



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



**FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE POSGRADO**

**ESTUDIO GENÉTICO Y FUNCIONAL EN UNA COHORTE DE PACIENTES
CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE WAS**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN MEDICINA MOLECULAR

P R E S E N T A:

BIOL. JONATHAN GILBERTO CUELLAR VEGA

**DIRECCIÓN
DR. MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ**

Cuernavaca, Morelos

Junio 2019

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Inmunodeficiencias primarias.....	3
1.2 Clasificación de las inmunodeficiencias primarias	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Síndrome de Wiskott-Aldrich.....	7
2.1.1 Manifestaciones clínicas	8
2.2 La proteína WASp.....	10
2.2.1 Dominios funcionales de WASp	12
2.3 Mutaciones en el gen WAS	13
2.4 Expresión y función de WASp en células del sistema inmune	14
2.4.1 Defectos en la función citotóxica de células NK de pacientes con WAS ...	16
2.4.2 Defectos en la función citotóxica de linfocitos T CD8⁺ de pacientes WAS.	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
5.1. Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos específicos	21
6. METODOLOGÍA	22
6.1 Criterios de inclusión y de exclusión de pacientes y controles.....	22
6.2 Obtención y manejo de muestras para purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).....	22
6.3 Extracción de RNA y generación de cDNA para secuenciación	23
7. RESULTADOS.....	25
7.1 Evaluación de la expresión de WASp por en pacientes con cuadro clínico asociado a WAS	25
7.2 Identificación de mutaciones en el gen WAS.....	28
7.3 La subpoblación CD8⁺/CD57⁺ está incrementada en pacientes con WAS.....	35
7.4 Los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con WAS presentan deficiencias funcionales	37
8. DISCUSIÓN	41

9. CONCLUSIÓN	44
10. BIBLIOGRAFÍA	45

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Inmunodeficiencias primarias

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) constituyen una gran variedad de enfermedades o desórdenes hereditarios y son el resultado de defectos monogénicos que afectan el desarrollo o función del sistema inmunológico (Figura 1). Las IDPs generalmente se manifiestan a edad temprana y presentan una gran variedad de manifestaciones clínicas e inmunológicas, que van desde condiciones asintomáticas hasta afecciones potencialmente mortales. Sin embargo, la mayoría de los trastornos implican una mayor susceptibilidad a infecciones, inflamación sistémica, autoinmunidad y malignidad, por lo cual, el diagnóstico correcto y oportuno ha representado todo un reto para los médicos (Casanova et al., 2007; revisado en Mukherje y Thrasher, 2013).

La presencia de IDPs se ha reportado con mayor frecuencia en poblaciones endogámicas o con tasas altas de consanguinidad (Notarangelo, 2010). La incidencia global varía drásticamente, de 1 en 600 a 1 en 500,000 recién nacidos vivos, dependiendo de diversos factores como el tipo de desorden o la población étnica estudiada. Un estudio en Estados Unidos reportó que la prevalencia aproximada de IDPs en niños nacidos vivos es de 1 de cada 1200 nacimientos, siendo la deficiencia de IgA la IDP más común (Boyle y Buckley, 2007).

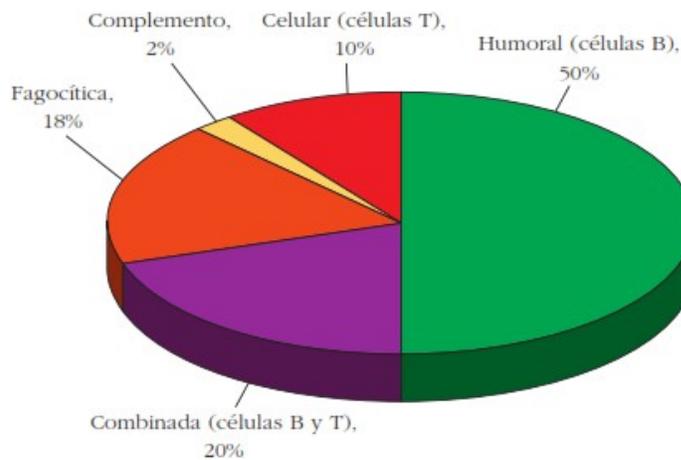


Figura 1. Las inmunodeficiencias primarias se originan por defectos en la función de diversos componentes del sistema inmune. Las IDPs que se han reportado con mayor frecuencia involucran aquellas donde se encuentra afectada la respuesta humoral por sí sola, o en combinación con la respuesta celular.

No obstante, estudios recientes han demostrado que las IDPs pueden ser más comunes que lo que se estimaba anteriormente (Bousfiha *et al.*, 2013). La baja prevalencia de estas condiciones en México se debe al registro deficiente de los casos identificados, así como al desconocimiento general y específico de las IDPs por parte de los médicos, además de la inaccesibilidad de los estudios de diagnóstico que ocurre en la mayor parte de los hospitales de México (Coria *et al.*, 2010).

Recientemente, Stray-Pedersen y colaboradores realizaron un estudio basado en la secuenciación del exoma completo (Whole Exome Sequencing, WES por sus siglas en inglés) para detectar las variantes genéticas asociadas a IDPs. El estudio contempló pacientes caracterizados clínicamente con IDPs de 278 familias de 22 países, reclutadas consecutivamente de 2010 a 2015. Las mutaciones más comunes fueron de tipo “sin sentido” (64%) y los principales patrones de herencia observados fueron la herencia autosómica recesiva (45%), seguida de la autosómica dominante (38%) (Figura 2).

