio en el marco de lectura de una valina por una metionina en la posición 134 (c.717 C>A). Como consecuencia la expresión de la proteína disminuyó significativamente, pero aun fue detectable por Western Blot, lo cual sugiere que un fenotipo inmunológico menos severo puede haber sido el resultado de una expresión normal de la proteína pero con una función anormal [25].

Estudios realizados en otros pacientes con mutaciones puntuales en el gen *COROIA* que codifica para CORONINA1A, indican que las mutaciones conducen a una oligomerización de proteínas defectuosa, una localización subcelular anormal y una acumulación de F-actina en las células T afectando su dinámica celular y supervivencia. Sin embargo, estas mutaciones no afectan el flujo de calcio en las células T y NKs, ni la citotoxicidad en estas células [26].

Para evaluar el impacto de las mutaciones en *COROIA* sobre las funciones efectoras de los linfocitos T, se realizó un ensayo de degranulación en células T CD8+. Los resultados mostraron una degranulación normal de acuerdo al valor de Δ CD107a. Estos resultados coinciden con lo publicado en otros pacientes, que indican que la citotoxicidad en las células citotóxicas se encuentra normal en pacientes que son portadores de mutaciones en *COROIA*.

Posteriormente, en el paciente 1 se realizó un análisis de subpoblaciones de células T. Estos resultados mostraron un porcentaje disminuido de la subpoblación de células T naive y un porcentaje aumentado en la subpoblación de memoria efectora en el paciente con respecto al control sano. Se analizó también el fenotipo de las células T de memoria, evaluando la

expresión del marcador CD45RO+ en la población de célula T CD4+. El análisis de los resultados mostró un porcentaje elevado de células T de memoria en el paciente con respecto al control.

Adicionalmente, se evaluó el marcador CD57 en las células T, el cual es un marcador que identifica a las células en un estado senescente y con capacidad proliferativa alterada. De acuerdo a nuestros resultados, las células T del paciente presentaba un porcentaje significativamente mayor de células de memoria respecto al control. Esto sugiere que las células T del paciente pudieron haber experimentado ciclos continuos de activación como un medio de compensación en respuesta al establecimiento de una respuesta efectora deficiente. Esta idea puede también sustentarse con el hecho de que el porcentaje de linfocitos T positivos para el marcador CD57 fue también significativamente mayor en el paciente respecto al control.

En base a antecedentes se decidió evaluar la respuesta proliferativa de las células T del paciente. Para esto las células T se estimularon bajo diferentes condiciones. Los resultados obtenidos indicaron que el paciente presentó una respuesta proliferativa deficiente ante el estímulo con antiCD3 y en respuesta a PHA. En contraste, el estímulo con anti-CD3 más anti-CD28 indujo una respuesta proliferativa similar a la observada para las células T del control, lo que sugiere que la presencia de señales coestimuladoras es capaz de rescatar parcialmente la respuesta proliferativa en las células T del paciente.

Respecto al paciente 2, de 3.2 años de edad y finado, presentó un cuadro clínico característico del síndrome de Chediak-Higashi en fase acelerada de fagocitosis, asociado a una infección por el virus Epstein-Barr. El síndrome Chediak-Higashi es causado por una mutación en el gen *LYST*, el cual codifica para la proteína *LYST*. Es un trastorno lisosómico autosómico recesivo poco común que se caracteriza por infecciones frecuentes, albinismo oculocutáneo, diátesis hemorrágica y deterioro neurológico progresivo. En el 85% de los casos, los pacientes con CHS desarrollan la fase acelerada caracterizada por pancitopenia, fiebre alta e infiltración en el hígado, el bazo y los ganglios linfáticos. Además, un defecto en este gen afecta el proceso de degranulación de las células T y NKs [27].

Mediante estudios genéticos de secuenciación dirigida de exoma y por confirmación por Sanger, en este paciente se identificó y confirmó una mutación no reportada, en el gen *LYST*.

