



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE POSGRADO



**IMPLEMENTACIÓN DE UN ALGORITMO MOLECULAR PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE CAUSAS GENÉTICAS ASOCIADAS CON
LINFOHISTIOCITOSIS HEMOFAGOCÍTICA (HLH).**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN MEDICINA MOLECULAR

QUE PRESENTA:

LIC. EN C. BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR MITZI VANESSA ANTÚNEZ
BARRERA

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ

CUERNAVACA, MORELOS, MEXICO JUNIO DEL 2019

FACULTAD DE MEDICINA UAEM CUERNAVACA MORELOS, MEXICO
FEBRERO 2017- FEBRERO 2019

COMITÉ TUTORAL

PRESIDENTE: DR. MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ.

SECRETARIO: DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO.

VOCAL: DR. GUSTAVO PEDRAZA ALVA.

VOCAL: DRA. DRA. SELMA CECILIA SCHEFFLER MENDOZA.

VOCAL: DRA. GABRIELA LÓPEZ HERRERA.

MIEMBROS DE JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE: DR. FERNANDO R. ESQUIVEL GUADARRAMA.

SECRETARIO: DRA. SARA ELVA ESPINOZA PADILLA.

1° VOCAL: DRA. SELMA CECILIA SCHEFFLER MENDOZA.

2° VOCAL: DRA. GABRIELA LÓPEZ HERRERA.

3° VOCAL: DR. MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT- México) le agradezco la
beca recibida durante la maestría, así como el apoyo para congresos.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, amigos y profesores
que me apoyaron y acompañaron en
esta etapa.

INDICE

RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Clasificación de las inmunodeficiencias primarias	10
1.2 Inmunodeficiencias primarias con linfocitosis familiar	11
1.3 Linfocitosis hemofagocítica familiar.....	12
1.4 Bases moleculares de la linfocitosis hemofagocítica familiar.....	15
1.5 Errores congénitos que afectan la funcionalidad de las células NK.....	19
1.6 Algoritmo molecular.....	29
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
3 JUSTIFICACIÓN.....	33
4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	35
5 OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo general	35
5.2 Objetivos específicos.....	35
6 HIPÓTESIS	36
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
7.1 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	37
7.2 Obtención de muestras, manejo y purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).....	38
7.3 Algoritmo para la clasificación de pacientes que desarrollan HLH	38

7.4 Tinción intracelular para Perforina, SAP y XIAP	39
7.5 Ensayos de Degranulación.....	39
7.6 Determinación del grado de degranulación	40
7.7 Extracción de DNA genómico.....	41
8 RESULTADOS	42
9 DISCUSIÓN.....	61
10 CONCLUSIONES.....	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

ABREVIACIONES

HLH LINFOHISTIOCITOSIS HEMOFAGOCÍTICA

SGII SÍNDROME DE GRISELLI TIPO I

CHS SÍNDROME DE CHEDIAK-HIGASHI

XLP1 SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO 1

XLP2 SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO 2

PRF PERFORINA

SAP PROTEÍNA ASOCIADA A SLAM

NK CÉLULAS ASESINAS NATURALES

CTL LINFOCITOS T CITOTÓXICOS

IDPs INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

IUIS COMITÉ INTERNACIONAL DE EXPERTOS DE LAS SOCIEDADES
INMUNOLÓGICAS

PBMCs CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

RESUMEN

Las inmunodeficiencias primarias son errores congénitos del sistema inmune que predispone a infecciones de manera recurrente y a otros tipos de trastornos, como inflamación, autoinmunidad, hipersensibilidad, y cáncer. En los últimos 20 años se ha descrito una nueva categoría de inmunodeficiencias que causan susceptibilidad a un determinado grupo de agentes infecciosos, dentro de estas, destacan las que confieren susceptibilidad a infecciones por el grupo de los herpes virus, a la fecha se han descrito más de 20 genes cuyas mutaciones predisponen al desarrollo de viremias persistentes, desordenes linfoproliferativos y linfocitosis hemofagocítica (HLH). La identificación de mutaciones genéticas asociadas a este tipo de trastornos ha permitido elucidar los mecanismos moleculares que resultan esenciales para regular la función de células inmunes e incidir en el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos y estrategias de tratamiento. HLH, es un trastorno inmune potencialmente mortal, es un síndrome asociado a varias enfermedades siendo una consecuencia de una incapacidad heredada o adquirida del sistema inmune para controlar una respuesta inmune, cuando existen antecedentes familiares o se conoce algún defecto genético, es conocida como HLH primaria o familiar (FHL) , existe en cinco tipos identificadas como FHL1 a FHL5, donde se afecta la citotoxicidad mediada por linfocitos T y células NK, también se ha descrito en otros tres desordenes que afectan el tráfico de gránulos intracelulares e incluyen al síndrome de Griselli tipo II y el síndrome de chediak-higashi y finalmente, pacientes que sufren de síndromes linfoproliferativos asociados al cromosoma X, que son XLP1 y XLP2. La caracterización de células NK y linfocitos

T en pacientes que presentan este síndrome, se realiza mediante la aplicación de un algoritmo discriminatorio entre FHL1 aFHL5, GS2, CHS, XLP1 y XLP2, mediante el uso de citometría de flujo, donde se puede medir la citotoxicidad de células NK y LT en estado de reposo y activadas, y la expresión de proteínas como Perforina y SAP. México, actualmente se carece de herramientas moleculares que permitan distinguir entre formas primarias y secundarias de HLH, tampoco que faciliten la identificación de causas genéticas en HLH, aplicar un algoritmo molecular diferencial a pacientes con diagnóstico clínico de HLH nos ayudara a la identificación de causas genéticas.

1 INTRODUCCIÓN

El sistema inmune se compone de una serie de elementos que incluyen diferentes tipos celulares, así como distintas proteínas de suero. El funcionamiento adecuado de este depende de una coordinación altamente regulada entre los varios elementos que componen al sistema inmune. Trastornos en la respuesta inmune conlleva a una serie de patologías que incluyen inmunodeficiencias primarias, autoinmunidad y/o alergias.

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son errores congénitos del sistema inmunológico. A la fecha se han descrito 344 genes relacionados con estas enfermedades[1][2]. Las IDP no solo predisponen a infecciones de manera recurrente, sino también a otros tipos de trastornos, 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 problema de salud en México y en el mundo.

Para fines de estudio, las IDP se clasifican en nueve categorías, definidas por un Comité Internacional de Expertos de las Sociedades Inmunológicas (IUIS), en su última reunión en 2017[2] .

1.1 Clasificación de las inmunodeficiencias primarias

El Comité Internacional de Expertos de las Sociedades Inmunológicas ha clasificado las IDP en nueve grupos [2] (Tabla1).

1. Inmunodeficiencias que afectan la inmunidad Celular y Humoral.
2. Inmunodeficiencias Combinadas con características asociadas o sindromáticas.
3. Deficiencias Predominantemente de anticuerpos.
4. Enfermedades de la Dis-Regulación Inmune.
5. Defectos Congénitos de los fagocitos.
6. Defectos en la inmunidad innata e intrínseca.
7. Enfermedades autoinflamatorias.
8. Deficiencias del complemento.
9. Fenocopias.

Tabla 1. Clasificación de Inmunodeficiencias Primarias Comité Internacional de Expertos.

1.2 Inmunodeficiencias Primarias con Linfohistiocitosis Hemofagocítica Familiar.

Dentro del grupo 4 de las IDP (Tabla 1) se encuentran un número de enfermedades genéticas en las cuales la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH) es la manifestación principal y son definidas como HLH primaria o HLH familiar, este grupo de inmunodeficiencias con HLH a su vez se divide en dos: con y sin hipopigmentación, ver gráfica [3].

IDP DE LA DISREGULACIÓN INMUNE		
Linfohistiocitosis Hemofagocítica (HLH)		IDP con Susceptibilidad a EBV
IDP con HLH y con hipopigmentación (albinismo parcial)	IDP con HLH Familiar	OTRAS IDP
Sx de Chediak-Higashi. LYST	Deficiencia de Perforina (FHL2). PRF1	
Sx de Griscelli tipo	Deficiencia de UNC13D/Munc 13-	

2. RAB27A	4 (FHL3). UNC13D	
Sx de Hermansky-Pudlak tipo 2. AP3B1	Deficiencia de Sintaxina 11 (FHL4). STX11	
Sx de Hermansky-Pudlak tipo 10. AP3D1	STXBP2/Munc 18_2 (FHL5) STXBP2. Enteropatía.	

Tabla 2. IDPs de la Dis-regulación de la respuesta Inmune.

IDP: Inmunodeficiencia Primaria. EBV: Virus de Epstein-Barr. Sx: Síndrome. FHL: Linfocitosis Hemofagocítica Familiar. Los nombres de los genes se muestran en negritas y en cursiva².

1.3 Linfocitosis Hemofagocítica Familiar.

La Linfocitosis Hemofagocítica (HLH), el cual se describió por primera vez en 1952 por Farquhar y Claireaux quienes la identificaron como una enfermedad fatal, la descripción inicial se realizó en dos hermanos que presentaban proliferación de macrófagos en medula ósea y fagocitosis de células sanguíneas la cual resulto ser una condición que era prevalente en familias con consanguineidad por lo que el patrón sugerido de herencia fue autosómico recesivo [4]. HLH no es un síndrome común, es un trastorno hereditario, fatal, hiperinflamatorio, clínicamente cambiante

con diversas presentaciones y se caracteriza por el desarrollo de un estado de activación excesiva de Linfocitos T y macrófagos, como consecuencia, este trastorno inmunológico es potencialmente mortal y se presente durante la infancia, aunque también puede presentarse en etapas posteriores de la vida [5]. En la mayoría de las ocasiones, HLH es desencadenada por un agente infeccioso que puede ser viral, bacteriano ó fúngico y conducen a un cuadro clínico en común, del cual resalta un estado de inflamación severa mediado por interferón- γ y otras citoquinas proinflamatorias [6][7]. Su primer signo es fiebre alta, ondulante y prolongada hasta por más de ocho días, hepatomegalia y esplenomegalia, las cuales son generalmente fatales en ausencia de tratamiento, entre otros signos y síntomas, hay presencia de citopenias de al menos dos linajes hematopoyéticos (neutropenia, anemia, trombocitopenia ó pancitopenia), disfunción de hígado (ictericia, transaminasas elevadas, hipofibrinogenemia y/o hipertrigliceridemia, alto nivel de ferritina y lactato deshidrogenasa), manifestaciones neurológicas desde parálisis del nervio craneal hasta convulsiones y disminución de conciencia. El líquido cefalorraquídeo muestra pleocitosis en donde la histopatología revela una infiltración linfoproliferativa en el bazo, el hígado, la médula ósea, los ganglios linfáticos y el sistema nervioso central [8][9]. Además de todas estas manifestaciones clínicas, un carácter distintivo de HLH con características hereditarias, es una actividad citotóxica defectuosa que conduce a una desregulación de la respuesta inmune, resultado de una activación y proliferación excesivas de las células CTL y NK, las células producen grandes cantidades de citocinas (como IFN γ , TNF α , GM-CSF). El resultado de esta secreción excesiva de citocinas pro-inflamatorias es una activación prolongada de macrófagos, los cuales

migran a sitios periféricos causando inflamación de los mismos. Esta infiltración de tejidos y órganos, produce altos niveles de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, los cuales son responsables de los signos y síntomas de laboratorio característicos de HLH [10]. De acuerdo con las guías de la Sociedad Internacional, para que una persona sea diagnosticada con HLH, se deben de cumplir con 5 de 8 criterios de diagnóstico específicos ó tener un diagnóstico molecular consistente con HLH [9].

A.- Criterios genéticos de HLH
B.- Cinco de ocho, de los siguientes criterios clínicos y de laboratorio:
1.- Fiebre
2.- Esplenomegalia
3.- Citopenias en al menos dos de las siguientes líneas:
Hemoglobina < de 90 gr/l
Cuenta de plaquetas < de 100×10^9 /l
Cuenta de neutrófilos < 1×10^9 /l
4.- Hipertrigliceridemia (> 3 mmol/l) o
5.- Hipofibrinogenemia (< 1.5 gr/l)
6.- Hiperferretinemia (> 500mg/l)
7.- CD25 soluble > 2400 U/ml
8.- Hemofagocitosis en médula ósea, bazo o ganglios linfáticos
9.- Citotoxicidad de células NK baja o disminuída

Tabla 3. Signos y síntomas para un diagnostico de HLH

HLH se categoriza en dos formas: cuando existen antecedentes familiares o se conoce algún defecto genético conocida como HLH primaria o familiar, que típicamente se manifiesta en la infancia, con anomalías en la función citotóxica de células NK y células T CD8+, heredado como un desorden autosómico recesivo y HLH secundaria, un síndrome esporádico, que está predominantemente asociado con infecciones virales y tiende a ocurrir a una edad más avanzada, pero sin anomalías genéticas identificables[10][5].

1.4 Bases moleculares de la linfocitosis hemofagocítica HLH familiar.

La forma primaria de HLH se relaciona con inmunodeficiencias primarias en las cuales existen una deficiencia en la función de las células NK y células T CD8+[11].

Las células NK representan un 10% de las células mononucleares presentes en sangre periférica. Como resultado de su activación, las células NK son capaces de montar respuestas efectoras que eliminan células infectadas o cancerosas. La función efectora más estudiada es aquella que depende de la lisis de células blanco mediante un proceso denominado —citotoxicidad natural, el cual involucra la movilización de compartimentos especializados conocidos como gránulos citotóxicos. El contenido de estos gránulos es rico en enzimas líticas como perforinas y granzimas, las cuales perforan la membrana plasmática de las células blanco e inducen apoptosis respectivamente[12].

La función citotóxica de las células NK está regulada por diferentes receptores los cuales se expresan en la superficie de estas células y son los responsables de

estimular sus funciones efectoras. Ejemplos de estos receptores son el receptor de baja afinidad para la región constante de las inmunoglobulinas FcRs (FcγRIII, CD16), o los receptores de citotoxicidad natural como NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 y NKR-P1c (NK1.1) [12]. Estos receptores están asociados con subunidades que poseen dominios especializados denominados ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, por sus siglas en inglés), los cuales transmiten señales que regulan positivamente la función citotóxica de las células NK. Como resultado de la interacción con sus ligandos, estos receptores son fosforilados en residuos de tirosina por cinasas de la familia de Src. Este evento resulta esencial ya que conlleva a una amplificación de la señal y resulta en la fosforilación de múltiples proteínas como enzimas efectoras y moléculas adaptadoras, las cuales finalmente regulan cada una de las funciones de las células NK [12].