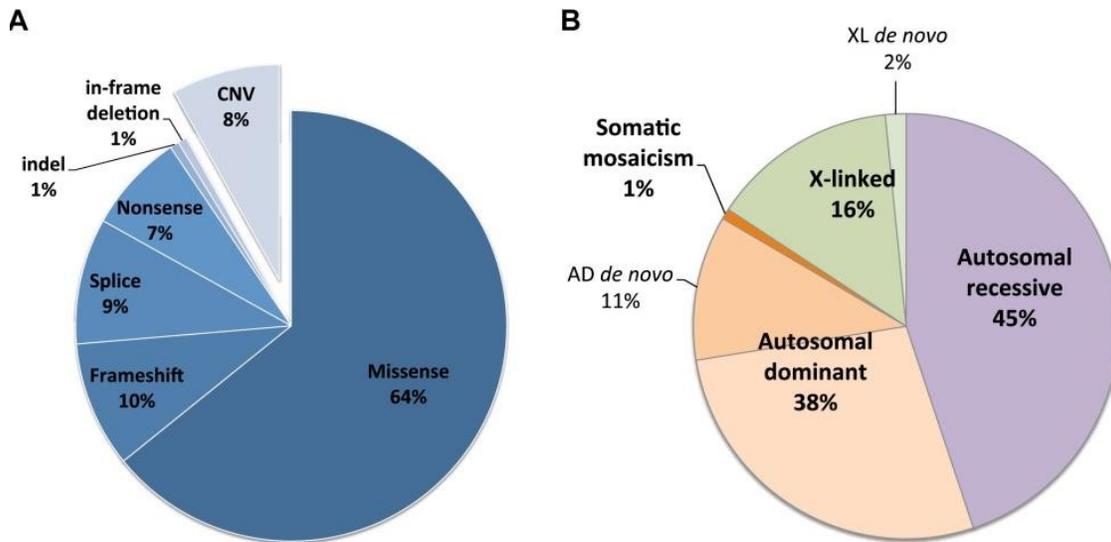


Figura 2. Características de las causas genéticas de inmunodeficiencias primarias. A, Tipos de mutaciones asociadas a IDPs. **B,** Patrones de herencia de mutaciones asociadas a IDPs.

1.2 Clasificación de las inmunodeficiencias primarias

En los últimos años, el avance y desarrollo de nuevas y mejores herramientas tecnológicas genéticas, ha permitido identificar el gen o los genes involucrados en causar dichas anomalías. La Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS, por sus siglas en inglés), con el objetivo de ayudar a los médicos y otros investigadores a reconocer y a otorgar un mejor tratamiento para los pacientes, realiza constantes actualizaciones en la clasificación de las IDPs (Figura 3). El registro actual ha enumerado 354 desórdenes distintos y 344 defectos genéticos, y ha clasificado las IDPs en nueve grupos: las que afectan la inmunidad celular y humoral; las combinadas con características asociadas a síndromes; la deficiencia de anticuerpos; las alteraciones en la regulación de la respuesta inmune; los defectos congénitos del número y/o función de fagocitos; los defectos de la inmunidad innata; los trastornos autoinflamatorios; las deficiencias en el sistema del complemento; y las fenocopias de IDPs (Picard *et al.*, 2017).

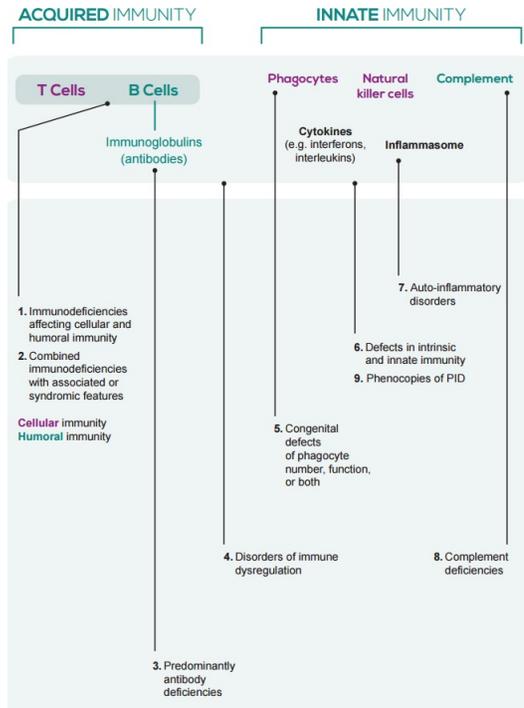


Figura 3. Clasificación de las inmunodeficiencias primarias. Las IDPs se clasifican en nueve grupos dependiendo del componente inmunológico que se encuentra afectado (IPOPI: www.ipopi.org).

2. ANTECEDENTES

2.1 Síndrome de Wiskott-Aldrich

El síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS, por sus siglas en inglés) es una inmunodeficiencia primaria combinada ligada al cromosoma X. Este raro desorden es causado por mutaciones en el gen *WAS* que codifica para la proteína WASp, la cual se expresa exclusivamente en células hematopoyéticas y desempeña un papel fundamental en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina.

Las características clásicas de los pacientes con WAS son trombocitopenia, eczemas e infecciones recurrentes que pueden presentarse desde los primeros meses de vida (Ochs y Thrasher, 2006). Se han reportado más de 300 tipos diferentes de anomalías genéticas que generan la enfermedad (Da-Wei Liu *et al.*, 2015). La incidencia es de aproximadamente 1 a 4 casos por cada millón de varones nacidos vivos (Ochs y Thrasher, 2006), con una edad promedio en el momento del diagnóstico de 24 meses y una esperanza de vida de 15 años en los casos más severos (Imai *et al.*, 2004).

Se han descrito tres variedades de WAS: WAS clásico, trombocitopenia ligada al cromosoma X (XLT, X-linked thrombocytopenia), y neutropenia ligada al cromosoma X (XLN; Kirchhausen y Rosen, 1996; Villa *et al.*, 1995, Ancliff *et al.*, 2006). En los casos de WAS clásico, la mutación en *WAS* resulta en la ausencia de la proteína, por lo tanto, incluye a los casos más severos. El diagnóstico general es microtrombocitopenia, eczema, un incremento en la susceptibilidad a infecciones, autoinmunidad y una mayor tendencia a desarrollar linfomas. En los pacientes con XLT, la mutación en *WAS* comúnmente resulta en una disminución, pero no ausencia, en la expresión de WASp. Esta condición está caracterizada principalmente por trombocitopenia, y algunas veces presencia de eczemas, pero generalmente los efectos son menos severos (Ochs, 1998; Snapper y Rosen, 1999; Villa *et al.*, 1995, Zhu *et al.*, 1995). Finalmente, la variedad XLN está caracterizada principalmente por neutropenia, pero sin el defecto en las plaquetas o cualquier otra sintomatología asociada a WAS y XLT, y ocurre como

consecuencia de mutaciones dentro del dominio de unión a GTPasa (GBD) de WASp (Revisado en Massaad *et al.*, 2013).