De acuerdo con los resultados obtenidos la mutación fue homocigota y se ubicó en el exón 8 del gen *LYST* (c.3574 G>T), lo que resultó en la inserción de un codón de paro prematuro (p.Glu1192*).

Los pacientes con CHS con deleciones en el gen *LYST* suelen presentar una fase acelerada fulminante, mientras que aquellos con mutaciones sin sentido tienen un mejor pronóstico, caracterizado por la ausencia de una fase acelerada y sin compromiso neurológico [27]. Nuestro paciente tuvo un curso rápidamente fatal, por lo que no se pudieron realizar más estudios genéticos o bioquímicos con la finalidad de analizar la transcripción del ARNm y posteriormente la expresión de su proteína.

Sin embargo, se realizaron ensayos de degranulación en sus células citotóxicas evaluando la expresión del marcador CD107a, usando como células blanco la línea celular P815. En ambos ensayos el porcentaje de degranulación se encontró anormalmente disminuido en comparación con el control sano. El ensayo en las células TCD8+ del paciente, mostró un valor de Δ CD107a de 1.38, mientras que el control presentó un valor de 9.70. Asimismo, en el ensayo de células NKs el valor del Δ CD107a para el paciente fue de 3.89 y el valor del Δ CD107a para el control fue de 25.55. Estos resultados indican una función de degranulación anormal en el paciente 2, lo cual es consistente con lo reportado en pacientes con mutaciones en el gen *LYST*, en donde las funciones efectoras de las células citotóxicas se encuentran afectadas [28].

El paciente 3, de 1.3 años de edad, se diagnosticó con Linfocitosis Hemofagocítica Familiar y presentó antecedente de un hermano finado con el mismo diagnóstico. Inició al mes vida con datos de síndrome febril, visceromegalias, con presencia de células hemofagocitando en medula ósea.

Se identificaron dos mutaciones en el gen *UNC13D* a partir de estudios genómicos de secuenciación de exoma. Las mutaciones fueron heterocigotas compuestas y se ubicaron en el exón 11 (c.859del) y en el exón 13 (c.1072dup).

La Linfocitosis hemofagocítica familiar (FHL) es un grupo de trastornos inflamatorios que presentan linfocitos T y células NK con citotoxicidad deteriorada, lo que da como resultado una proliferación aberrante de linfocitos y macrófagos activados, y una

sobreproducción de citocinas proinflamatorias. Los defectos genéticos clásicos involucrados en desencadenar FHL incluyen *PRF1*, que codifica para la proteína perforina (FHL2), *UNC13D* que codifica Munc13-4 (FHL3), *STX11* que codifica sintaxina-11 (FHL4), y *STXBP2* que codifica Munc18-2 o proteína de unión a Sintaxina 2 (FHL5) [29].

El gen *UNC13D* codifica la proteína MUNC13-4, la cual es crucial para la fusión de la vesícula y la membrana plasmática y su ausencia altera la exocitosis dependiente de gránulos, lo que explica la ausencia de citotoxicidad de células NK [13], [29].

Aunado a esto se realizó un ensayo de degranulación en las células NKs del paciente, en donde se evaluó la expresión del marcador CD107a. Los resultados corroboraron los estudios publicados en otros pacientes con FHL debido a mutaciones en el gen *UNC13D*, en donde la función de degranulación en las células NKs se encontró ausente, al ser comparo con un control sano.

Finalmente, tenemos un grupo de 2 pacientes, con mutaciones en el gen *TREX1*, ambos pacientes con diagnóstico clínico característico de HLH. Sin embargo, la entidad genética en ambos casos no corresponde al grupo de genes clásicos que desencadenan HLH.

Mediante estudios genómicos de secuenciación de exoma se identificó la ubicación de las mutaciones en ambos pacientes. En el paciente 4 se encontró una mutación heterocigota en el gen *TREX1* ubicado en el exón 2 (c.80 C>T), Mientras que para el paciente 5 se identificó una mutación heterocigota en el exón 1, ubicada en la posición c.221T>G (p. Met19Arg), esta mutación no ha sido encontrada en bases de datos poblacionales y no se ha descrito en otros pacientes.