En oposición a estas señales de activación, las células NK también expresan receptores que transmiten señales que inhiben las funciones de las células NK [12] [13]. Estos receptores contienen dominios denominados ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, por sus siglas en inglés) los cuales promueven la transmisión de señales inhibitorias. En humanos, este grupo de receptores está principalmente agrupado en la familia KIR (killing inhibitory receptors, por sus siglas en inglés) y en ratón, la mayoría de estos pertenecen a la familia Ly49 [13]. Estos receptores reconocen específicamente a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) expresadas sobre la superficie de las células blanco. Como resultado de la interacción receptor-ligando, los motivos ITIM son fosforilados en residuos de tirosina y promueven el reclutamiento y

activación de diferentes fosfatasa como SHP-1, SHP-2 y SHIP-1. Estas proteínas antagonizan las señales de activación que emanan de los motivos ITAMs mediante la desfosforilación de varias cinasas y proteínas adaptadoras [13].

Además de su función citotóxica, las células NK poseen la maquinaria necesaria para producir y secretar diferentes factores solubles como citosinas inflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento, los cuales median efectos protectores e influyen en el reclutamiento y función de otras células hematopoyéticas. Por ejemplo, las células NK son las principales productoras de INF γ durante las fases iniciales de una infección lo que potencia las respuestas dependientes de células T

durante infecciones virales. Finalmente, las células NK promueven y regulan la inmunidad a través de mecanismos de co-estimulación que son dependientes de su interacción física con otras células [14].

Por ejemplo, a través de establecer contactos con células dendríticas y neutrófilos, las células NK promueven o restringen las respuestas inmunes adaptativas. Por su participación directa en la eliminación de células infectadas y cancerosas, en los últimos años se ha generado un renovado interés por el uso de las células NK en diversas estrategias terapéuticas para el tratamiento de diferentes enfermedades como leucemias. Consecuentemente, existe un gran interés en conocer a las moléculas y los mecanismos que regulan sus funciones.

A pesar de las semejanzas en los mecanismos de degranulación entre células NK y células T CD8+ citotóxicas existen diferencias importantes 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 la activación en células NK es el resultado de la convergencia de distintas señales intracelulares que emanan de diferentes receptores de superficie. Otra diferencia importante radica en los tiempos en que ambos tipos celulares adquieren los diferentes elementos para constituir los gránulos citotóxicos. 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[15].

El proceso celular que permite mover los gránulos citotóxicos y otros elementos hacia la sinapsis inmunológica para posteriormente lograr su fusión a la membrana plasmática, ocurre en eventos discretos y participan distintos elementos como enzimas, proteínas adaptadoras y elementos del citoesqueleto. El primero de estos eventos permite mediar la reorganización de los gránulos citotóxicos en un evento conocido como polarización. En este evento, los gránulos citotóxicos son dirigidos hacia la sinapsis inmunológica. El segundo evento de importancia es la fusión de la membrana que recubre los gránulos citotóxicos con la membrana plasmática en un evento conocido como degranulación [16]. Cada uno de estos dos eventos, tanto la polarización como la degranulación están altamente coordinado 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[15]. La importancia de estos eventos en la función efectora de las células

citotóxicas queda demostrada por las diferentes patologías que son resultado de mutaciones en genes que codifican para varias proteínas que participan en el tráfico vesicular[17][18][19][20] .

1.5 Errores congénitos que afectan la funcionalidad de las células NK.

La forma genética de HLH en donde se afecta el proceso de degranulación, se clasifica en cinco tipos, de FHL1 a FHL5 en donde se ve afectado a diferentes niveles el proceso la liberación de gránulos[21], en FHL1 aún se desconoce el gen afectado pero se ha asociado con alguna región del cromosoma 9q21.3 y representa un 10% de las formas de FHL[22][18]. FHL2 causada por mutaciones en el gen PFR-1, que contiene 3 exones de los cuales solo el 2 y 3 codifican para la proteína Perforina de 555 aminoácidos la cual es una forma inactiva, que sufre el corte del péptido señal de unos 21 aminoácidos, dando lugar a la forma activa de 60 KDa, este corte permite la exposición del dominio de unión a Calcio, uno de los pasos cruciales para la formación del poro y la actividad citotóxica [19], además de este dominio también presenta un complejo de ataque a membrana MACPF, que guarda un 20% de identidad al complejo de ataque a membrana (MAC) de los componentes del complemento c9 y c2 capaces de unirse a la membrana de una manera calcio dependiente, tal dominio media la oligomerización y un dominio EGF (factor de crecimiento epidermal), los monómeros forman un poro por oligomerización en la membrana de la célula blanco, a través del cual granzima entran para inducir muerte celular, se conocen más de 50 mutaciones diferentes que afectan el plegamiento de la proteína y representan entre un 13-50% de los pacientes con FHL [18][23], se ha demostrado que en modelos murinos donde se induce la patogénesis, hay un incremento en

proliferación, activación e infiltración de macrófagos así como linfocitos T CD8+, además muestran niveles elevados de citocinas como IFN γ , TNF α e IL10 las cuales contribuyen a la inmunopatología [18]. Casos de FHL3 representa aproximadamente un 17-30% de los pacientes con FHL, los cuales presentan mutaciones en el gen UNC13D que codifican a Munc-13-4, que llevan a una proteína no funcional en células citotóxicas[18], Munc-13-4 tiene un papel en el paso de priming, ocurrido antes de la fusión con la membrana plasmática, por tanto, defectos en estas proteínas causan una degranulación defectuosa. UNC13D consta de 32 exones cada uno de entre 36pb a 235 pb que codifican para una proteína de 1090 aa, se han explorado algunas mutaciones en modelos murinos donde muestran síntomas de HLH, así como una excesiva expansión y proliferación de macrófagos y linfocitos T CD8+ y también elevados niveles de citocinas como IFN γ [24]. En la forma familiar FHL4 las mutaciones están localizadas en el gen STX11 que codifica a Sintaxina 11 un miembro de la familia de proteínas SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors), esta proteína está involucrada en la regulación de la fusión de membranas, por tanto es requerida para la liberación de gránulos de células NK y linfocitos T CD8+[24], aproximadamente un 10% de pacientes con FLH presentan mutaciones en el gen STX11, que consta de 2 exones, de los cuales el exón 2 contiene toda la secuencia codificante para Sintaxina 11 de 287 aa [18]. En 2009 fue descubierto un nuevo gen ligado a HLH familiar FHL5 con mutaciones en el gen STXBP2 compuesto de 19 exones que codifica a la proteína de unión a sintaxina 2 ò Munc18-2 una proteína de 604 aminoácidos que ha mostrado una asociación con sintaxina 11 para formar un complejo SNARE, por tanto, regulando

la fusión de la membrana, aproximadamente de un 6-13% de pacientes con HLH familiar tienen mutaciones en el gen STXBP2[18]. Como es de notar cada uno de estos genes codifica para proteínas involucradas en la degranulación mediada por linfocitos T y células NK, y de acuerdo a lo encontrado en las mutaciones generadas también se podría explicar la severidad de la enfermedad desde una menor observada en pacientes con FHL4 comparada con los pacientes con FHL2 y FHL3 [25], además se demostró que la incidencia varía dependiendo del grupo étnico al cual se pertenece [26]. La presencia de HLH también se ha descrito en otros tres desordenes asociados a hipopigmentación, con la incidencia de un 50% a 85 % en casos de síndrome de Chediak higashi (CHS), en la mayoría de síndrome de Griselli (GS) y un solo caso en el síndrome de Hermanski pudiak tipo 2 (HPS2) [27]; clínicamente están caracterizadas con anomalías en la pigmentación de la piel, cabello e iris, una característica de desórdenes genéticos con inmunodeficiencia, la cual es dada por defectos en el tráfico de gránulos intracelulares conocidos como melanosomas de células llamadas melanocitos, llevando a defectos en la exocitosis del pigmento melanina, la cual produce la coloración en piel, pelo y ojos, también presentan características como nistagmo, estrabismo, síntomas hematológicos que varían desde sangrados leves, como se observa en pacientes con HPS2, hasta el síndrome hemofagocítico, como se observa en pacientes con CHS y GS2, diátesis hemorrágica debido a la alteración de la exocitosis de los agentes de coagulación plaquetaria, infecciones bacterianas recurrentes y graves, además de afectarse la citotoxicidad de las células NK y T, siendo una característica que estos tres síndromes comparten con todas las otras formas de HLH familiar, además de una alta presencia de

citocinas. El síndrome de Griselli tipo II (GS2) es caracterizado por mutaciones en el gen RAB27A que consta de 7 exones de los cuales solo codifican del 2 al 6 a la proteína Rab27a de 221 aminoácido, la cual es una GTPasa pequeña con función regulatoria en el tráfico vesicular y fusión de membrana [18], teniendo un papel importante en el docking de los gránulos citotóxicos con la membrana plasmática, mutaciones resultan en defectos severos en la degranulación de células T y NK, Rab27a se conoce interactúa con Munc13-4 por tanto existe una relación con FLH3, en los pacientes con GS2 el desarrollo de HLH es referido como la fase acelerada y por lo general ocurre en el primer año de vida. El síndrome de Chediak-Higashi (CHS) es un desorden autosómico recesivo caracterizado por albinismo parcial asociado con disfunción inmunológica, diátesis hemorrágica y un progresivo deterioro inmunológico en donde el riesgo de HLH se estima en un 85% de los casos dentro de la primer década de vida del paciente, el gen afectado identificado como causal de CHS es LYST que consta de 53 exones, que codifican para la proteína reguladora de tráfico lisosomal LYST, una proteína citosólica de 3,801 aa con un peso molecular de 430 KDa la cual es altamente conservada en la evolución y es expresada a bajos niveles en todos los tipos celulares, la función de LYST no es del todo conocida pero se ha hipotetizado que regula el tamaño y la fusión/fisión de lisosomas así como el tráfico de proteínas y el sorting de proteínas en los lisosomas, las mutaciones características resultan en la aparición de lisosomas gigantes que presentan fallas en el movimiento a lo largo de los microtúbulos, la exocitosis de los lisosomas secretores entonces está dañada dando lugar a una citotoxicidad defectuosa. El síndrome de Hermansky Pudiak 2, es el único tipo con presencia de HLH, se han identificado mutaciones en el gen

AP3B1 compuesto de 27 exones, que codifican a la subunidad β 3A del complejo de proteína adaptadora 3 (AP-3) de 1094 aa, que dirige el tráfico postraduccional de proteínas del aparato de Golgi a los lisosomas. Defectos en el complejo AP3 resulta en pérdida de localización de proteínas y daño secreción de lisosomas, pacientes con HPS2 exhiben defectos citotóxicos lo cual sugiere un incremento en el riesgo de HLH pero solamente un caso de HLH ha sido descrito en la literatura. Finalmente, pacientes que sufren de síndromes linfoproliferativos asociados al cromosoma X, pueden presentar síntomas de HLH en esta condición las mutaciones involucradas no afectan directamente a proteínas involucradas en la vía citotóxica, esta predisposición está asociada con la extrema susceptibilidad a infección con el virus de Epstein-Barr (VEB), el cual puede provocar linfoproliferación maligna, mononucleosis infecciosa fatal o disgammaglobulinemia. En contraste con FHL, GS2, CHS y HPS2, los pacientes con XLP no siempre muestran una función citotóxica anormal, los dos subtipos son XLP tipo 1 (XLP1) y XLP tipo 2 (XLP2) causadas por diferentes mutaciones. XLP1 es cauda por mutaciones en el gen SH2D1A de 4 exones que codifica a la proteína asociada a la molécula linfocitaria activadora de señales SAP de 128 aa, esta proteína adaptadora se asocia al receptor activador 2B4 en células NK y también se une a las moléculas co-estimuladoras de SLAM en células T y B , entonces se piensa que SAP promueve la función efectora de las células T, NK, NKT y posiblemente B, en pacientes con deficiencia de SAP, se puede dañar la citotoxicidad de células NK y T CD8+, se estima que HLH ocurre en un 58% de pacientes con XLP1 más comúnmente seguido de una infección con VEB, el otro subtipo de síndrome proliferativo ligado al cromosoma X es XLP2 el cual acarrea mutaciones en el gen

BIRC4 que consta de 7 exones, los cuales codifican para la proteína inhibidora de apoptosis ligada al X (XIAP) de 497 aa, XIAP es una potente proteína anti-apotótica que se une directamente a caspasas, principales enzimas responsables de la muerte celular, para actuar como inhibidor de su actividad, mutaciones en BIRC4, incrementan la susceptibilidad de los linfocitos para activar la muerte celular, reduciendo el tamaño así de la población activa, aunque esto parece inconsistente con HLH causada por células T hiperactivadas, los pacientes con deficiencia de XIAP pueden exhibir defectos en la citotoxicidad similares a los de los pacientes con deficiencia de SAP.

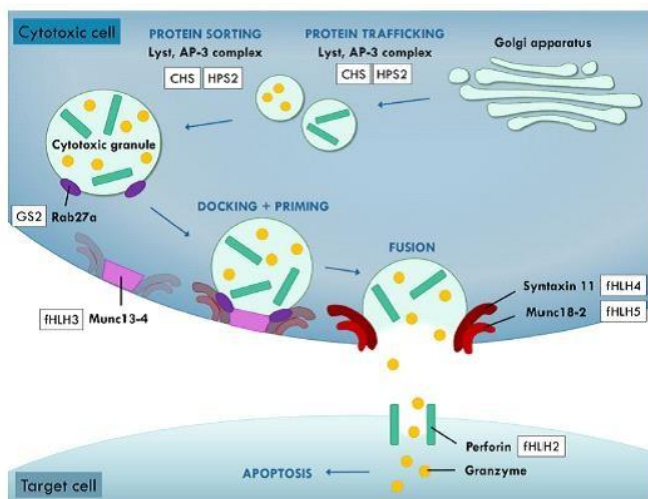


Figura 2. Representación del proceso de liberación de gránulos citotóxicos.