2.1.1 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de WAS pueden estar presentes desde el nacimiento. En un inicio, los síntomas incluyen petequias, hematomas y diarrea con sangre. Existe un riesgo elevado de hemorragia intracraneal durante el parto vaginal, así como un riesgo de hemorragia posterior a circuncisión, lo cual puede ser una clave para el diagnóstico temprano (Ochs y Thrasher, 2006). Como se mencionó anteriormente, en general, las manifestaciones clínicas de WAS son: microtrombocitopenia, eczema, un incremento en la susceptibilidad a infecciones, autoinmunidad y una mayor tendencia a desarrollar linfomas (Ochs, 1998; Schurman y Candotti, 2003) (Tabla 1).

Tabla 1. Principales características clínicas e inmunológicas de las diferentes enfermedades asociadas a alteraciones del gen WAS (Modificado de Morato *et al.*, 2007).

	WAS	XLT	I-XLT	XLN	Mielodisplasia
Eczema	Persistente/ Intratable	Localizado/ Tratable	No reportado	No reportado	No reportado
Infecciones Respiratorias	Recurrentes/ Severas	Ocasionalmente tratables	No reportado	Recurrentes/ severas	No reportado
Coteo de Plaquetas	Bajo	Bajo	Normal	Normal	Normal
Conteo de Linfocitos	Bajo B, T	Bajo T/normal	Normal	Bajo NK, B; alto T CD8 ⁺	Bajo NK; alto T CD8 ⁺
Conteo de Monocitos	Normal	Normal	Normal	Bajo	Bajo
Conteo de Neutrófilos	Normal	Normal	Normal	Bajo	Bajo
Incidencia de Malignidades	Alto	Alto	Desconocido	Desconocido	Pre-malignidad
Incidencia de manifestaciones autoinmunes	Alto	Posible	Desconocido	Desconocido	Desconocido
WAS: Wiskott-Aldrich syndrome; XLN: X-linked neutropenia; XLT: X-linked thrombocytopenia					

La trombocitopenia (disminución de la cantidad de plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo) es un hallazgo recurrente en los pacientes con WAS, causando hemorragias frecuentes en más del 80% de los pacientes. Las hemorragias pueden ser leves y en los casos más graves son causa de muerte en 4 a 10% de los pacientes. La trombocitopenia es la manifestación clínica más común en los pacientes WAS y van desde epistaxis (16%), petequias y púrpura (78%), así como hematemesis y melena (28%), hemoptisis (6%) y hemorragia intracraneal (2%), las cuales ponen en riesgo la vida (Ochs, 2001; Ochs, 2002; Imai *et al.*, 2004). Se ha considerado que la destrucción acelerada de las plaquetas podría ser causada por un defecto intrínseco en el citoesqueleto de las plaquetas de los pacientes con WAS, o que podría estar mediada por una reacción de tipo autoinmune con la presencia de anticuerpos antiplaquetarios (Bosticardo *et al.*, 2009).

La segunda condición más recurrente es la presencia de eczemas, observada desde la etapa lactante y en la infancia en 80% de los pacientes. Se ha demostrado que la severidad depende del nivel de expresión de WASp. Es decir, pacientes con niveles residuales de WASp desarrollan la enfermedad de forma moderada o transitoria, y los pacientes que carecen completamente de la expresión de WASp desarrollan eczemas graves (Imai *et al.*, 2004). En los casos graves, los eczemas pueden ser resistentes al tratamiento y persistir hasta la edad adulta, facilitando infecciones oportunistas en la piel (revisado en Blancas *et al.*, 2011).

Debido a la profunda deficiencia inmune de tipo celular y humoral, los pacientes con WAS son altamente susceptibles a contraer infecciones por bacterias (otitis media, neumonía, enterocolitis, meningitis, entre otras), virus (Herpes simplex y Citomegalovirus), e infecciones micóticas (*Candida spp.*, *Aspergillus spp.* y *Pneumocystis carinii*). Al igual que la trombocitopenia y el eczema, se ha reportado una correlación entre los niveles de expresión de WASp y la severidad de las infecciones (Imai *et al.*, 2004).

Se ha descrito que las manifestaciones autoinmunes son comunes en pacientes con WAS, las estimaciones sugieren que hasta el 40% de los pacientes desarrollan autoinmunidad. Las manifestaciones autoinmunes más recurrentes son anemia hemolítica (36%), vasculitis (incluyendo vasculitis cerebral, 29%), inflamación del intestino (9%), entre otras (Catucci *et al.*, 2012). Hasta ahora, los mecanismos de autoinmunidad no son claros, aunque puede deberse a la formación de autoanticuerpos o a la presencia de clonas de células T autorreactivas (Buchbinder *et al.*, 2014). La presencia de autoinmunidad en los pacientes con WAS está correlacionado con el desarrollo de malignidades y el incremento de la mortalidad (Moratto *et al.*, 2007).

El desarrollo de malignidades en pacientes con WAS es de aproximadamente 13%, siendo más frecuente en adolescentes y jóvenes adultos, con un promedio de edad de 9.5 años. Aproximadamente el 75% de los pacientes que desarrollan algún tipo de tumor han sido diagnosticados previamente con manifestaciones autoinmunes. El linfoma es la malignidad más común en los pacientes con WAS, con una mayor preponderancia del linfoma no Hodgkin en comparación con el linfoma de Hodgkin. Otras malignidades asociadas a WAS incluyen mielodisplasia, leucemia y desórdenes mieloproliferativos; la mortalidad de los pacientes que desarrollan algún tipo de malignidad es hasta un 95%.

2.2 La proteína WASp

El gen de *WAS* fue mapeado en la región p11.22-11.23 del cromosoma X y codifica para una proteína de 502 aminoácidos llamada WASp (Derry *et al.*, 1994). WASp está codificada por 12 exones y presenta diferentes dominios que juegan un papel crucial en la regulación de la polimerización de actina (Figura 3). WASp es miembro de una distintiva familia de proteínas citoplasmáticas que promueven la nucleación/polimerización del citoesqueleto de actina a través de la activación del complejo proteico Arp2/3 (Morato *et al.*, 2007; Tyler *et al.*, 2016).