Las mutaciones en el gen *TREX1* están relacionadas con el desarrollo del síndrome de Aicardi-Goutières, una enfermedad inflamatoria del cerebro caracterizada por la producción crónica de IFN en el sistema nervioso central y el lupus eritematoso sistémico, y se ha reportado que *TREX1* es necesario para el correcto funcionamiento de los macrófagos. La deficiencia da como resultado un fenotipo más proinflamatorio caracterizado por una mayor producción de citocinas y una mayor capacidad para activar las células T, aunado a esto la pérdida de *TREX1* debilita la función apoptótica de los macrófagos. Por otro lado, no se han

reportado casos que indiquen una función anormal del mecanismo citotóxico en células NKs debido a mutaciones en *TREX1* [30].

Finalmente, se realizaron ensayos funcionales en las células citotóxicas de los pacientes 4 y 5, en donde se evaluó el mecanismo de degranulación mediante la expresión del marcador CD107a.

El ensayo de degranulación en las células NKs del paciente 4 mostró un porcentaje de degranulación normal, con un valor de Δ CD107a de 34.55, lo cual indicó que el mecanismo de degranulación no se encuentra afectado.

Por otro lado, en el paciente 5 se realizó ensayos de degranulación en sus células TCD8+ y células NKs. Los resultados indicaron que el paciente tiene una función normal de degranulación en ambas poblaciones celulares.

Este grupo de dos pacientes se caracterizó por presentar diferentes episodios de HLH, sin embargo, el cuadro clínico no se asociaba con mutaciones en genes clásicos que desencadenan HLH, o causantes de susceptibilidad anormal a infección por EBV.

CONCLUSIONES

Se identificaron 7 mutaciones diferentes en un corte de 5 pacientes. En nuestro primer paciente, se encontraron dos mutaciones en un gen (*COROIA*) que causa susceptibilidad anormal al EBV, ambas son mutaciones no reportadas y consideradas como patógenas. En el segundo paciente, se encontró una mutación nueva en un gen clásico (*LYST*) que desencadena HLH con hipopigmentación. Por otro lado, en el paciente 3, se identificaron dos mutaciones nuevas heterocigotas compuestas en un gen clásico (*UNC13D*) responsable de desencadenar HLH familiar. Finalmente, identificamos en el cuarto y quinto paciente dos mutaciones diferentes en el mismo gen (*TREX1*), el cual no se ha reportado como responsable de causar susceptibilidad anormal a infecciones o desencadenar algún tipo de HLH. Sin embargo, los pacientes presentaron un cuadro clínico asociado con Síndrome Hemofagocítico.

PERSPECTIVAS

- Aumentar el número de pacientes que integren el estudio.
- Secuenciar a los padres y familiares de todos los pacientes que integren el estudio, para analizar la segregación familiar y la penetración clínica.
- Desarrollar modelos *in vitro* para profundizar el estudio de las causas genéticas y las vías de señalización que pueden verse afectadas.
- Desarrollar plataformas como CRISPR-Cas9 para evaluar las funciones de un gen en específico
- Expandir el estudio para incluir otros virus.