HLH Subtypes and their Genetic Defects

Genetic HLH		
HLH Subtype	Gene/Protein	Function
FHL1	Unknown	Unknown
FHL2	<i>PFR1</i> /perforin 1	Cell lysis, membrane pore formation
FHL3	<i>UNC13D</i> /Munc 13-4	Cytolytic granule exocytosis
FHL4	<i>STX11</i> /syntaxin 11	Intracellular vesicle trafficking
FHL5	<i>STXB2</i> /syntaxin binding protein 2 or <i>UNC18B</i>	Intracellular vesicle trafficking
Griscelli syndrome type 2	<i>RAB27A</i> /Rab27a	Vesicle docking on microtubules
Chédiak-Higashi syndrome	<i>LYST</i>	Vesicle maturation and sorting
Hermansky-Pudlak syndrome type 2	<i>AP3B1</i>	Encoding β subunit of AP3, vesicle maturation and transport
XLP type 1	<i>SH2D1A</i> /SAP protein	Polarization of cytolytic granules for transport to the immunological synapse
XLP type 2	<i>BIRC4</i> /XIAP protein	Unclear

XLP, X-linked proliferative syndrome.

Tabla 2. Clasificación de HLH Primaria.

Interesantemente una alteración en la función de células citotóxicas (células NK y CTLs) es característico en HLH y se incluye como uno de los criterios de diagnóstico, siendo el único parámetro inmunológico evaluado. Recientemente se han desarrollado ensayos de degranulación mediante Citometría de flujo, una herramienta biotecnológica que evalúa características de una sola célula, como el fenotipo y función celular, y es aplicada en casos de HLH, lo que posibilita la aplicación de un procedimiento que en menos de 12 horas permite identificar y clasificar las formas primarias de HLH, también permiten identificar de manera rápida a pacientes con alteraciones en la expresión proteínas como el caso de perforina, SAP y XIAP, permitiendo así diagnosticar a pacientes con FHL-2, XLP1 y XLP2 respectivamente. Lo anterior permite establecer un mejor criterio de diagnóstico el cual puede ser confirmado por estudios genéticos. Por lo tanto, ensayos que cuantifican la liberación de los gránulos citotóxicos o la expresión de proteínas implicadas en mediar la citotoxicidad representan una herramienta útil para un primer nivel de diagnóstico en pacientes con degranulación defectuosa para el caso de FHL3-5, síndrome de Chediak, Griselli ó determinando la expresión de proteínas intracelulares como en el caso de FHL2, XLP1 ò XLP2.

A la fecha se conocen los diferentes patrones mostrados por la degranulación de células NK ó linfocitos T CD8+ en cada uno de los casos familiares, mediante ensayos de degranulación, así como la determinación de proteínas intracelulares en la población celular de interés, dándonos de manera indirecta algún defecto en las proteínas involucradas en la degranulación. Para realizar los ensayos de

degranulación es necesario la determinación de una proteína que nos indique si el proceso de liberación de gránulos se realiza de manera correcta, en un proceso de degranulación normal las células NK como de los linfocitos T CD8+, después de ser activados y seguidos de todas las señales activadoras, llevan a la liberación de gránulos líticos los cuales están revestidos de la proteína lisosomal asociada a membrana 1 (LAMP1 o CD107a), esta proteína es una proteína de membrana altamente glicosilada, representa aproximadamente el 50% de las proteínas en la membrana lisosomal, tiene colas citoplasmáticas cortas y la parte glicosilada del lado luminal de la vesícula está involucrada en protección a la membrana del ataque por las enzimas líticas contenidas en los gránulos líticos, la función precisa aún no está clara y recientemente es un marcador de la degranulación de linfocitos T CD8+ citotóxicos y también de células NK donde se mostró una sobrerregulación en la superficie después de la estimulación, ya que aparece en superficie después de la fusión de la membrana, aunque el papel biológico en las células NK permanece desconocida, es claramente una proteína que nos puede ayudar de manera indirecta a tener un estimado de degranulación por parte de las células NK como de los CTLs.

En el caso de FHL2 se conocen los patrones mostrados en la degranulación de células NK como linfocitos T CD8+, el caso de las células NK, son co-incubadas con la línea blanco K562 Figura 2A y se determina el porcentaje de expresión en células NK de la proteína CD107a, para el caso de los linfocitos T CD8+ se incuban con la línea P815 y se determina el porcentaje de células que son positivas para CD107a Figura 2B, para estos pacientes se espera un

degranulación normal tanto en NKs como en T CD8+, debido a que no se afecta ninguno de los procesos de liberación de gránulos citotóxicos sino más bien se afecta la expresión de Perforina, en cualquiera de las dos células citotóxicas, tales mutaciones llevan a la expresión de una proteína trunca y no funcional, o afectando algún motivo importante en la función llevándola en ambos casos a una posible degradación prematura, en el caso de la determinación del porcentaje de expresión de CD107a en linfocitos T CD8 se encuentra una expresión baja pero presente en comparación de las otras formas familiares. La forma de determinar que se está ante un caso de FHL2 es midiendo el porcentaje de expresión de Perforina mediante la permeabilización en células NK o linfocitos T CD8+ y posterior medición de la expresión de la proteína Figura 2C este es un claro caso FHL2 ya que muestra un porcentaje expresión del 1% de perforina.

Para el caso de FHL3 los ensayos de degranulación tanto en células NK Figura 2^a como T CD8+ Figura 2B los pacientes, mostraron una degranulación defectuosa, pues se afecta el paso de priming debido a defectos en la proteína Munc13-4, sin afectar la expresión de otras proteínas involucradas como perforina.

Los casos de FHL4 muestran una degranulación defectuosa en células NK y linfocitos T CD8+ recordando que en pacientes con esta forma familiar se ve afectada la proteína syntaxina 11 involucrada en la fusión de las membranas, y por tanto el proceso de degranulación se ve afectado, en comparación con células estimuladas con IL2 se nota un restablecimiento de la citotoxicidad en células NK en estos pacientes explicando así la menos severidad de la enfermedad.

FHL5 esta forma familiar es recientemente descrita en donde la proteína afectada es STXBP2 involucrada en la fusión, por tanto se espera que exista una degranulación defectuosa tanto en células NK como en linfocitos T CD8+.

En el caso de los síndromes asociados a problemas de pigmentación, los casos de chediak higashi muestran una degranulación en células NK y linfocitos T CD8+ defectuosa, en el caso del síndrome de Griselli también presentan una degranulación defectuosa tanto en células NK como en linfocitos T CD8.

En el caso de los síndromes proliferativos se ha encontrado que no existen problemas en la degranulación pero se puede determinar la expresión tanto de la

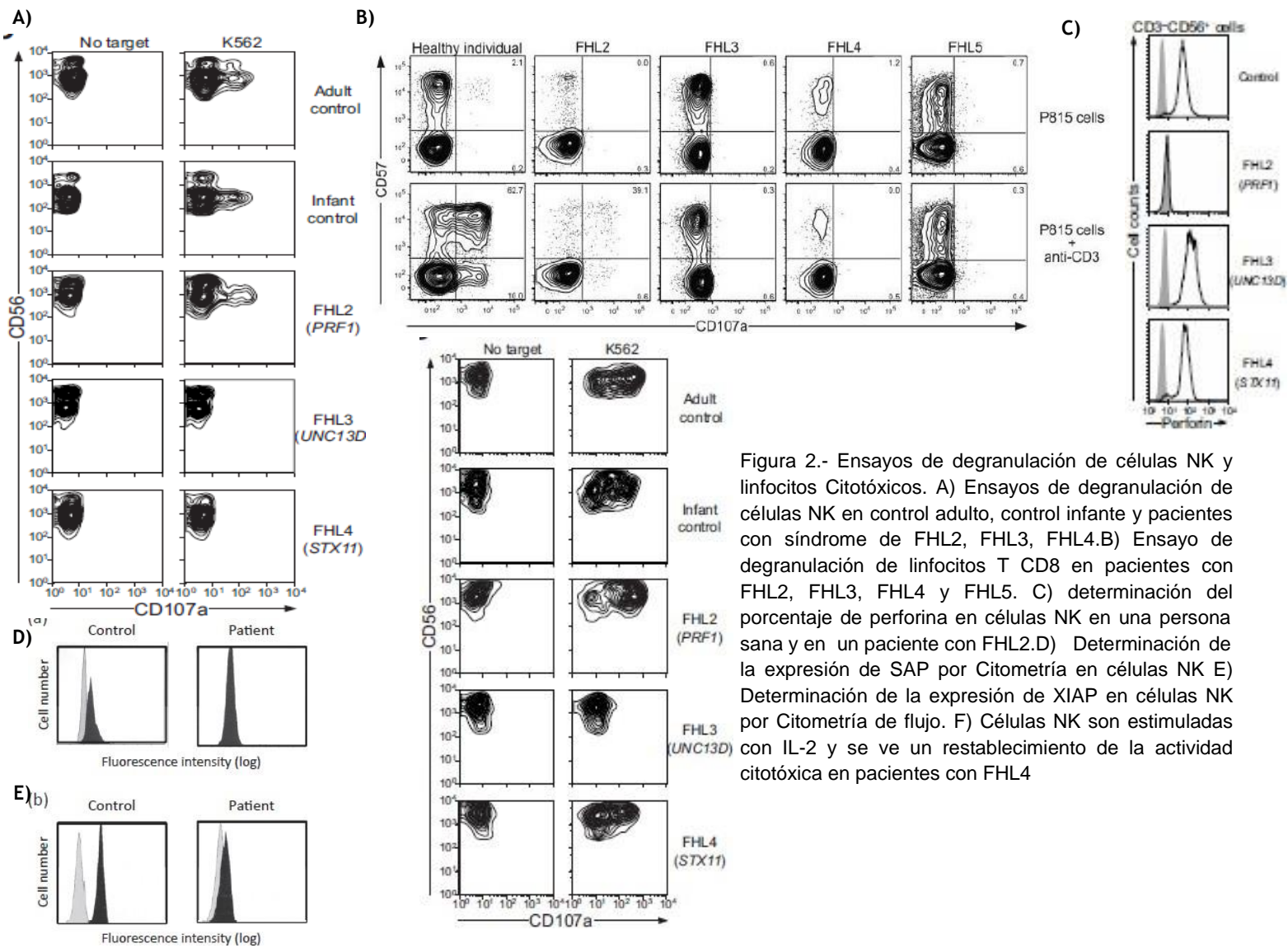


Figura 2.- Ensayos de degranulación de células NK y linfocitos Citotóxicos. A) Ensayos de degranulación de células NK en control adulto, control infante y pacientes con síndrome de FHL2, FHL3, FHL4. B) Ensayo de degranulación de linfocitos T CD8 en pacientes con FHL2, FHL3, FHL4 y FHL5. C) determinación del porcentaje de perforina en células NK en una persona sana y en un paciente con FHL2. D) Determinación de la expresión de SAP por Citometría en células NK E) Determinación de la expresión de XIAP en células NK por Citometría de flujo. F) Células NK son estimuladas con IL-2 y se ve un restablecimiento de la actividad citotóxica en pacientes con FHL4

proteína SAP como la proteína XIAP en células NK así como en linfocitos T CD8+

1.7 ALGORITMO MOLECULAR.

En el artículo del grupo del Dr Bryceson “*Aprospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes*” donde evalúan ensayos de degranulación basados en la regulación de superficie de CD107a en células asesinas naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos en una cohorte de 494 pacientes remitidos para evaluación por sospecha de HLH, desarrollando un algoritmo que permite una clasificación rápida y confiable de los pacientes figura 4.

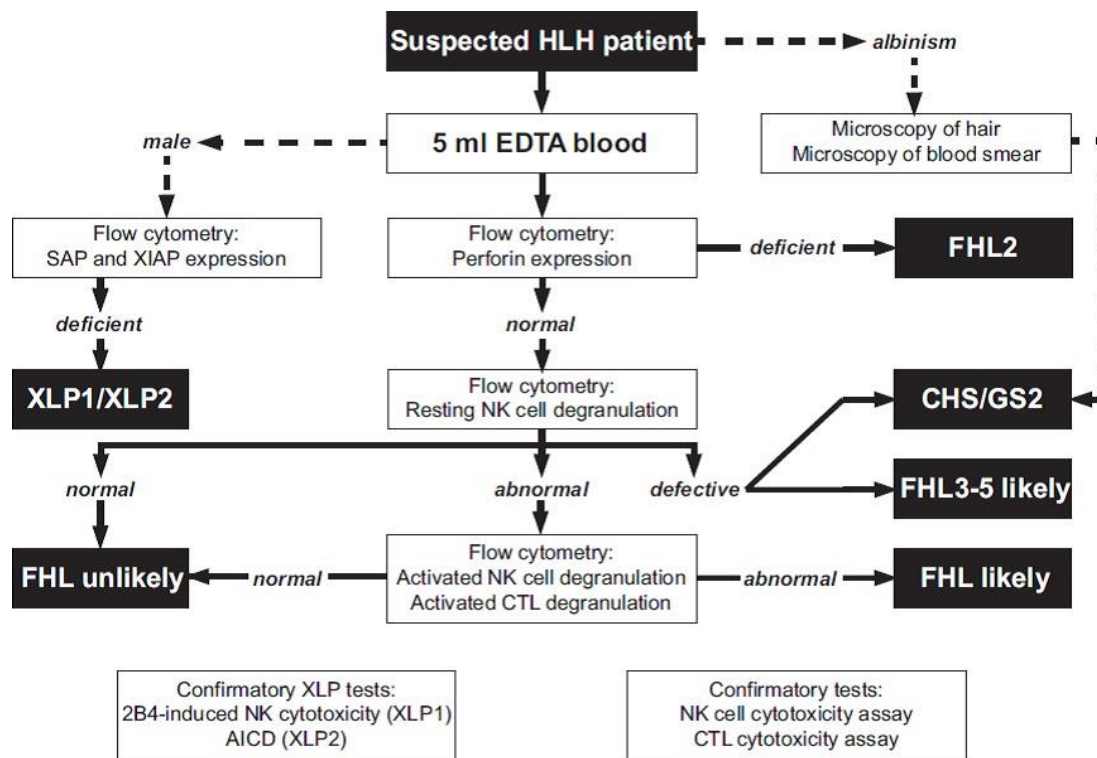


Figura 3. Algoritmo molecular propuesto en base a ensayos de degranulación en pacientes con sospecha de HLH del grupo del Dr. Y. Bryceson. AICD indica la activación inducida por muerte celular.