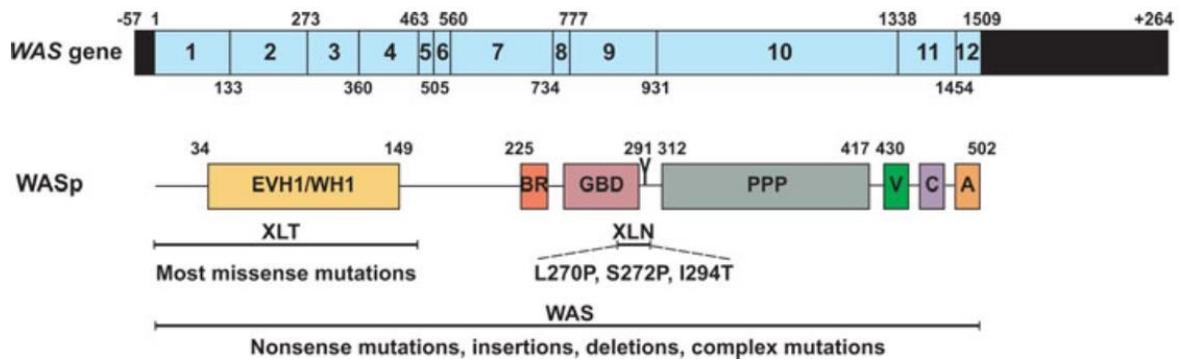


Figura 4. Representación esquemática de la organización de los exones del gen WAS y los dominios de la proteína WASp. El gen WAS consta de 12 exones que codifican para los diferentes dominios funcionales de la proteína WASp. Se muestran los sitios en la proteína en los que se han identificado mutaciones que causan las tres variedades de WAS.

La familia WASp consta de cinco miembros (Figura 5), WASp, N-WASp (WASp neural), WAVE1 (familia homóloga 1 de verprolina de WASp), WAVE2 y WAVE3, que se pueden dividir en dos subgrupos, WASp/N-WASP y WAVEs (Takenawa y Miki, 2001; Stradal *et al.*, 2004). Es una proteína altamente conservada en células de mamífero y levadura; en todos los casos se ha descrito su papel como activador del complejo Arp2/3 para la nucleación de los filamentos de actina (Burianek y Soderling, 2013).

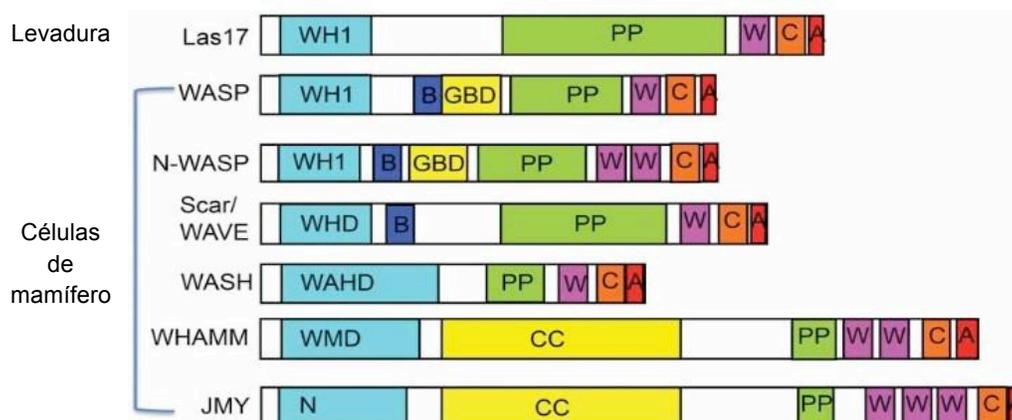


Figura 5. Miembros de la familia WASp. Se muestran los dominios presentes en cada una de las proteínas de los miembros de la familia WASp (Modificado de Tyler *et al.*, 2016).

2.2.1 Dominios funcionales de WASp

En la región amino terminal se localiza el dominio EVH1/WH1 (del inglés Ena-VASP homology domain/WASp homology domain 1), el cual interactúa con las proteínas WIP (del inglés WASp interacting protein) para formar el complejo WASp/WIP. Este complejo participa en la modulación del citoesqueleto mediante su unión a WIP, lo que estabiliza a WASp, manteniendo así una regulación espacial y temporal de su actividad (Jin et al., 2004).

Cuando la célula no está estimulada (Figura 6), WASp se encuentra en el citoplasma en un estado inactivo, dado por la interacción intramolecular entre el dominio BR (del inglés basic región), el dominio GBD (del inglés GTP-ase binding domain) y el dominio VCA (del inglés verprolin homology, cofilin homology, acidic región). En respuesta a un estímulo, la unión de Cdc42 (Cdc42-GTP) al dominio GBD promueve la liberación del dominio VCA, lo que permite la activación de WASp. Este estado activo se mantiene por la fosforilación de un residuo de tirosina en la posición 291 (Y291) de WASp (Guinamard, R. et al. 1998).

El dominio rico en prolina (PPP) es el sitio de unión de diferentes proteínas que presentan dominios SH3, incluyendo miembros de la familia de quinasas Src y Tec. Se ha demostrado que las proteínas tirosina quinasas tales como Btk, Hck y Fyn, interactúan con el dominio PPP de WASp, lo que permite la adecuada conformación estructural de WASp (Revisado en Massaad et al., 2013). Se ha reportado que la delección del dominio PPP abole la capacidad de WASp para inducir la polimerización del citoesqueleto de actina.

El dominio VCA se encuentra localizado en el sitio carboxilo terminal y es característico de todos los miembros de la familia WASp. Este dominio está conformado por tres regiones: región de homología a verprolina, región central y región ácido central. El dominio VCA juega un papel clave en la unión a actina y a un complejo de siete proteínas llamado Arp2/3 (proteína relacionada con la actina), lo que inicia la nucleación de los filamentos de actina, regulando así la

polimerización (Symons *et al.*, 1996; Higgs y Pollard, 2000). El reclutamiento del complejo Arp2/3 está restringido por la unión del dominio VCA con el dominio GBD de WASp. Cuando la célula es estimulada se libera el dominio VCA, generando así la conformación activa de WASp (Buck y Rosen, 2001; Kim *et al.*, 2000) (Figura 6).