LITERATURA CITADA

- [1] S. G. Tangye *et al.*, “Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee,” *J. Clin. Immunol.*, 2020.
- [2] T. Murata *et al.*, “Molecular basis of Epstein–Barr virus latency establishment and lytic reactivation,” *Viruses*, vol. 13, no. 12, pp. 1–20, 2021.
- [3] I. Tinoco Racero, N. Caro Gómez, C. Rodríguez Leal, and E. López Tinoco, “Infecciones por el virus de Epstein-Barr y citomegalovirus,” *Med.*, vol. 11, no. 50, pp. 2954–2964, 2014.
- [4] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, and S. Pillai, *INMUNOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR*, vol. 8. 2015.
- [5] A. Veillette, “SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors.,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 3, pp. 1–15, 2010.
- [6] M. E. Moreno Fernandez, J. Montoya Guarín, and M. T. Regules López, “Células NK: generalidades y papel durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1),” *IATREIA*, vol. 20, no. 1, pp. 47–63, 2007.
- [7] N. A. Marshall, M. A. Vickers, and R. N. Barker, “Regulatory T Cells Secreting IL-10 Dominate the Immune Response to EBV Latent Membrane Protein 1,” *J. Immunol.*, vol. 170, no. 12, pp. 6183–6189, 2003.
- [8] N. Brandan, A. Luponio, J. J. González, N. González Roibón, and S. Klinzok, “Linfocitos T.”
- [9] C. Picard *et al.*, “International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity,” *J. Clin. Immunol.*, vol. 38, no. 1, pp. 96–128, 2018.
- [10] A. Bousfiha, L. Jeddane, C. Picard, and F. Ailal, “The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies Citation for published version,” 2017.
- [11] P. Soler-Palacín, “Inmunodeficiencias Primarias,” in *Actualización en Pediatría 2020*, 2020, pp. 311–320.
- [12] M. E. Cruz-Muñoz and E. M. Fuentes-Pananá, “Beta and gamma human herpesviruses: Agonistic and antagonistic interactions with the host immune system,” *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. 2521, pp. 1–20, 2018.
- [13] G. de Saint Basile, G. Ménasché, and S. Latour, “Inherited defects causing hemophagocytic lymphohistiocytic syndrome,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1246, no. 1, pp. 64–76, 2011.
- [14] A. Fischer, S. Latour, and G. de Saint Basile, “Genetic defects affecting lymphocyte cytotoxicity,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 19, no. 3, pp. 348–353, 2007.
- [15] C. Aguilar and S. Latour, “X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein Deficiency: More than an X-linked Lymphoproliferative Syndrome,” *J. Clin. Immunol.*, vol. 35, no. 4, pp. 331–338, 2015.
- [16] N. Seeligmüller and E. Ag, “Aislamiento más rápido de PBMC usando Ficoll-Paque® Plus en las centrifugas de sobre- mesa multiusos 5920 R y 5910 R Eppendorf,” no. figura 2, pp. 2–7, 1968.