Se realiza un procedimiento diagnóstico inmunológico mediante ensayos que evalúan la competencia funcional de las células NK y CTL a través de ensayos de degranulación. Este procedimiento también mide la expresión de las proteínas SAP, XIAP y perforina y se complementa con algunas características fenotípicas como son presencia de albinismo. De acuerdo a lo anterior, se puede establecer un diagnóstico diferencial que permite establecer un tratamiento de acuerdo a la categoría en la cual entran los pacientes diagnosticados con HLH. Para la forma adquirida se tratan los factores desencadenante lo que se suprime la activación exagerada del sistema inmune, mientras que en la forma familiar el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas constituye el único tratamiento curativo.

Un estudio reciente estimó su prevalencia en Texas resultando en al menos 1 caso en 100,000 personas de menos de 18 años, adicionalmente a esto se sabe que el síndrome varía de acuerdo a la región geográfica, se reportó una incidencia de 0.12 casos por 100,000 personas de no menos de 15 años en Suecia, 0.342 en 100,000 en Japón con una incidencia anual de 1 en 800,000 y Turquía tiene la incidencia más alta 7.5 en 10,000 junto con un incremento en consanguinidad y alta frecuencia de defectos en perforina, mientras que en México se desconoce de la prevalencia.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las inmunodeficiencias primarias son errores congénitos del sistema inmune que resultan en más de 350 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. Su frecuencia en la población en general es de uno por cada dos mil quinientos nacimientos vivos y su prevalencia global se desconoce, pero se calcula que debe oscilar entre 1:5000 y 1:500000 dependiendo del tipo de inmunodeficiencia y la población de estudio. Avances recientes en los campos clínicos, epidemiológicos y moleculares han ayudado a entender la etiología de estas enfermedades, sin embargo, es claro que aún existe mucho por conocer. Por ejemplo, las variaciones geográficas y étnicas tienen una importante influencia sobre la frecuencia y manifestaciones clínicas de cada una de los más de trescientos genes causantes de algún tipo de inmunodeficiencias primaria, lo que señala la importancia de estudios regionales.

En México nacen aproximadamente 2.7 millones de niñas y niños cada año de los cuales 5500 presentarán algún tipo de inmunodeficiencia primaria o congénita y de estos 350 cursarán por una forma grave. Sin embargo, aproximadamente un 70 % de esta población no tienen un diagnóstico molecular o genético.

En base a lo anterior, esta propuesta pretende abordar el estudio de enfermedades que confieren susceptibilidad a enfermedades infecciosas desde un

perspectiva genética y molecular. Debido al número importante de causas genéticas (más de 220) que confieren susceptibilidad a enfermedades infecciosas y el tiempo de duración de la propuesta (dos años), este proyecto se enfocará al estudio de las causas genéticas y mecanismos moleculares en pacientes con susceptibilidad fatal a infecciones por herpes virus, principalmente EBV.

3. JUSTIFICACIÓN

En México, en 2009 se creó en el Instituto Nacional de Pediatría un centro de estudio e investigación para las inmunodeficiencias primarias (IDP). Aquí se reciben casos de pacientes con sospecha de IDP de todo el país. Durante los años de 2010 y 2011 un grupo de médicos inmunólogos de esta Unidad realizó una campaña de difusión para Médicos de primer contacto en la república Mexicana con una cobertura del 72%. Desde entonces la historia de las IDP en México ha cambiado drásticamente, 1.- Se sospecha y se envían estos casos 2.- Se pueden estudiar y se puede hacer un diagnóstico funcional y molecular de muchos de los casos de IDP. 3.- El conocimiento sobre estos padecimientos se ha incrementado desde el punto de vista de moléculas implicadas en la red de señalización inmunológica, diagnósticos específicos y en tratamientos para las IDPs de los diferentes grupos. En algunas de las IDP como el grupo de las humorales se ha tenido una tasa media de crecimiento en el diagnóstico molecular del 25% del 2014 al 2017. Solamente del Estado de Colima no hemos recibido ningún paciente, pero del resto de los estados hemos tenido pacientes con IDPs. Así mismo en la facultad de Medicina del Edo del Morelos se inició un grupo en colaboración como red de estudio de las IDPs en el País, valorando citotoxicidad en pacientes que pueden tener problemas a este nivel y sospecha de IDPs.

El grupo de IDP con susceptibilidad a EBV y aquellas que hacen como complicación HLH aún no han sido completamente abordadas para su estudio. Por lo tanto este proyecto se encargará de hacer estudios funcionales y el diagnóstico molecular de este grupo de pacientes teniendo ya un soporte de médicos inmunólogos clínicos especialistas en el diagnóstico clínico en todo el país, un Centro de Investigación especializado en el INP y con capacidad de liderazgo Nacional y un Centro de Investigación en la facultad de Medicina del Edo de Morelos con la experiencia de varias pruebas funcionales y moleculares en IDPs. Esta línea de investigación abre la oportunidad de crear conocimientos con aportaciones nacionales e internacionales sobre el manejo inmunológico del EBV, la oportunidad de buscar alternativas en tratamientos para estos pacientes y establecer otra líneas de la mano como cáncer y EBV.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La implementación y aplicación de un algoritmo molecular basado en la caracterización fenotípica y funcional de células citotóxicas como células NK y linfocitos T CD8 nos permitirá establecer diagnósticos diferenciales que favorezcan la identificación de causas genéticas en pacientes con infecciones severas y persistente con EBV?

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Aplicar el algoritmo molecular a pacientes con diagnóstico clínico de HLH para la identificación de causas genéticas.

5.2 Objetivos Específicos

- Se reclutó en un tiempo de un año, 8 pacientes pediátricos que cumplieron con los criterios clínico de HLH o que presentaron manifestaciones clínicas de síndromes asociados con HLH.
- Se aplicó este algoritmo en pacientes pediátricos con que cumplieron con los criterios clínicos de HLH o que presentaron manifestaciones clínicas de síndromes asociados con HLH.
- En base a los resultados del algoritmo molecular, se estableció una categorización de los pacientes para posteriores estudios genéticos.

6. HIPOTESIS

El establecimiento de un algoritmo molecular nos permitirá establecer criterios diferenciales a nivel molecular que nos acerquen a identificar las causas genéticas en pacientes pediátricos que cumplan con los criterios clínicos de HLH.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión

1. Pacientes que cuenten con estudios de laboratorio y cumplan con los criterios clínicos de HLH o infección refractaria por EBV (Tablas I).
2. Pacientes con biopsia de médula ósea que muestre la presencia de células fagocitando aunque no cumple con los 5 de los 9 criterios para el diagnóstico clínico de HLH.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que cursen con una entidad genética por aneuploidías cromosómicas (Síndrome de Down, Síndrome de Turner, etc).
2. Pacientes con trasplante de médula ósea o alguna otra condición no genética que lleve a la inmunosupresión.
3. Pacientes con diagnóstico de enfermedades autoinmunes bien definidas.
4. Pacientes con alguna inmunodeficiencia adquirida.
5. Pacientes con diagnóstico de patología oncológica.

Criterios de eliminación

1. Pacientes cuya muestra de DNA no cumpla con los criterios de calidad (concentración, integridad y pureza) para su análisis.
2. Pacientes cuya muestra sea insuficiente en cantidad o no se haya podido obtener al momento del diagnóstico.
3. Padres que ya no deseen que su hijo continúe en el estudio después de haber aceptado inicialmente.

7.2 Obtención de muestras, manejo y purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Durante un periodo de 1 año, se reclutaran muestras de sangre periférica (5-10 ml) mediante punción venosa en viales tratados con EDTA o heparina. Las muestras serán de pacientes pediátricos con sospecha o un diagnóstico clínico de inmunodeficiencias primarias de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión. Por cada paciente también se obtendrá muestra de un individuo sano. Para lo anterior se contará con previo consentimiento informado de los padres y asentimiento en los niños mayores de 12 años de edad. Las muestras serán canalizadas principalmente del Instituto Nacional de Pediatría de la ciudad de México, el cual funciona como unidad de referencia nacional para el diagnóstico clínico y tratamientos de inmunodeficiencias primarias. Adicionalmente, también se recibirán muestras de hospitales de primer, segundo o tercer nivel del sector salud a nivel Nacional (Hospital del Niño Morelense, ISSSTE, IMSS etc.). Todas las muestras serán enviadas por mensajerías exprés y procesadas en un tiempo no mayor a 48 horas. Las células mononucleares de sangre periférica serán purificadas por métodos convencionales (Ficoll-Hypaque)

7.3 Algoritmo para la clasificación de pacientes que desarrollan HLH

Este algoritmo está basado en ensayos funcionales que permiten evaluar la competencia funcional de las células NK y linfocitos T CD8 citotóxicos así como los niveles de expresión de perforina, SAP y XIAP. Todos estos ensayos se realizan por citometría de flujo. A continuación se describen los ensayos sistemáticos (algoritmo) que nos permitirán establecer un diagnóstico diferencial

de laboratorio. Este algoritmo podrá usarse de manera rutinaria para establecer de manera rápida un diagnóstico diferencial de los pacientes con susceptibilidad a infecciones por EBV o que desarrollan HLH.

7.4 Tinción intracelular para Perforina, SAP y XIAP.

Para cada tinción, un aproximado de 2×10^5 PBMCs serán teñidas para CD3, CD56 y CD16 usando anticuerpos específicos acoplados a diferentes fluorocromos. Posteriormente, las células serán fijadas y permeabilizadas con la solución cytofix/cytoperm de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BD Bioscience) para posteriormente ser teñidas intracelularmente utilizando con un anticuerpo anti-perforina (dG9) acoplado a PE o con un control de isótopo. Para SAP, se utilizará un mAb anti-SAP acoplado a PE (clona 1C9, Abnova) o un mAb anti-XIAP (BD Bioscience). Finalmente, las muestras serán adquiridas y analizadas en un citómetro FACSCanto II utilizando diferentes estrategias de adquisición. Estos ensayos tienen la ventaja de que en un tiempo menor a 12 hrs, se puede descartar o sospechar el diagnóstico de tres inmunodeficiencias primarias relacionadas con susceptibilidad a infecciones por EBV (FHL-2, XLP1 o XLP2).

7.5 Ensayos de Degranulación

Con la finalidad de evaluar la función citotóxica en células NK y CTLs, las células mononucleares se incubarán con PHA (1,25 ug/ml) e IL-2 (100U/ml) por 72 horas. En ensayos paralelos, también se evaluará la degranulación en células NK no activadas. Posteriormente, las células efectoras (NKs Y CTLs) se incubarán con

células K562 o P815 respectivamente por 4 o 2 horas respectivamente, a 37 grados centígrados y al término de este tiempo de incubación, las células serán marcadas con el siguiente cocktail de anticuerpos: anti-CD8, anti-CD56, anti-CD107a y anti-CD3. La mezcla se incubara por un tiempo adicional de 30 min a 4 grados centígrados. Finalmente, las células serán adquiridas en un citómetro de flujo utilizando diferentes estrategias de adquisición. En base a la expresión de CD107a en la superficie celular, estos ensayos no permitirán conocer el estado funcional de células citotóxicas (NK y CTLs). Estos ensayos nos permitirán identificar pacientes con posible afectación en los genes UNC13D, STX11, STXBP2, LYST y RAB27A.

7.6 Determinación del grado de degranulación

Para asignar un valor que nos permita cuantificar la degranulación (expresión de CD107a en la superficie celular) en células NK y CTLs, los resultados se expresan como Δ CD107a que es la diferencia entre el % de células que expresan CD107a en superficie después de la incubación con células blanco y el % de células que expresan CD107a en la superficie después de la incubación con solo medio. En el caso de los CTLs el Δ CD107a que es la diferencia entre el % de células que expresan CD107a en superficie después de la incubación con P815 que fueron estimulados con el anticuerpo CD3 y el % de células que expresan CD107a en la superficie después de la incubación con p815 que no se estimularon con el anticuerpo CD3.

7.7 Extracción de DNA genómico

Por medio del Kit de extracción DNA

8. RESULTADOS

El algoritmo molecular se aplicó a nueve pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión.

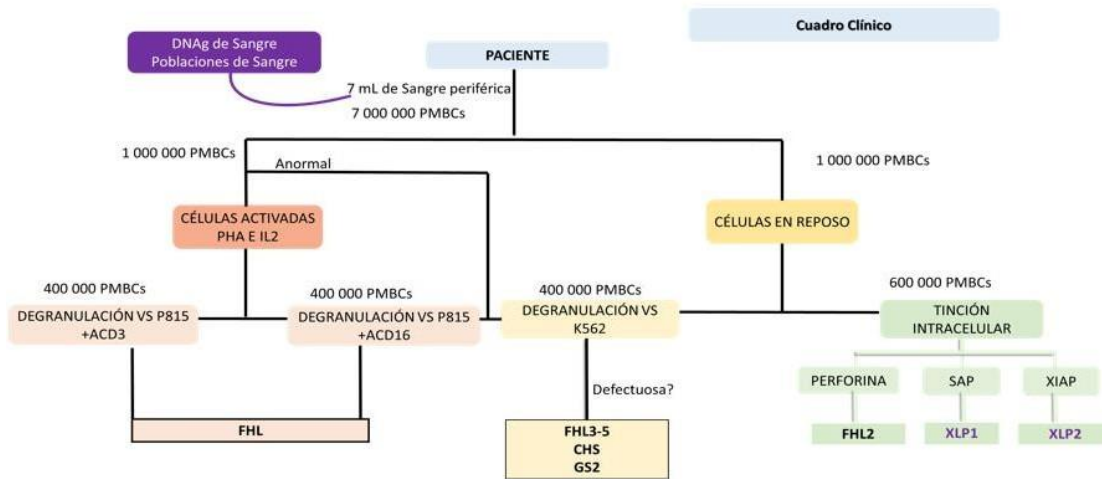


Figura 2. Algoritmo para la identificación de causas genéticas asociadas a HLH. La obtención de DNAg y tinción de poblaciones celulares se muestran en morado como paso adicional. En dirección al flujo se puede realizar de manera simultánea los ensayos de degranulación de CTL y Células NK, mostrado en tonos rosas y amarillos. En la parte derecha en tonos verde se muestra el flujo para determinar la expresión de proteínas intracelulares como Perforina y SAP, recordando se debe de elegir la población sea en CTL o NK.