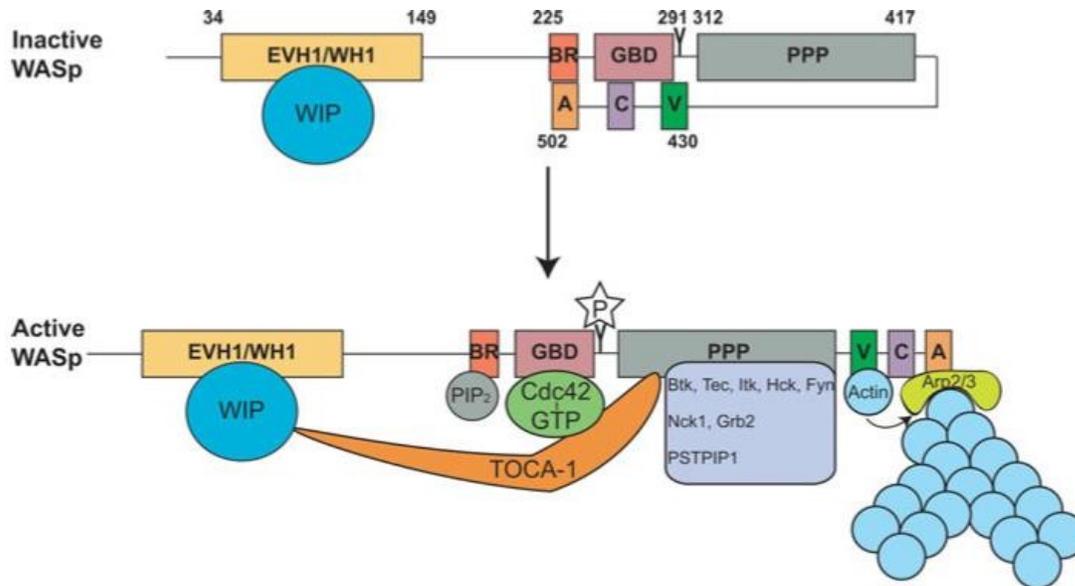


Figura 6. La conformación de WASp depende del estado de activación de la célula. Los cambios conformacionales de WASp en respuesta a las señales de activación liberan al dominio VCA, lo que permite la unión de proteínas que inician la nucleación y polimerización de actina.

2.3 Mutaciones en el gen WAS

Se han identificado aproximadamente 300 mutaciones distribuidas en todo el gen WAS. De acuerdo a Ochs y Thrasher (2006), las mutaciones más frecuentes son: mutaciones con cambio de sentido (missense mutations), seguido de mutaciones de sitio de empalme (splice-site mutations), deleciones, inserciones, mutaciones sin sentido (nonsense), inserciones BR y mutaciones complejas, distribuidas en todo el gen WAS (Figura 7).

La mayoría de las mutaciones con cambio de sentido (missense mutations) en pacientes con WAS están presentes en el dominio WH1. Como consecuencia, la

interacción alterada de WASp con WIP promueve la disociación del complejo y la degradación de WASp (Luthi et al., 2003). En cambio las deleciones e inserciones están distribuidas en todo el gen, lo que conlleva a un cambio en el marco de lectura, ocasionando la finalización temprana de la transcripción (Ochs y Thrasher, 2006).

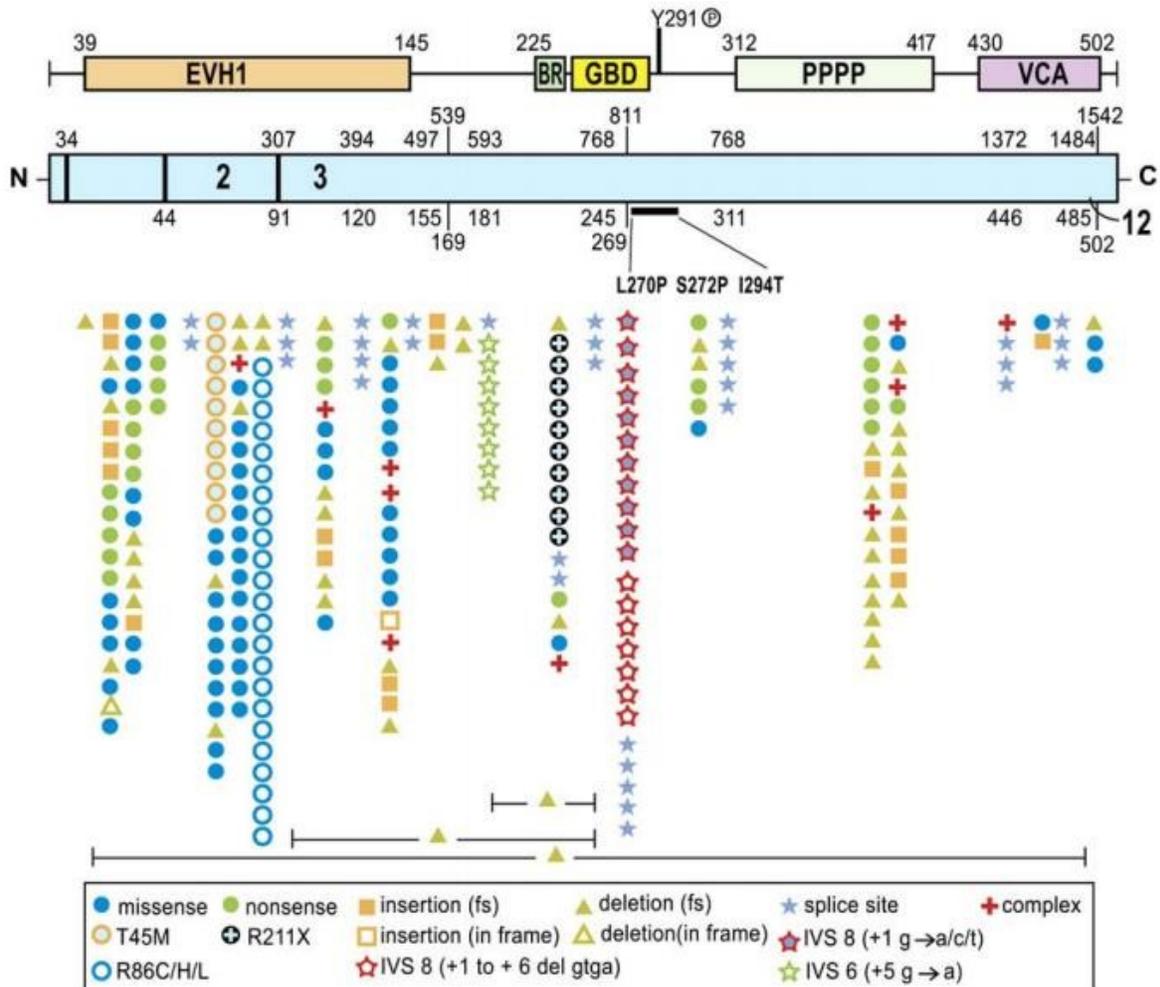


Figura 7. Localización de mutaciones en el gen WAS. Las mutaciones identificadas en 270 familias (no relacionadas) con WAS se visualizan de acuerdo con el tipo de mutación y su ubicación en el gen (Ochs y Thrasher, 2006).