- [17] S. Latour and S. Winter, "Inherited immunodeficiencies with high predisposition to Epstein-Barr Virus-driven lymphoproliferative diseases," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. JUN, 2018.
- [18] D. Moshous *et al.*, "Whole-exome sequencing identifies Coronin-1A deficiency in 3 siblings with immunodeficiency and EBV-associated B-cell lymphoproliferation," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 131, no. 6, 2013.
- [19] F. A. Arosa, A. J. Esgalhado, C. A. Padrão, and E. M. Cardoso, "Divide, conquer, and sense: CD8+CD28- T cells in perspective," *Front. Immunol.*, vol. 7, no. JAN, pp. 1–9, 2017.
- [20] H. Kared, S. Martelli, T. P. Ng, S. L. F. Pender, and A. Larbi, "CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 65, no. 4, pp. 441–452, 2016.
- [21] P. Revista, M. De, N. Sotelo-Cruz, G. Covarrubias-Espinoza, R. Gómez-Rivera, and M. J. García, "Síndrome de Chediak-Higashi en fase acelerada, en un lactante (Chediak-Higashi syndrome in an infant. A case in accelerated phase)," vol. 74, pp. 113–118, 2007.
- [22] S. W. Canna and R. A. Marsh, "Pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis," *Blood*, vol. 135, no. 16, pp. 1332–1343, 2020.
- [23] A. Stray-Pedersen *et al.*, "Compound Heterozygous CORO1A Mutations in Siblings with a Mucocutaneous-Immunodeficiency Syndrome of Epidermodysplasia Verruciformis-HPV, Molluscum Contagiosum and Granulomatous Tuberculoid Leprosy," *J. Clin. Immunol.*, vol. 34, no. 7, pp. 871–890, 2014.
- [24] L. R. Shiow, K. Paris, M. C. Akana, J. G. Cyster, R. U. Sorensen, and J. M. Puck, "Severe combined immunodeficiency (SCID) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) associated with a coronin-1A mutation and a chromosome 16p11.2 deletion," *Clin. Immunol.*, vol. 131, no. 1, pp. 24–30, 2008.
- [25] D. Moshous and J. P. de Villartay, "The Expanding Spectrum of Human coronin 1A deficiency," *Curr. Allergy Asthma Rep.*, vol. 14, no. 12, pp. 1–8, 2014.
- [26] C. S. Yee *et al.*, "Recurrent viral infections associated with a homozygous CORO1A mutation that disrupts oligomerization and cytoskeletal association," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 137, no. 3, pp. 879-888.e2, 2015.
- [27] I. Maaloul *et al.*, "Chediak-Higashi syndrome presenting in accelerated phase: A case report and literature review," *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.*, vol. 9, no. 2, pp. 71–75, 2016.
- [28] W. Zarzour *et al.*, "Two novel CHS1 (LYST) mutations: Clinical correlations in an infant with Chediak-Higashi syndrome," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 85, no. 2, pp. 125–132, 2005.
- [29] C. H. Liao, N. C. Lee, S. T. Jou, B. L. Chiang, and H. H. Yu, "UNC13D mutation presenting as fulminant familial hemophagocytic lymphohistiocytosis," *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, vol. 53, no. 6, pp. 1039–1041, 2020.
- [30] S. Pereira-Lopes *et al.*, "The Exonuclease Trex1 Restrains Macrophage Proinflammatory Activation," *J. Immunol.*, vol. 191, no. 12, pp. 6128–6135, 2013.

Cuernavaca, Mor., 01 de diciembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización genética y funcional de la respuesta inmune citotóxica en pacientes con susceptibilidad anormal al virus del Epstein Barr**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Daniela Olivia López Rivera. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2022-12-09 12:21:40 | Firmante

IZcv5bHJ68OlP+sQOPuTZEE+oEQn2TiukLRxBTBPxBx8zPz9JFvo3zR3HKzpRyoqYBrCQGKkbriej3ayp8yQN058sVrJ6halxuHTCGi21Uo5k0DaWaCsvvb9+KnZRUHnD+yt4gJN
CVLU3ZCFu+4iNhuavnLe5KszfuUF0S8Yjioczp4zn/NpN0A9Otu8b1FHPQ/uPJWQCaleKyNeFbXduXivEUg2kb/s0Pe68weVd4ks+VFGnp7fgGXkKWVtJXhS1jeX6O81WgwdN9XS
uMMTKTble5Z085Uk9zhWuO+eCd42QilDvhlE+eMVJL9bMQvWoaoiD0vesUR6OapPVHxPA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[UGeTyFPSj](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/g3S5jkfcsYIZe0cx8xcYm13VsLE0y71W>



Cuernavaca, Mor., 01 de diciembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización genética y funcional de la respuesta inmune citotóxica en pacientes con susceptibilidad anormal al virus del Epstein Barr**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Daniela Olivia López Rivera. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2022-12-06 07:58:34 | Firmante

jNYPGIUiG9jUnxWMH01UDczEMmFvMov17yG2lXa8CNYw9rXQmlTRnUuJBx9pgaXbjPM2wf7IFqykOK2nDkd0Ts0lar0en6MXxCfVgWrrw1G4WdEGCnKCzs2IPD3Rgu/NYf9Rvh+TOE7oQDOubqAnQe+0718MO6l8hjXj09xRZLZoB3zF+T0xkuXOQ4vuPCNsNF9pdqBj4jbAl84IK9/F6jpdA7GTISgP2JN7t+TfRK0+EQo8grm9ksKgD+8VdvrqUuz+j5TOHVtgWFiUJ6zQen4bRE7Y4Kn3E7Z0o6ryoPeHYgRRPt+xVAXmb+W+0l+bLXqWZYWLPcOEUBgoKkSgg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[bCrGoc6vu](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dLaQwm5bKtwtrmmBjMr2w7ssY4QDAGmcg>