PACIENTE 01

Este paciente presentó un diagnóstico de Síndrome Hemofagocítico Secundario a VEB y cumplió con seis de los ocho criterios: Fiebre de más de 38°C, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipofibrinoginemia, hiperferritinemia y la presencia de células hemofagocitando en medula ósea. De acuerdo a lo anterior, se le aplicó el algoritmo molecular. Los ensayos que permiten evaluar la expresión de SAP en células NK demostraron que los porcentajes de células NK

que expresan SAP son similares entre el paciente (99.5%) y control sano (99.5%). De acuerdo a estos resultados se pudo descartar un caso de XLP1. Los ensayos funcionales en CTLs funcionales de degranulación en células NK en reposo, así como en CTLs, además de la expresión de Perforina y SAP para descartar un posible caso de FHL2 ó XLP1 respectivamente. En la degranulación en células NK's no contamos con un donador sano, pero se determinó una degranulación normal por el valor elevado en el Δ CD107a de 34.37, además el plot de contorno muestra líneas de contorno desplazadas hacia la región más positiva de CD107a, en CTL donde se contó con un donador sano, resultó un valor de Δ CD107a de 33.4, en comparación con el paciente con Δ CD107a de 15.8, valores altos para degranulación, y de mostrar una mayor concentración de eventos, hacia la región más positiva de CD107a, así descartamos un caso de FHL 3-5. La expresión de Perforina no se determinó, por no contar con muestra del paciente, por tanto se realizó directamente la secuenciación por el método de SANGER del exón dos y tres, donde no encontramos alguna mutación con cambio de sentido, únicamente un polimorfismo en el exón tres, de un solo nucleótido en la tercera posición cDNA c1019C>T Figura 3. La expresión de XAP no la podemos determinar por citometría, por tanto queda determinar la presencia por Westernblot. En este caso

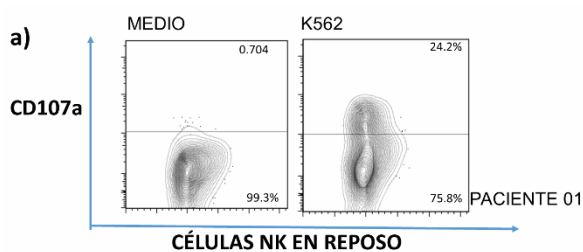
claramente se descartan las posibilidades de una posible FHL, XLP1 y Perforina.

CRITERIO	VALORES REPORTADOS	PRESENCIA
PIEBRE >38.5 °C	38	
ESPLENOMEGALIA	HEPATOESPLENOMEGALIA	
CITOPENIAS (>2 LÍNEAS)	PANCITOPENIA ANEMIA	
HIPERTRIGLICERIDEMIA / HIPOFIBRINOGENEMIA	/414	
ACTIVIDAD DE NK BAJA O AUSENTE		
HIPERFERRITINEMIA	689	
INCREMENTO DE SCD25 >2400 U/ML		
HEMOPHAGOCITOSIS EN MEDULA ÓSEA, BAZO O NODOS LINFÁTICOS SIN EVIDENCIA DE MALIGNIDAD	SE OBSERVAN 5 CÉLULAS HEMOPHAGOCITANDO	

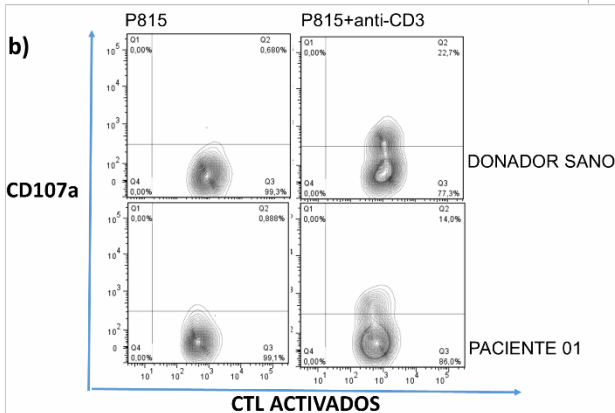
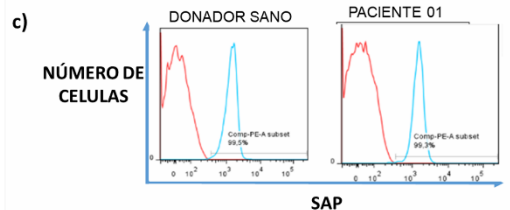
OTROS CRITERIOS	VALORES
INFECCIÓN VEB	

Tabla 4. Los ocho criterios clínicos, para el diagnóstico de HLH paciente 01. En la tabla se enlistan los ocho criterios para considerar ser un caso de HLH, el paciente 01 cuenta con seis criterios, los valores mostrados son los reportados en el resumen clínico, así como la presencia de estos para ser considerados o no como muestra para nuestro algoritmo que se muestran en color rosa, adicionalmente se muestra otra tabla con otros criterios que son importantes para considerar a los candidatos para la aplicación del algoritmo.

DEGRANULACIÓN



EXPRESIÓN DE SAP EN CTL



d)

SECUENCIACION DEL GEN PERFORINA

VARIANTE SINONIMA Exón 3

CAC -> CAT = HIS (300) -> HIS (300) ASOCIADA CON FHLH

Figura 3 Resultado de la aplicación del algoritmo para el diagnóstico diferencial del paciente 01. a) Ensayo de degranulación en células NK en reposo, muestra un Δ CD107a en el paciente de 34.37, en la condición de

incubación con K562 se muestran líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a. b) Ensayo de degranulación en CTL, en la parte superior se muestra al donador sano con un Δ CD107a 33.4 mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la región más positiva de CD107a en la condición de P815 + anti-CD3, en la parte inferior se muestra el plot de contorno del paciente y un Δ CD107a de 15.8 para el paciente mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la región más positiva de CD107a en la condición de P815 + anti-CD3. d) Histograma de expresión de proteína SAP, en células NK en reposo, muestra una presencia del 80.9% en el donador sano, mientras que el paciente 76.9%. e) Alineamiento del EXON 3 de perforina, en el recuadro verde se muestra el polimorfismo encontrado C/T.

PACIENTE 02

Diagnóstico de Síndrome de Chediak Higashi, una de las características fenotípicas en estos pacientes es una baja degranulación en células T y NK's, por tanto decidimos aplicar el algoritmo y realizar un ensayo de degranulación en células NK en reposo. Los resultados indican un valor de Δ CD107a de 16.091 para el control, mientras el paciente presentó un Δ CD107a de 5.88, valores que no resultan ser comparables; indicativo de una degranulación defectuosa. Dado que es el resultado de una réplica, es necesario repetir dicho ensayo, además de integrar un ensayo de degranulación de CTL's. La secuenciación del gen LYST, es el siguiente paso.

DEGRANULACIÓN

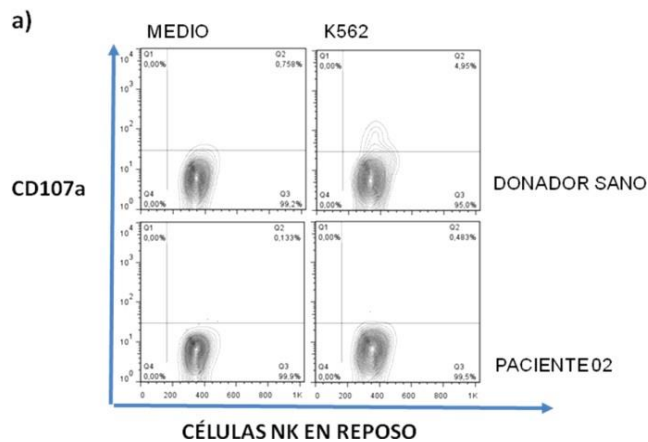


Figura 3 Resultados del algoritmo para el diagnóstico diferencial del paciente 02. a) Ensayo de degranulación en células NK en reposo, muestra un Δ CD107a en el control de 8.42 en la condición de incubación con K562, se muestran líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a en comparación con el paciente de 5.88 en la condición de incubación con K562 se muestran líneas de contorno desplazadas hacia la región más negativa de CD107a.

PACIENTE 03

Diagnóstico síndrome Linfoproliferativo, paciente con un cuadro clínico de; Linfoma de Burkitt, hipogammaglobulinemia y tratarse de un varón, características fenotípicas que nos pueden permitir pensar se trata de un posible caso de XLP1, a pesar de no contar con alguno de los 8 criterios, decidimos incluirlo en el estudio. Medimos los niveles intracelulares de SAP en linfocitos T CD3+ de células en reposo. La expresión de SAP, resultó para el control un 96.7% positivo en comparación al paciente con 95.3%, así con niveles comparables de expresión de SAP podemos descartar así un posible caso de XLP1.

CRITERIO	VALORES	PRESENCIA
FIEBRE >38.5 ° C		
ESPLENOMEGALIA		
CITOPENIAS (>2 LÍNEAS)		
HIPERTRIGLICERIDEMIA / HIPOFIBRINOGENEMIA		
ACTIVIDAD DE NK BAJA O AUSENTE		
HIPERFERRITINEMIA		
INCREMENTO DE sCD25 >2400 U/mL		
HEMOFAGOCITOSIS EN MEDULA ÓSEA, BAZO O NODOS LINFÁTICOS SIN EVIDENCIA DE MALIGNIDAD		

OTROS CRITERIOS	VALORES
CD4 BAJAS	BAJOS NIVELES
MHC II	BAJA EXPRESIÓN
LEUCOCITOS	LEUCOCITOSIS (16550)
LINFOMA DE BURKITT	
GLOBULINAS	HIPOGAMAGLOBULINEMIA

Tabla 4. Los ocho criterios clínicos, para el diagnóstico de HLH paciente 03. En la tabla se enlistan los ocho criterios para considerar ser un caso de HLH, el paciente 03 no cuenta con ningun criterios, pero se muestra otra tabla con otros criterios que son importantes para considerar a los candidatos para la aplicación del algoritmo y determinar un caso de XLP para el caso es de importancia Hipogamaglobulinemia y el Linfoma de Burkitt.

EXPRESIÓN DE SAP EN LINFOCITOS T CD3+

a)

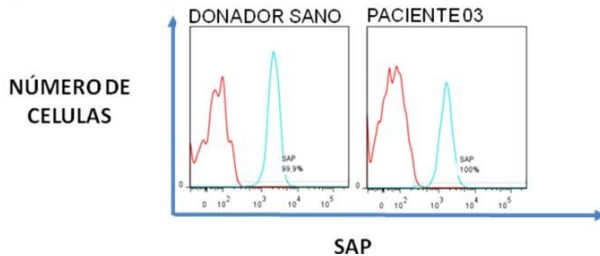


Figura 4 Resultados del algoritmo para el diagnóstico diferencial del paciente 03.

a) Histograma para la proteína SAP, en Linfocitos T CD3+, muestra una presencia de SAP de un 96.7% para el control en comparación con un 95.3 % positivo para la presencia de SAP en el paciente 03.

PACIENTE 04

Paciente con diagnóstico de síndrome hemofagocítico con asociación a infección por VEB+, es un varón que posee un alto número de copias para el VEB que cuenta con seis de los ocho criterios, los cuales son; fiebre, esplenomegalia, bicitopenia, hipertrigliceridemia e hipofibrinoginemia, hiperferritinemia y la presencia de células hemofagocitando en medula ósea Tabla 6. El reporte clínico nos indicó bajos niveles de NK's, que corroboramos al medir poblaciones celulares, por tanto se decide realizar el algoritmo en CTLs, para el diagnostico diferencial de un posible caso de FHL3-5; determinar la expresión intracelular de

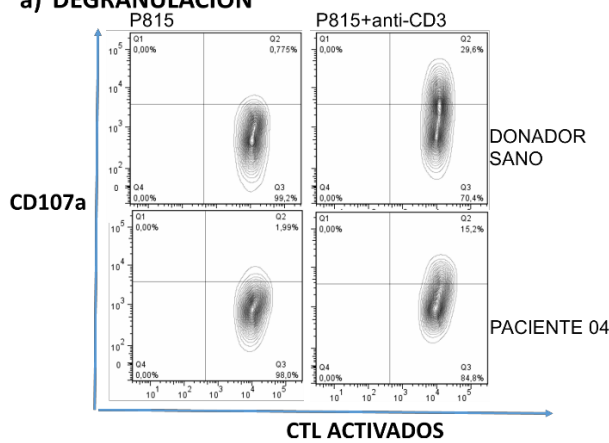
SAP para descartar un posible XLP1 y determinar la expresión de perforina para descartar un caso de FHL2. El ensayo de degranulación se realizó en dos ocasiones, el primer ensayo determinó bajos niveles de Células CTL 8.10 % en comparación con 30.2% del control, aun así se logró determinar una deficiencia en la degranulación con un Δ CD107a para el control sano de 32.223 en comparación al paciente de 3.94, en un segundo ensayo el Δ CD107a resultó de 38.19 en el control, en comparación con el paciente con un Δ CD107a de 7.6 valores no comprables, además el testigo mostró una mayor concentración de eventos, hacía la población más positiva de CD107a, no así en el paciente. En el caso de SAP la expresión de la proteína en linfocitos T CD3 + de células activadas resultó 97% positiva en comparación con el paciente con 94.2% descartando así un caso de XLP1; en el caso de Perforina en linfocitos T CD3+ de células activadas, encontramos una presencia del 98.7% en comparación al 4.79% del paciente, en un segundo ensayo para determinar la expresión de Perforina, resultó en 95% en el control sano, en comparación al 56.5% encontrado en el paciente. Decidimos secuenciar Perforina en búsqueda de una posible mutación, realizamos la secuenciación de los dos exones, donde no encontramos mutaciones con cambio en la secuencia de la proteína, solo dos mutaciones sinónimas en exón 3, que no cambian la secuencia de aminoácidos cDNA 989G>A y cDNA 1019C>T. En este caso resultó con un posible diagnóstico diferencial de un caso de FHL3-5.