2.4 Expresión y función de WASp en células del sistema inmune

La expresión de WASp es exclusiva de células de linaje hematopoyético (Parolini et al., 1997), se localiza principalmente en el citoplasma (81%) y en menores

proporciones en la parte interna de la membrana plasmática (16%) y en el núcleo (3%) (Rivero et al., 1995). Se ha descrito que WASp es una molécula multifuncional, ya que es esencial en el desarrollo y la activación de linfocitos, está implicada en procesos de migración celular, activación celular, quimiotaxis, formación de la sinapsis inmune, etc. (Blundell et al, 2010). De acuerdo a Notarangelo y colaboradores (2008), WASp desempeña un papel importante en la movilidad celular, la interacción célula-célula, la señalización celular y la citotoxicidad, por lo que alteraciones en la proteína resultan en afectaciones en la respuesta inmune innata y adaptativa, así como en defectos en la homeostasis de las plaquetas (Figura 8).

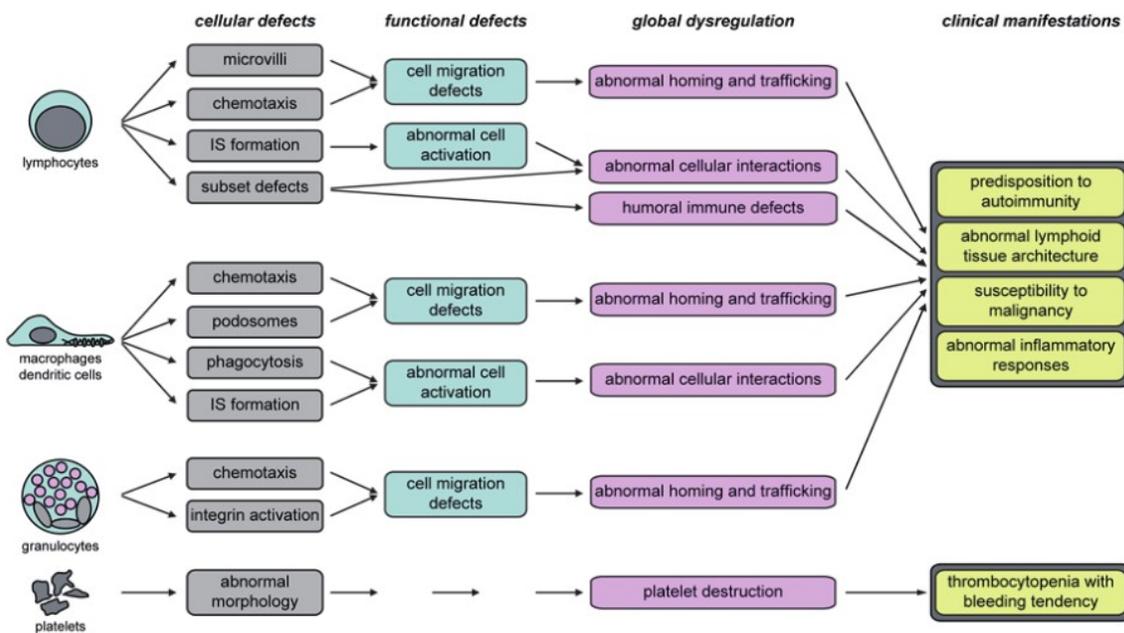


Figura 8. Defectos funcionales en células hematopoyéticas causadas por la pérdida de WASp. Las funciones celulares alteradas por la ausencia de WASp tienen como consecuencia la disfunción de diferentes tipos celulares, lo que conlleva a las manifestaciones clínicas de WAS (Blundell et al, 2010).

Se ha reportado una fuerte correlación entre los niveles de expresión de WASp y la severidad de los síntomas de WAS. La nula expresión de WASp conduce a múltiples daños celulares del linaje hematopoyético, mientras que la disminución en la expresión de WASp provoca daños celulares menos severos (Ochs et al.,

1980). Cabe señalar que se ha identificado un elevado porcentaje de mosaicismo en los pacientes con WAS, en comparación con otras inmunodeficiencias. En algunos casos se ha observado que las mutaciones secundarias *de novo* dan lugar a una reversión de la proteína de tipo silvestre, lo que ofrece una ventaja selectiva para las células WASp positivas. La ventaja selectiva depende del lugar donde se produce la reversión. Algunas mutaciones muestran solo una ventaja para las células T, mientras que otras mutaciones confieren ventajas tanto a los linajes de las células NK como a las células T. No obstante, la reversión en células T no es suficiente para anular la aparición de la enfermedad (Konno *et al.*, 2004; Trifari *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2006).

2.4.1 Defectos en la función citotóxica de células NK de pacientes con WAS

Las células NK son sumamente importantes en la defensa inmunitaria innata debido a que tienen la capacidad de eliminar células infectadas por virus, parásitos y células malignas. Al ser estimuladas, migran rápidamente para matar a las células blanco y liberar citocinas que incrementan la respuesta inmune. Como ya se ha descrito, para que se lleve a cabo la actividad citotóxica de las células NK, es indispensable la formación de una sinapsis inmunológica, la cual depende de la polimerización del citoesqueleto de actina (Revisado en P. Blundell *et al.*, 2010).

Se ha reportado que los pacientes con WAS y XLT tienen niveles normales a elevados de células NK en sangre periférica (Gismondi *et al.*, 2004). En células NK de personas sanas, WASp se expresa y localiza hacia la sinapsis inmunológica, junto con los filamentos de actina. No obstante, las células NK de pacientes con WAS presentan una disminución en la acumulación de WASp y los filamentos de actina en la sinapsis inmunológica (Gismondi *et al.* 2004; Massaad *et al.*, 2013). Por otra parte, la polarización del centro organizador de microtúbulos (MTOC, por sus siglas en inglés) y de gránulos líticos hacia la sinapsis inmunológica, está severamente disminuida en las células NK de los pacientes con WAS. En consecuencia, la capacidad lítica de las células NK contra células blanco se encuentra disminuida, lo que podría contribuir al desarrollo de tumores que se ha

observado en algunos pacientes con WAS (Orange *et al.* 2002). Las células NK aisladas de pacientes con WAS y tratadas *ex vivo* con IL-2 presentan una redistribución correcta de F-actina durante la sinapsis inmunológica (Gismondi *et al.*, 2004).