Cuernavaca, Mor., 01 de diciembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización genética y funcional de la respuesta inmune citotóxica en pacientes con susceptibilidad anormal al virus del Epstein Barr**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Daniela Olivia López Rivera. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ | Fecha:2022-12-08 08:35:40 | Firmante

V8LBWxgvrXyjoOa3mulx3qU9a7i9gQkmuzDYnBGGHiEwGuR4jy06iNLxZDdSpISHpvCLhmUYe6H/T3DYfG1tHVAVYPCit9tJ0n7Q47nhEyJVfGUdE9TZdfXfd1NHnzpf+gcgeP2T
SZyS3rorafGuTPym17wtD3YRyL4AI6iHNLGy6JYslrYb1Xap8GK6Y/Us4M6PI6tJtQ+mXKlwUFRcPLJqgFX3PY4UJwBtxHqAagoQp4DFh4TP5Cte+02gqJZUQRSRI3y1UWf80Hrb
BrgJz3GYFwzjUJfL5YWUrpG4SWwVuKrJQW1Ag0HHC+TylqBRWla2ineDdRxxNdDFDYwJw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[3fs6adtUg](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/YC3d4nyhw202yDYUzIWbQ8nOfieEnopf>



Cuernavaca, Mor., 01 de diciembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización genética y funcional de la respuesta inmune citotóxica en pacientes con susceptibilidad anormal al virus del Epstein Barr**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Daniela Olivia López Rivera. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Saúl Oswaldo Lugo Reyes



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SAUL OSWALDO LUGO REYES | Fecha:2022-12-09 17:38:17 | Firmante

ne6Bty4iL7gEvu7uc9TJdmr46nu+64D2yY68m+s8sQqlgujuUkGSIh/0siDEocwZ7cQOVJSJF6t/O09zin2ZpC8zRvbGzrRVhNdvIzOZ1zC0PcV3/R081M4rr8tdsDuMGjbbcl7fRLO62Atbl0h8aCEmr/UB2L0TyTraobCZavRnNpTKKHxcVYO9LVYVgSQ8FQ2Y5M3Jj0AoqLT/XaHZYudkXAB9ecAibWFPkEszYswJMfaycejmqCYkEgNzSBgYcwOzl3b0EL6RLkt+MGGe2UaQOswDECYX/KzhrPfiwyN9rm3vublrY/PgYiUJW+70FCxEsgjyWfRbEKXNUAF00w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[LduGagvw8](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/L4UrHfZc41NL9946IxoCGQil8C9tw9dA>



Cuernavaca, Mor., 01 de diciembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización genética y funcional de la respuesta inmune citotóxica en pacientes con susceptibilidad anormal al virus del Epstein Barr**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Daniela Olivia López Rivera. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. José Luis Montiel Hernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2022-12-01 15:40:26 | Firmante

cNJ3g5oCspjApj5keVJgZkhlAJhWbVeyZWEteffYya0qyvV5Zi7IHcn/N4tKBXbp5tRP0o41NuHtvpCJabiCu7orkKVaR6iGIR6txgEPGsmu4JrpW8LvuEzLL7W1OlypVgtxhYRiUg0v7SxQgGWKVBji8nOSrPT718ms0cO6JcJDNpRHotP28J7mGd2MBABzv/ivmeKS3M/sbE2+M7YpIv2R9ijjJbBDsW+3so999FkoX7FV53bbrh3TKuL59gaLZ8Lsl8myCetWfj4crrcLkQY OaErCvtvDET1MLthzTU5ROQkj4QK11K3QzcH9Wq5c/zskv5QNAaCmluVg0bz5K/A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[fdhD4aWE5](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/2ybKlpy4WSyXqsVsC8tQsf08yp0QWubY>