Criterio	Valores reportados	Presencia
Fiebre >38.5 °C	FIEBRE DE MÁS DE 2 SEMANAS	
Esplenomegalia	ESPLENOMEGALIA (HEPATOSPLENOMEGALIA A NIVEL DE CRESTA ILIACA), MÁS ASOCIACIÓN CON FUGA HEPATICA	
Citopenias (>2 líneas)	BICITOPENIA: CON LEUCOPENIA CON NEUTROPENIA PROFUNDA, DEBUT CON TROMBOCITOPENIA, ANEMIA EN LIMITE DE 10GR/DL,	
Hipertrigliceridemia/ Hipofibrinoginemia		
Actividad de NK baja o ausente		
Hiperferritinemia		
Incremento de sCD25 >2400 U/mL		
Hemofagocitosis en Medula ósea, bazo o nodos linfáticos sin evidencia de malignidad	CÉLULAS HEMOFAGOCITANDO EN MÉDULA ÓSEA	

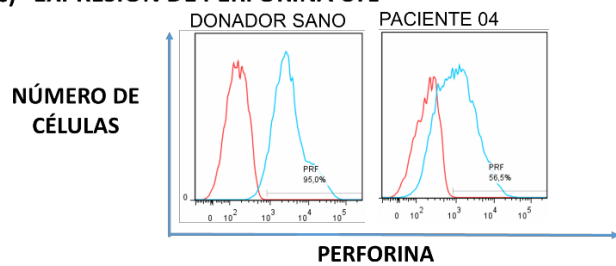
OTROS CRITERIOS	VALORES
TRANSAMINASEMIA Y DHL ELEVADA.	
NIVELES DE NK BAJOS	
CARGA VIRAL VEB	14,212 COPIAS DE VEB/ML

Tabla 6. Los ocho criterios clínicos, para el diagnóstico de HLH familiar del paciente 04. En la tabla se enlistan los ocho criterios para considerar ser un caso de HLH, en el caso de este paciente cuenta con seis criterios, los valores mostrados son los reportados en el resumen clínico, así como la presencia de estos para ser considerados o no como muestra para nuestro algoritmo que se muestran en color rosa, se enlistan también otros criterios extra en la tabla inferior.

a) DEGRANULACIÓN



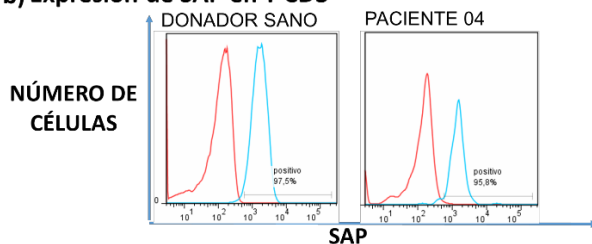
c) EXPRESIÓN DE PERFORINA CTL



d) SECUENCIACIÓN DEL GEN PERFORINA

Dos variantes sinónimas Exón 3
 ACG-> ACA = THR (289) -> THR (289)
 CAC -> CAT = HIS (300) -> HIS (300) asociada con FHLH

b) Expresión de SAP en T CD3



	ΔCD107a ACTIVATED CTL
HEALTHY DONOR	38.19
PATIENT 04	7.6

ALINEAMIENTO PERFORINAA EXÓN 3 PACIENTE 05

```

PRF ACCCACTTCA TCCGGCTGT GGAGCTGGGT GGCCGCATAT CGGCCCTCAC TCCCTTGCC ACCTGGAGC TGGCCCTGGA AGGGCTCACG GACAACGAG
FW ACCCACTTCA TCCGGCTGT GGAGCTGGGT GGCCGCATAT CGGCCCTCAC TCCCTTGCC ACCTGGAGC TGGCCCTGGA AGGGCTCACG GACAACGAG
RV GACCACTTCA TCCGGCTGT GGAGCTGGGT GGCCGCATAT CGGCCCTCAC TCCCTTGCC A CTGGAGC TGGCCCTGGA AGGGCTCACG GACAACGAG
Clustal Consensus
PRF TGGAGGACTG CCTGACTGTC GAGGCCGAGG TCAACATAGG CATCCACGGC AGCATCTCTG CCGAAGCCAA GGCTCTGAG GAGAGAAGA AGAAGCACA
FW TGGAGGACTG CCTGACTGTC GAGGCCGAGG TCAACATAGG CATCCACGGC AGCATCTCTG CCGAAGCCAA GGCTCTGAG GAGAGAAGA AGAAGCACA
RV TGGAGGACTG CCTGACTGTC GAGGCCGAGG TCAACATAGG CATCCACGGC AGCATCTCTG CCGAAGCCAA GGCTCTGAG GAGAGAAGA AGAAGCACA
Clustal Consensus
PRF GATGAGGCC TCCCTCCACC AAACCTACCG GGAGGCCGAT TCGGAAGTGG TTGGGGCCA TCACACCTCC ATTAACGACC TGCCTTTCGG GATCCAGGC
FW GATGAGGCC TCCCTCCACC AAACCTACCG GGAGGCCGAT TCGGAAGTGG TTGGGGCCA TCACACCTCC ATTAACGACC TGCCTTTCGG GATCCAGGC
RV GATGAGGCC TCCCTCCACC AAACCTACCG GGAGGCCGAT TCGGAAGTGG TTGGGGCCA TCACACCTCC ATTAACGACC TGCCTTTCGG GATCCAGGC
Clustal Consensus
PRF GGGCCCGAGC AGTACTCAGC CTGGGTAAAC TCGCTGCCCG GCAGCCCTGG CCTGGTGGAC TACACCTCTG AACCCCTGCA CDTGCTCTG GACAGCCAG
FW GGGCCCGAGC AGTACTCAGC CTGGGTAAAC TCGCTGCCCG GCAGCCCTGG CCTGGTGGAC TACACCTCTG AACCCCTGCA CDTGCTCTG GACAGCCAG
RV GGGCCCGAGC AGTACTCAGC CTGGGTAAAC TCGCTGCCCG GCAGCCCTGG CCTGGTGGAC TACACCTCTG AACCCCTGCA CDTGCTCTG GACAGCCAG
Clustal Consensus
PRF ACCCCGGGCG GGAGGCACCTG AGGAGGGCCG TGAATCAGTA CCTGACGGAC AGGGCTCGCT GGAGGGACTG CAGCCGGCCG TCCCCACCAG GCGGGCAGA
FW ACCCCGGGCG GGAGGCACCTG AGGAGGGCCG TGAATCAGTA CCTGACGGAC AGGGCTCGCT GGAGGGACTG CAGCCGGCCG TCCCCACCAG GCGGGCAGA
RV ACCCCGGGCG GGAGGCACCTG AGGAGGGCCG TGAATCAGTA CCTGACGGAC AGGGCTCGCT GGAGGGACTG CAGCCGGCCG TCCCCACCAG GCGGGCAGA
Clustal Consensus
PRF GAGCCCCCGA GACCCATGCC AGTGTGTGT CCAATGGCTCA GCGGTCAACA CCCAGGACTG CTGCCCTCGG CAGAGGGGCC TGGCCACGCT GGAGGTGAC
FW GAGCCCCCGA GACCCATGCC AGTGTGTGT CCAATGGCTCA GCGGTCAACA CCCAGGACTG CTGCCCTCGG CAGAGGGGCC TGGCCACGCT GGAGGTGAC
RV GAGCCCCCGA GACCCATGCC AGTGTGTGT CCAATGGCTCA GCGGTCAACA CCCAGGACTG CTGCCCTCGG CAGAGGGGCC TGGCCACGCT GGAGGTGAC
Clustal Consensus

```

Variante sinónima ya reportado
 ACG-> ACA = THR (289) -> THR (289)
 Un polimorfismo sin efecto ya reportado C->T
 CAC-> CAT = HIS (300) -> HIS (300)

Figura 5 Resultado del algoritmo para el diagnóstico diferencial del paciente 04. a) Ensayo de degranulación en CTL en la parte superior se muestra al donador sano con un Δ CD107a de 38.19 mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la región más positiva de CD107a en la condición de P815 + anti-CD3 en la parte inferior la degranulación del paciente con un Δ CD107a 7.6 mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la región negativa de CD107a en la condición de P815 + anti-CD3 b) Histograma para la proteína SAP, en Linfocitos T CD3+, muestra una expresión para el control de 97.5 % en comparación del 95.8% del paciente. c) Histograma para la proteína Perforina, en CTL con una expresión de 95% en el control en comparación con 56.5% del paciente 04. d) Alineamiento del EXON 3 de perforina, muestra los polimorfismos encontrados G/A y C/T.

PACIENTE 05

Diagnostico sd Hemofagocitico, cuenta con dos de los ocho criterios; fiebre de más de 38°C y la presencia de células hemofagocitando por tanto se decide aplicar el algoritmo. Se realizó un ensayo de degranulación en células NK en reposo para el diagnóstico diferencial de un posible caso de FHL3-5 y el análisis funcional para demostrar la presencia ó ausencia de las proteínas intracelulares SAP y Perforina para descartar posibles casos de XLP1 y FHL2. En la degranulación en células NK en reposo, el Δ CD107a, para el control sano resultado 34.1 en comparación al paciente de 2.034, valores no comprables y además el testigo mostró una mayor concentración de eventos, hacia la población más

positiva no así el paciente; en el caso de las proteínas la expresión SAP en Linfocitos T CD3+ resultó un 99.7% positiva para el control, en comparación al 99.3% en el paciente; perforina se expresó un 94.4% mientras en paciente un 97.6% en el paciente. Resultando como un posible caso de FHL3-5.

CRITERIO	VALORES	PRESENCIA
FIEBRE >38.5 °C	HASTA 39.9°C, REMITIÓ POR 3 DÍAS	
ESPLENOMEGALIA		
CITOPENIAS (>2 LÍNEAS)		
HIPERTRIGLICERIDEMIA / HIPOFIBRINOGENEMIA		
ACTIVIDAD DE NK BAJA O AUSENTE		
HIPERFERRITINEMIA		
INCREMENTO DE SCD25 >2400 U/ML		
HEMOFAGOCITOSIS EN MEDULA ÓSEA, BAZO O NODOS LINFÁTICOS SIN EVIDENCIA DE MALIGNIDAD		

Tabla 7. Los ocho criterios clínicos, para el diagnóstico de HLH familiar del paciente 05. En la tabla se enlistan los ocho criterios para considerar ser un caso de HLH, en el caso de este paciente cuenta con dos criterios, los valores mostrados son los reportados en el resumen clínico, así como la presencia de estos para ser considerados o no como muestra para nuestro algoritmo que se muestran en color rosa.

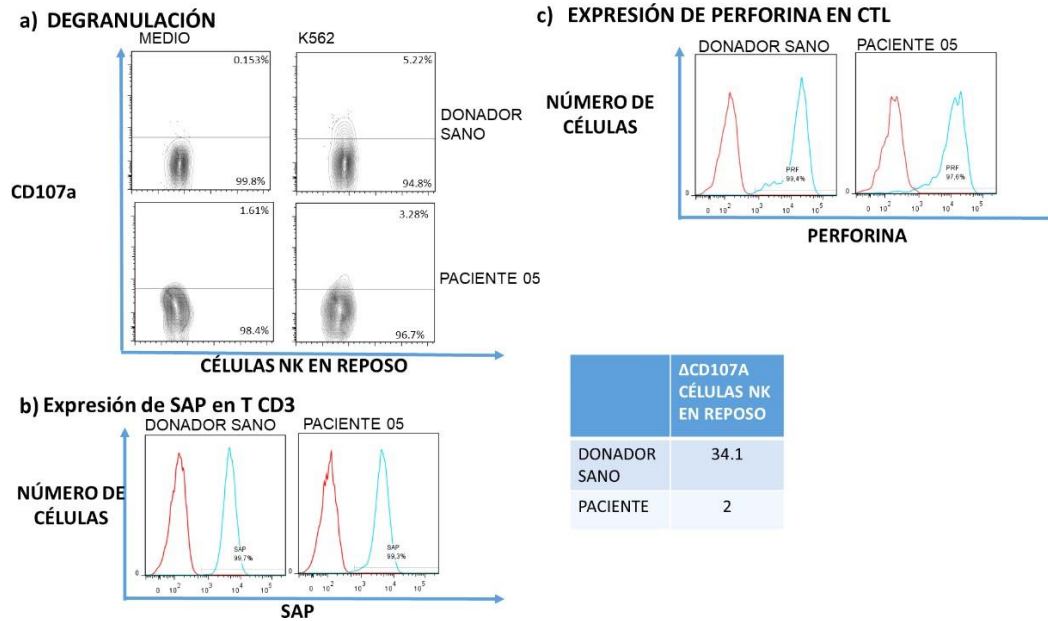


Figura 6 Resultado del algoritmo para el diagnóstico diferencial del paciente 05.a) Ensayo de degranulación en células NK en reposo, la parte superior muestra el control sano con un Δ CD107a 34.118 en la condición de incubación con K562 se muestran líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a en comparación con el paciente de 2.03% en la condición de incubación con K562 se muestran líneas de contorno desplazadas hacia la población más negativa de CD107a. b) Histograma de la proteína SAP, en linfocitos T CD3+, muestran una expresión del 99.7% en el control en comparación con el 99.3% de expresión del paciente. c) Histograma de la proteína Perforina, en CTL con una expresión del 99.4 % en comparación con 97.6% en el paciente 05.

PACIENTE 06

Paciente con diagnóstico de síndrome de Chediak Higashi entre las características fenotípicas relacionadas a este síndrome el paciente cuenta con; presencia de cabello plateado, lisosomas gigantes y albinismo oculocutáneo. Se aplicó el algoritmo para determinar la degranulación en células NK en reposo así como en CTLs, para verificar si la citotoxicidad es defectuosa como la reportada en

pacientes con este síndrome. En el caso de la degranulación en NKs el Δ CD107a es 4.633 mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a en comparación con el paciente con un Δ CD107a 0.782 mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la población más negativa de CD107a, resultando en valores no comparables, mostrando una degranulación defectuosa; en el caso de CTL el control resultó con un Δ CD107a de 68.4 con líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a en comparación del paciente con un Δ CD107a de 1.9, con líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a, resultando también en una degranulación defectuosa. Se realizó la extracción de DNA genómico el cual, está en proceso de secuenciación del gen LYST en búsqueda de mutaciones.