En general, la citotoxicidad de las células NK de pacientes con WAS clásico está drásticamente afectada debido a la disminución en la expresión de WASp y por lo tanto a la disminución en la localización de los filamentos de actina hacia el sitio de la sinapsis inmunológica, lo que conduce a la reducción en la formación de conjugados. Los pacientes con XLT muestran una variedad de fenotipos en la citotoxicidad de las células NK, que dependen de los niveles de expresión de WASp (Orange *et al.*, 2002; Gismondi *et al.*, 2004).

2.4.2 Defectos en la función citotóxica de linfocitos T CD8⁺ de pacientes WAS

Se ha descrito una reducción significativa en el número de linfocitos T en sangre periférica de pacientes con WAS, así como una proliferación deficiente de estas células en respuesta a la estimulación a través del TCR. Además, la secreción de IL-2, IFN γ y TNF α está fuertemente disminuida en las células T CD8⁺ de los pacientes con WAS, en comparación con los linfocitos T CD8⁺ de donadores sanos (Trifari *et al.*, 2006).

Existe poca información sobre los efectos citotóxicos de los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con WAS. De Meester y colaboradores demostraron que los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con WAS expresan niveles normales de moléculas líticas, con una adecuada exocitosis ante el encuentro con células diana. Además, se demostró que los linfocitos T citotóxicos de los pacientes con WAS no matan eficazmente a células diana de linfoma de células B, debido a una polarización deficiente de los gránulos citotóxicos hacia el sitio de contacto con el tumor. Sin embargo, la mayoría de los ensayos funcionales que se han realizado hasta el momento han estudiado la función efectora de células que han pasado por un proceso de expansión celular. Por lo tanto, es de suma importancia conocer el

efecto citotóxico de linfocitos T CD8+ de pacientes con WAS que no han atravesado procesos de expansión celular, lo que nos brindará información sobre la funcionalidad de estas células en condiciones fisiológicas.

3. JUSTIFICACIÓN

La baja prevalencia de estas condiciones en México se debe al registro deficiente de los casos identificados, así como al desconocimiento general y específico de las IDPs por parte de los médicos, además de la inaccesibilidad de los estudios de diagnóstico que ocurre en la mayor parte de los hospitales de México (Coria *et al.*, 2010).

En México, los estudios moleculares y funcionales de las células del sistema inmune de pacientes con WAS son escasos. Hasta el momento no se cuenta con ningún reporte donde se caractericen las mutaciones en el gen *WAS* en la población mexicana. Por otra parte, la mayoría de los ensayos funcionales en los que se evaluaron los efectos citotóxicos de las células de pacientes con mutaciones en *WAS* comprenden sólo el estudio de células NK. Además, como se mencionó anteriormente, los ensayos se han realizado utilizando células que han pasado por un proceso de expansión celular. Por tal motivo, es de suma importancia estudiar el estado funcional de linfocitos T CD8+ en condiciones que simulan el estado fisiológico, así como llevar a cabo la caracterización molecular de las mutaciones encontradas en pacientes pediátricos con WAS en la población mexicana.

4. HIPÓTESIS

Dado que WASP tiene un papel fundamental en la reorganización del citoesqueleto de actina en células hematopoyéticas, la función citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con WAS será severamente afectada en pacientes que presentan la proteína WASp trunca y en pacientes que no expresan WASp.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Evaluar las funciones efectoras de los linfocitos T CD8⁺ de pacientes pediátricos con mutaciones en *WAS*.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar y caracterizar mutaciones nuevas en el gen *WAS*.
- Evaluar la degranulación de linfocitos T CD8⁺ de pacientes pediátricos con mutaciones en *WAS* frente a células blanco P815.
- Evaluar la producción de interferón gamma (IFN γ) de linfocitos T CD8⁺ de pacientes pediátricos con mutaciones en *WAS* en respuesta a un estímulo con células blanco P815 cargadas con anticuerpo anti-CD3.

6. METODOLOGÍA

6.1 Criterios de inclusión y de exclusión de pacientes y controles

En las Tablas 2 y 3 se muestran los criterios bajo los cuales se incluyeron o excluyeron las muestras de pacientes y controles para llevar a cabo este estudio.

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión de pacientes

	<i>Requisitos para inclusión</i>	<i>Motivos de exclusión</i>
Citometría de flujo para WASp	+	-
Cuadro clínico asociado a WAS	+	-
Muestras de sangre provenientes de hospitales participantes	+	-
Cartas de consentimiento informado	+	-

Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión de controles

	<i>Requisitos para inclusión</i>	<i>Motivos de exclusión</i>
Trastornos autoinmunes	-	+
Diagnóstico de WAS	-	+
Muestras de sangre provenientes de hospitales participantes	+	-

6.2 Obtención y manejo de muestras para purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Durante un periodo de 2 años se recopilaron muestras de sangre periférica (5-10 ml) mediante punción venosa y se colocaron en viales tratados con EDTA o heparina. Las muestras obtenidas fueron de pacientes pediátricos con manifestaciones asociadas a WAS, o con diagnóstico de WAS mediante el análisis de la expresión de WASp por citometría de flujo. Por cada paciente incluido se obtuvo la muestra de un individuo sano para ser utilizado como control negativo. Para ello se contó con previo consentimiento informado de los padres y con asentimiento en el caso de niños mayores de 8 años de edad.

Las muestras se canalizaron principalmente a través del Instituto Nacional de Pediatría (INP) de la Ciudad de México, el cual funciona como unidad de referencia nacional para el diagnóstico clínico y tratamiento de inmunodeficiencias primarias. Adicionalmente, se recibieron 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 fueron enviadas por mensajería exprés y posteriormente procesadas en un tiempo no mayor a 24 horas. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se purificaron por métodos convencionales mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque. En algunos casos, las PBMCs purificadas (1×10^6) se expandieron incubando las células con PHA (1.25 ug/ml) e IL-2 (100U/ml) a 37°C por un periodo de 6 a 10 días, hasta obtener los números deseados de células para futuros experimentos. Las células se mantuvieron en cultivo en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml, estreptomina 50 ug/ml y beta-mercaptoetanol 50 uM.