CUADRO CLÍNICO PACIENTE 06	
CABELLO PLATEADO	
ZONAS EXPUESTAS AL SOL CON MANCHAS HIPERCROMICAS	
PADRES CONSANGUINEOS	
ALBINISMO OCULOCLUTANEO	
SE OBSERVAN NEUTROFILO CON LISOSOMAS GIGANTES EN ADICIÓN A CUERPOS RESIDUALES Y LINFOCITOS, MONOCITOS Y EOSINÓFILOS CONTIENEN LISOSOMAS GIGANTES. SE OBSERVAN NEUTROFILOS, LINFOCITOS, MONOCITOS Y EOSINOFILOS QUE CONTINENE LISOSOSMAS GIGANTES	
DX. PB CHEDIAK-HIGASHI	

Tabla 8. Cuadro clínico del paciente 06. En la tabla se enlistan algunos de los signos mostrados por este paciente los cuales dan un diagnóstico de Chediak Higashi

a) DEGRANULACIÓN

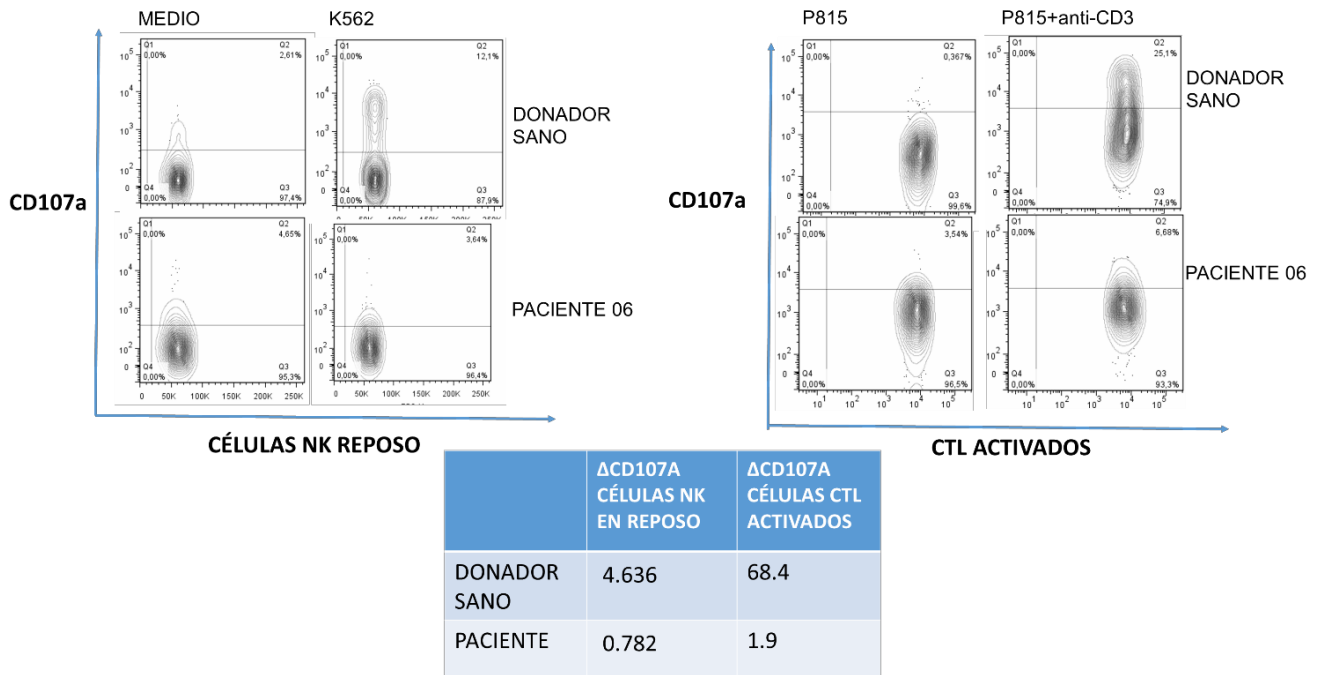


Figura 7 Resultados del algoritmo para el diagnóstico diferencial del paciente 06. a) Ensayo de degranulación en células NK en reposo, en la parte superior se muestra el plot de contorno con un Δ CD107a de 4.633 para el control mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a, en la parte inferior se muestra el plot de contorno del paciente 06 con un Δ CD107a de 0.782 donde las líneas de contorno se concentran en la región negativa de CD107a. b) Ensayo de degranulación de CTL en la parte superior se muestra el plot de contorno con un Δ CD107a de 68.4 para el control mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a, en la parte inferior se muestra el plot de contorno del paciente 06 con un Δ CD107a de 1.9 donde las líneas de contorno se concentran en la región negativa de CD107a.

PACIENTE 07

Diagnóstico Síndrome de Grisellie, entre las características fenotípicas de pacientes con este síndrome el paciente reporta cabello de color plateado. Se aplicó el algoritmo para determinar la degranulación en células NK en reposo para determinar si la citotoxicidad es defectuosa como la reportada en pacientes con este síndrome. En células NK el Δ CD107a de donador sano es de 11.8 en

comparación con el Δ CD107a del paciente de 6.2, donde las líneas de contorno se concentran en la región negativa de CD107a indicativo de una degranulación defectuosa. Se realizó la extracción de RNA el cual, está en proceso de secuenciación del gen Rab27a.

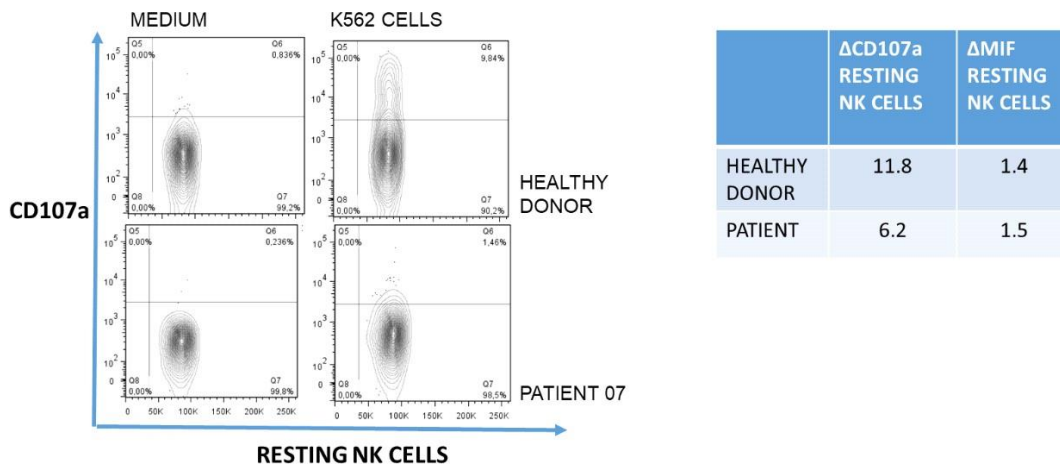


Figura 8 Resultados del algoritmo para el diagnóstico diferencial del paciente 07.

a) Ensayo de degranulación en células NK en reposo, en la parte superior se muestra el plot de contorno para el control sano con un Δ CD107a de 11.8 mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a en la condición de incubación con K562, en la parte inferior se muestra el plot de contorno del paciente 06 con un Δ CD107a de 6.2 mostrando líneas de contorno que se concentran en la región negativa de CD107a.

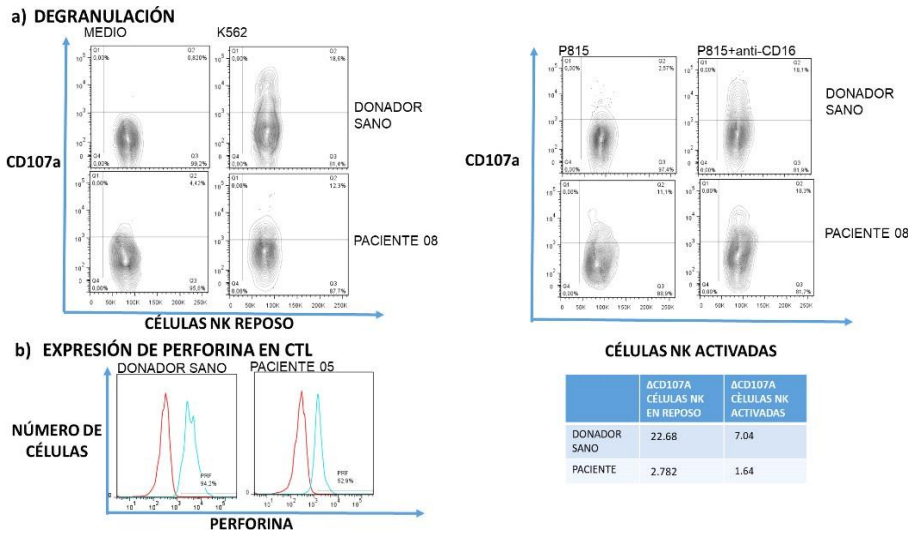
PACIENTE 08

Diagnóstico síndrome Hemofagocítico, cuenta con cuatro de los criterios para el diagnóstico de HLH; Esplenomegalia, hipofibrinoginemia, hiperferritinemia y células hemofagocitando en medula ósea. Por tanto se decide incorporar para aplicar el algoritmo, se realizaron ensayos de degranulación en NK's en reposo y

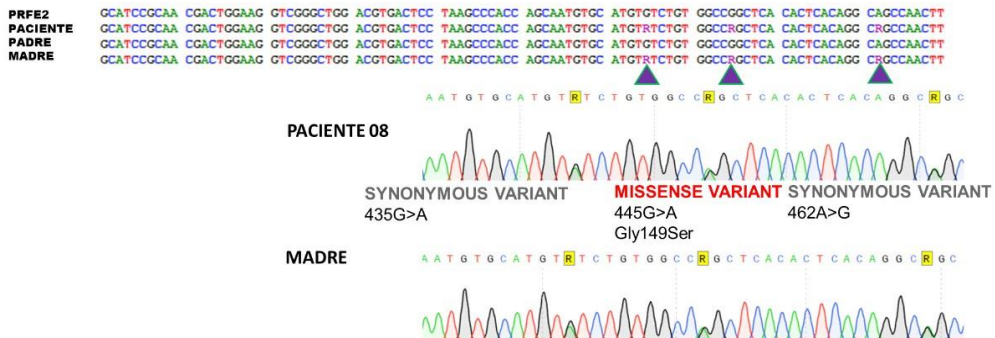
células NK activadas con CD16, para el diagnóstico diferencial de un posible caso de FHL3-5; y se determinó la expresión perforina para poder descartar FHL2. El ensayo de degranulación en NKs en reposo determinó una deficiencia en la degranulación, con un Δ CD107a de 22.68 en el control sano, donde las líneas de contorno se concentran en la región positiva de CD107a en comparación con el Δ CD107a de 2.78 del paciente; en el caso de células NK activadas con CD16, el Δ CD107a del control resultó de 7.04 donde las líneas de contorno se concentran en la región positiva de CD107a en comparación con el Δ CD107a de 1.64 del paciente. Al determinar la expresión de Perforina en CTL, encontramos una presencia del 94.2 % en el control, en comparación al 52.9% encontrado en el paciente. Decidimos mandar a secuenciar en *GENETEST*, y reportan; —El paciente presenta dos variantes patogénicas en el gen *PRF1* (Asn252Ser y Gly149 trp) además, de una variante patogénica en el gen *UNC13D* (Arg24His) que aún no está reportada. Secuenciamos por método de SANGER el Exón dos y tres de perforina, tanto en el paciente como en los padres, para corroborar las mutaciones, donde además de lo reportado, encontramos un STOP codón en Arg390Ter en el exón tres de perforina, aun no reportado.

Criterio	Valores reportados	Presencia
FIEBRE >38.5 °C	AFEBRIL	
ESPLENOMEGALIA		
CITOPENIAS (>2 LÍNEAS)	EN ESTUDIO	---
HIPERTRIGLICERIDEMIA/ HIPOFIBRINOGENEMIA	/BAJO	
ACTIVIDAD DE NK BAJA O AUSENTE		
HIPERFERRITINEMIA	ELEVADA	
INCREMENTO DE SCD25 >2400 U/ML		
HEMOFAGOCITOSIS EN MEDULA ÓSEA, BAZO O NODOS LINFÁTICOS SIN EVIDENCIA DE MALIGNIDAD	HEMOFAGOCITOSIS EN MEDULA ÓSEA	

Tabla 9. Los ocho criterios clínicos, para el diagnóstico de HLH familiar del paciente 08. En la tabla se enlistan los ocho criterios para considerar ser un caso de HLH, en el caso de este paciente cuenta con cuatro criterios, los valores mostrados son los reportados en el resumen clínico, así como la presencia de estos para ser considerados o no como muestra para nuestro algoritmo que se muestran en color rosa.



c) SECUENCIACIÓN DE PERFORINA EXÓN DOS Y TRES.



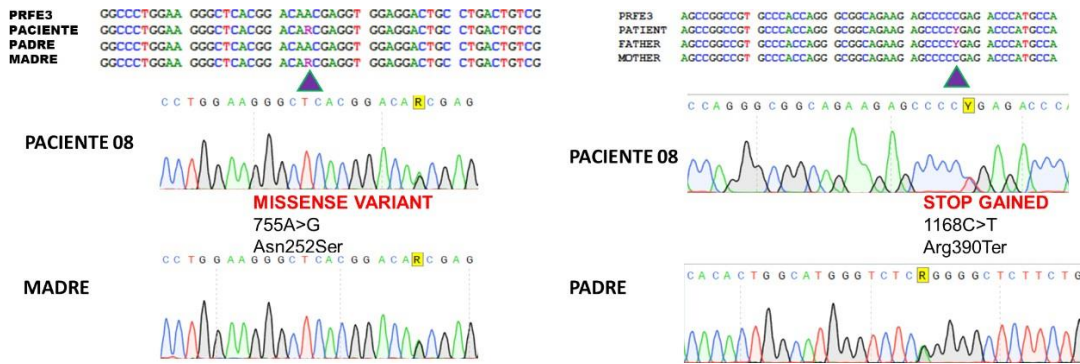


Figura 9 Resultados del algoritmo para el diagnóstico diferencial del paciente 08. a) Ensayo de degranulación en células NK en reposo, en la parte superior se muestra el plot de contorno para el control sano con un Δ CD107a de 22.68 mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a en la condición de incubación con K562, en la parte inferior se muestra el plot de contorno del paciente con un Δ CD107a de 2.78 mostrando líneas de contorno que se concentran en el región negativa de CD107a, en el panel de la parte derecha Ensayo de degranulación de CTL en la parte superior se muestra el plot de contorno con un Δ CD107a de 7.04 para el control mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a, en la parte inferior se muestra el plot de contorno del paciente con un Δ CD107a de 1.64 donde las líneas de contorno se concentran en el región negativa de CD107a. b) Histograma de la proteína Perforina, en CTL con una expresión del 99.4 % en comparación con 97.6% en el paciente. c) Secuenciación del Gen perforina en la parte superior se muestra el exón dos y las mutaciones encontradas por el método de secuenciación de SANGER, en la parte inferior se muestra el alineamiento para el exón 3 y las mutaciones encontradas por el método de secuenciación de SANGER.

PACIENTE 09

Diagnóstico síndrome Hemofagocítico, cuenta con seis de los criterios para el diagnóstico de HLH; Fiebre, hepatoesplenomegalia, Pancitopenia, hipertigliceridemia/hipofibrinoginamia, hiperferritinemia y células hemofagocitando en medula ósea, por tanto se decide incorporar para aplicar el algoritmo. Realizamos ensayos de degranulación en NK's en reposo, para el diagnóstico

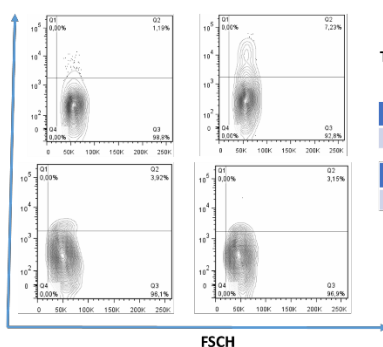
diferencial de un posible caso de FHL3-5 y la expresión perforina para poder descartar un posible caso de FHL2. El ensayo de degranulación en NKs en reposo resulto con un Δ CD107a de 4.3 para el donador sano, donde las líneas de contorno se concentran en la región positiva de CD107a, en comparación con el Δ CD107a del paciente de 22.3 por tanto resulta una degranulación normal. Al determinar la expresión de Perforina en CTL, encontramos una presencia del 95.5% en el control, en comparación al 29.1% encontrado en el paciente, teniendo una baja expresión. Los resultados nos puede orientar hacia un posible caso de FHL2, el secuenciar Perforina es lo siguiente.

CRITERIO	VALORES REPORTADOS	PRESENCIA
FIEBRE >38.5 ° C	2 SEMANA	
ESPLENOMEGALIA	HEPATOESPLENOMEGALIA	
CITOPENIAS (>2 LÍNEAS)	PANCITÒPENIA	
HIPERTRIGLICERIDEMIA / HIPOFIBRINOGENEMIA		
ACTIVIDAD DE NK BAJA O AUSENTE		
HIPERFERRITINEMIA		
INCREMENTO DE SCD25 >2400 U/ML		
HEMOFAGOCITOSIS EN MEDULA ÓSEA, BAZO O NODOS LINFÁTICOS SIN EVIDENCIA DE MALIGNIDAD	HEMOFAGOCITOSIS EN MEDULA ÓSEA	

Tabla 10. Los ocho criterios clínicos, para el diagnóstico de HLH paciente 09. En la tabla se enlistan los ocho criterios para considerar ser un caso de HLH, el paciente 09 cuenta con seis criterios, los valores mostrados son los reportados en el resumen clínico, así como la presencia de estos para ser considerados o no como muestra para nuestro algoritmo que se muestran en color rosa.

a) DEGRANULACIÓN

GATE SOBRE T CD3-CD56+



TESTIGO

	TESTIGO	PACIENTE 09
Δ CD107A	6.1	0.8

	TESTIGO	PACIENTE 09
MIF	1.44	0.94

Paciente 09

b) PERFORINA EN CD8+

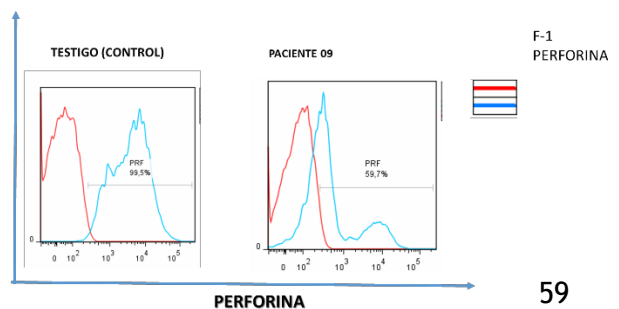


Figura 9 Resultados del algoritmo para el diagnóstico diferencial del paciente 09.

a) Ensayo de degranulación en células NK en reposo, en la parte superior se muestra el plot de contorno para el control sano con un Δ CD107a de 6.1 mostrando líneas de contorno desplazadas hacia la población más positiva de CD107a en la condición de incubación con K562, en la parte inferior se muestra el plot de contorno del paciente, con un Δ CD107a de 0.94 mostrando líneas de contorno que se concentran en la región negativa de CD107a, en el panel de la parte derecha. b) Histograma de la proteína Perforina, en CTL con una expresión del 99.5 % en comparación con 59.7 en el paciente.

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo logramos replicar, lo reportado en los ensayos de degranulación con un mayor porcentaje de degranulación en personas sanas respecto a los pacientes que por ciertos criterios es considerado para tener HLH y por tanto una degranulación de menor porcentaje, para algunos pacientes como el el paciente 01 logramos descartar FHL ya que obtuvimos un degranulación normal más sin embargo este es un primer paso para lograr un diagnóstico el poder tener herramientas de secuenciación masiva, con la cual encontrar la mutación para poder tener ese diagnóstico molecular para un tratamiento sería lo ideal, pero gracias a este estudio se pueden descartar algunas sospechas como la proteína SAP, ya que se tenía altas copias de VEB el caso es interesante por el hecho de tener más de 5 criterios y aun así no se pudo encontrar alguna disminución de la expresión de alguna proteína, otro aspecto muy importante fue el requerimiento de mayor información respecto a poblaciones celulares para poder realizar los ensayos ya que a una pequeña cantidad de muestra que presenta pancitopenia, se tenía que realizar cierta preferencia hacia un estudio, y de ahí la falta de datos como el paciente 01 que falto determinar la expresión de Perforina por citometría sin embargo por método de secuenciación de Sanger se pudo descartar la presencia de una mutación al menos en el los dos exones codificantes para la proteína, nuestro algoritmo parecería indicar que se trata de un caso de HLH secundario ya que estaríamos descartando un caso primario pero repetimos en tener una prueba a nivel genético es lo ideal por tanto este paciente es un buen candidato para enviar a secuenciación masiva, para corroborar lo encontrado por

ensayos de degranulación, Para los casos con hipopigmentación pacientes 02, 06 y 07 encontramos degranulación defectuosa tanto en NKs como en Linfocitos T CD8+ lo cual es correspondiente a fallas en la degranulación, por defecto de proteínas como LYST y Rab27a, de acuerdo a lo reportado ya tenemos la prueba de degranulación defectuosa más sin embargo hace falta la confirmación genética, el encontrar la mutación, es el siguiente paso mediante secuenciación masiva dado el gran tamaño de los genes y que ya están en proceso. Existen una serie de signos y síntomas adicionales en el caso de pacientes con síndromes linfoproliferativos adicionales que nos podrían llevar a pensar que se trata de una paciente diagnóstico de XLP como en el caso del paciente 03 que mostró un cuadro clínico con hipogamaglobulinemia y un linfoma de Burkitt lo cual nos llevó a pensar de que podríamos estar en un caso XLP1 por lo tanto se decide corroborar midiendo la expresión de SAP, arrojando un resultado negativo y por tanto descartamos esa posibilidad y dado que en estos paciente no siempre presentan deficiencias en la citotoxicidad, por tanto descartamos este paciente como un caso de HLH, en el caso de las pacientes con resultado de FHL pacientes 04,05,08 y 09 que muestran una degranulación defectuosa y por tal motivo son considerados para mandar a secuenciación masiva, ya que no podemos decir que paso de la vía de degranulación se ve afectada, solo sabemos que se afectó, y tres proteínas podrían ser las responsables Munc-13-4, Syntaxina 11 ò Munc18-2, y el resultado de un defecto molecular consistente es el que respaldaría nuestro resultado. La aplicación de este algoritmo nos lleva por tanto a diferenciar entre las Formas primarias y secundarias dado que si se muestra defectos en la degranulación y todo un cuadro clínico asociado podemos descartar la forma secundaria, claro

siendo esto un primer paso para el diagnóstico diferencial queda claro que para tener un mejor diagnóstico la herramienta de secuenciación es muy requerida para poder tener un diagnóstico de HLH primario, pero como un avance hacia un primer proceso de selección de pacientes esta herramienta muy importante.

ALGORITMO MOLECULAR PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE HLH

Al contar con aproximadamente 7 ml de sangre, podemos aplicar el algoritmo completo Figura 2, mas sin embargo en algunos casos los niveles de poblaciones celulares, están alterados por lo que el número de PMBCs es menor, para obtener esta información en algunos casos se realizó un ensayo de tinción de poblaciones con el objetivo de determinar los porcentajes de linfocitos T CD8+ y células NK, y así determinar, si los ensayos de degranulación se realizarían en ambas poblaciones celulares o se optaba por realizar directamente los ensayos en CTL's, debido a que los porcentajes de células NK resultan ser los más alterados. En el caso de las proteínas intracelulares también se debe de seleccionar la población celular debido al problema anteriormente mencionado.

10. CONCLUSIONES

Debemos de tener en cuenta que las muestras de pacientes en ocasiones son escasas, por tanto, implementar a nuestro algoritmo la secuenciación masiva seria tener resultados concluyentes y confiables, resolviendo así los casos Familiares.

11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Cunningham-Rundles *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, 2017.
- [2] A. Bousfiha, L. Jeddane, C. Picard, and F. Ailal, —The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies,|| pp. 129–143, 2018.
- [3] G. Janka and P. Hematology, —Hemophagocytic Lymphohistiocytosis : When the Immune System Runs Amok H ä mophagozytierende Lymphohistiozytose: Wenn das Immunsystem Amok I ä uft,|| pp. 278–285, 2009.
- [4] J.W. Farquhar and A. E. Claireaux, —Familial haemophagocytic reticulosis,|| no. 1951, 1952.
- [5] G. E. Janka and K. Lehmborg, —Blood Reviews Hemophagocytic syndromes — An update,|| *YBLRE*, vol. 28, no. 4, pp. 135–142, 2014.
- [6] D. N. Fisman, —Hemophagocytic Syndromes and Infection,|| vol. 6, no. 6, pp. 601–608, 2000.
- [7] Y. Faitelson and E. Grunebaum, —Hemophagocytic lymphohistiocytosis and primary immune deficiency disorders,|| *Clin. Immunol.*, vol. 155, no. 1, pp. 118–125, 2014.
- [8] R. S. Mehta and R. E. Smith, —Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): a review of literature,|| 2013.
- [9] R. M. Egeler, D. Webb, J. Winiarski, and G. Janka, —HLH-2004: Diagnostic and Therapeutic Guidelines for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis,|| no. July, 2006.
- [10] G. E. Janka, —Hemophagocytic syndromes,|| pp. 245–253, 2007.
- [11] J. Pachlopnik Schmid *et al.*, —Inherited defects in lymphocyte cytotoxic activity.,|| *Immunol. Rev.*, vol. 235, no. 1, pp. 10–23, 2010.
- [12] K. Words, —Molecular Mechanisms of Natural Killer Cell Activation,|| pp. 216–226, 2011.
- [13] E. O. Long, —Negative signaling by inhibitory receptors: The NK cell paradigm,|| *Immunol. Rev.*, vol. 224, no. 1, pp. 70–84, 2008.
- [14] J. C. Sun and L. L. Lanier, —Nihms681770,|| vol. 11, no. 10, pp. 645–657, 2015.
- [15] G. D. Saint Basile, G. Ménasché, and A. Fischer, —Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules,|| *Nat. Publ. Gr.*, vol. 10, no.

8, pp. 568–579, 2010.

- [16] H. Cai, K. Reinisch, and S. Ferro-Novick, —Review Coats , Tethers , Rabs , and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle, *J. Cell Biol.* no. May, pp. 671–682, 2007.
- [17] E. Immunology, C. Gholam, S. Grigoriadou, K. C. Gilmour, and H. B. Gaspar, —Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis : advances in the genetic basis , diagnosis and management, *Immunol. Rev.* pp. 271–283, 2011.
- [18] E. Brisse, C. H. Wouters, and P. Matthys, —Cytokine & Growth Factor Reviews Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): A heterogeneous spectrum of cytokine-driven immune disorders, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2014.
- [19] A. Fischer, —Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis, *Immunol. Rev.* vol. 203, pp. 165–179, 2005.
- [20] D. Saint Basile, A. Fischer, and S. Latour, —Genetic defects affecting lymphocyte cytotoxicity, *Immunol. Rev.* pp. 348–353, 2007.
- [21] E. Sieni *et al.*, -Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: A model for understanding the human machinery of cellular cytotoxicity, *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 69, no. 1, pp. 29–40, 2012.
- [22] M. Ohadi *et al.*, —Localization of a Gene for Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis at Chromosome 9q21.3-22 by Homozygosity Mapping, *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 64, no. 1, pp. 165–171, 1999.
- [23] A. Samuelsson, G. Janka, M. Schneider, A. Gu, N. Yalman, and J. Poole, —Spectrum of Perforin Gene Mutations in Familial Hemophagocytic, *Immunol. Rev.* pp. 590–597, 2001.
- [24] S. Ehl and C. Outline, —Genetic Diseases Predisposing to HLH, *Immunol. Rev.* pp. 437–460, 2014.
- [25] Y. T. Bryceson *et al.*, -Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11 – deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients, *Immunol. Rev.* vol. 110, no. 6, pp. 1906–1916, 2018.
- [26] B. F. Whaley, —Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in the Neonate, *Immunol. Rev.* pp. 101–107, 2011.
- [27] L. Dotta *et al.*, —Clinical , laboratory and molecular signs of immunodeficiency in patients with partial oculo-cutaneous albinism, *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 8, no. 1, p. 1, 2013.



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., 20 de mayo de 2019.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez

Director

Facultad de Medicina

Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **"Implementación de un algoritmo molecular para la identificación de causas genéticas asociadas a Linfocitosis Hemofagocítica (HLH)"**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Mitzi Vanessa Antunez Barrera. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

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



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., 20 de mayo de 2019.

Dr. David Martínez Duncker Ramirez
Director
Facultad de Medicina
Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **"Implementación de un algoritmo molecular para la identificación de causas genéticas asociadas a Linfocitosis Hemofagocítica (HLH)"**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Mitzi Vanessa Antunez Barrera. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen l se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

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

Dra. Gabriela López Herrera



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., 20 de mayo de 2019.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez

Director

Facultad de Medicina

Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **"Implementación de un algoritmo molecular para la identificación de causas genéticas asociadas a Linfocitosis Hemofagocítica (HLH)"**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Mitzi Vanessa Antunez Barrera. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen l se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

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

Dra. Selma Cecilia Scheffler Mendoza



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., 20 de mayo de 2019.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez
Director
Facultad de Medicina
Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Implementación de un algoritmo molecular para la identificación de causas genéticas asociadas a Linfocitosis Hemofagocítica (HLH)**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Mitzi Vanessa Antunez Barrera. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen l se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

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



Dra. Sara Elva Espinoza Padilla