6.3 Extracción de RNA y generación de cDNA para secuenciación

Después de la expansión de PBMCs, se utilizaron 10×10^6 células para llevar a cabo la extracción de RNA. La extracción de RNA total se realizó siguiendo el método de Trizol® (Ambion, LifeTechnologies). A partir del RNA, la generación de cDNA se hizo siguiendo el protocolo del kit ImProm-II™ Reverse Transcription System. Posteriormente, a partir del cDNA se amplificó el gen *WAS* utilizando 4 pares de oligonucleótidos que amplifican los 12 exones que conforman la secuencia codificante del gen *WAS*. Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific) y se enviaron a secuenciación por Sanger. Las mutaciones se identificaron con ayuda de los programas Snap gene y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

6.4 Ensayos de degranulación basados en la expresión del marcador CD107a

Con la finalidad de evaluar la función citotóxica de linfocitos T CD8⁺, las células mononucleares se activaron con PHA (1.25 ug/ml) e IL-2 (100 U/ml) en un periodo de 36 a 48 hrs. De forma paralela, se evaluó la degranulación de linfocitos T CD8⁺ no activados. Posteriormente, las PBMCs se incubaron con la línea celular P815 por un periodo de 3 horas en a 37°C en placas de 96 pozos. Al término de la incubación, las células se marcaron con el siguiente cocktail de anticuerpos acoplados a fluoroforos: anti-CD8 APC, anti-CD57 FITC, anti-CD107a PE. Las células se incubaron con la mezcla de anticuerpos durante 30 min a 4°C, protegidas de la luz. Finalmente, se eliminó el exceso de anticuerpo mediante un lavado con PBS con 2% de suero fetal bovino, y las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACSCanto II con el software Facs Diva, y el análisis de los datos se llevó a cabo con el software FlowJo.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de la expresión de WASp por en pacientes con cuadro clínico asociado a WAS

El análisis de la expresión de la proteína WASp por citometría de flujo ha sido la prueba más usada para el diagnóstico de WAS debido a que la ausencia de WASp es indicativo de que el paciente presenta el síndrome clásico, y una disminución en la expresión de la proteína es sugerente del desarrollo de una de las variedades de la enfermedad (XLT). Con la finalidad de confirmar un primer diagnóstico de pacientes pediátricos con cuadro clínico asociado a WAS, se evaluó la expresión de la proteína WASp en muestras de pacientes que fueron previamente diagnosticados con manifestaciones clínicas asociadas a la enfermedad, o que contaban con análisis previos para evaluar la expresión de la proteína.

Los niveles de expresión de WASp se evaluaron por citometría de flujo en células PBMCs de pacientes que presentaron el cuadro clínico asociado a WAS: trombocitopenia, eccemas e infecciones recurrentes (Figura 9). Como se observa en la Figura 9A, en algunos pacientes los niveles de expresión de la proteína son equivalentes a los observados en los controles sanos, lo que sugiere el desarrollo de variedades de WAS en los que la expresión de la proteína no se encuentra alterada. A diferencia de estos pacientes, en la Figura 9B se muestra la ausencia, o una disminución importante en la expresión de WASp en algunos de los pacientes que también manifiestan el cuadro clínico asociado a WAS, lo que indicaría la presencia de la forma clásica de WAS o de XLT en estos pacientes. Como se mencionó anteriormente, el diagnóstico basado exclusivamente en los ensayos de citometría de flujo para evaluar los niveles de expresión de la proteína WASp no es suficiente para determinar el tipo de síndrome que desarrolla cada paciente. Para complementar el diagnóstico, son necesarias pruebas moleculares que aporten información sobre las alteraciones a nivel genético que podrían modificar la expresión y/o la función de la proteína WASp en cada paciente.

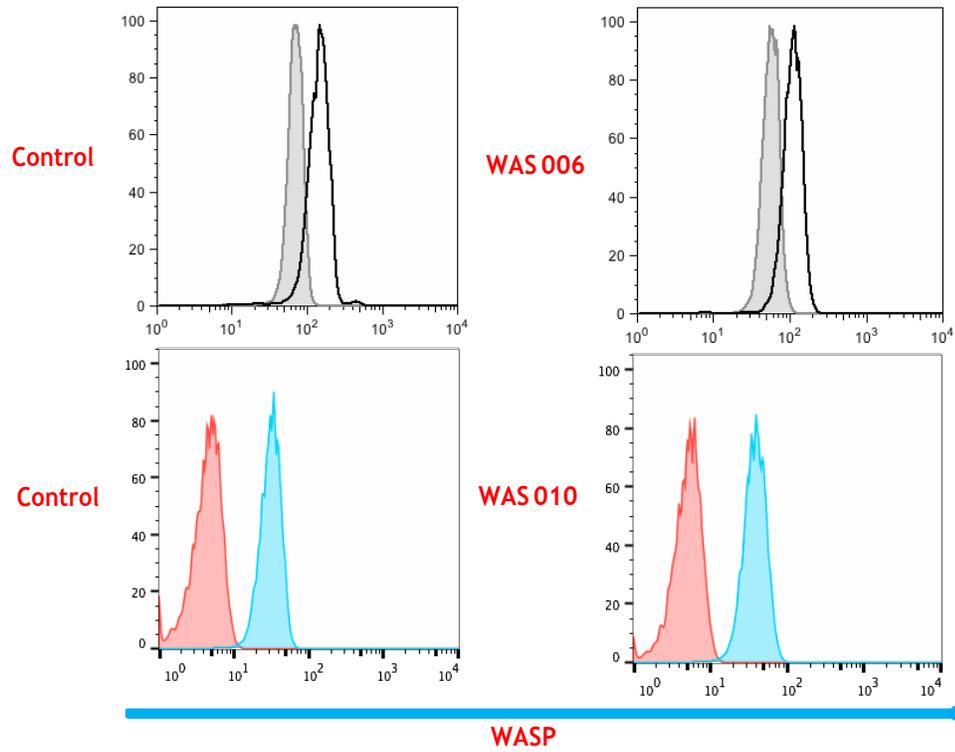


Figura 9. Diferencias en la expresión de la proteína WASp en pacientes que presentan manifestaciones clínicas asociadas a WAS. A, Expresión equivalente de WASp en pacientes y controles sanos. **B,** Disminución en la expresión de WASp en pacientes en comparación con controles sanos

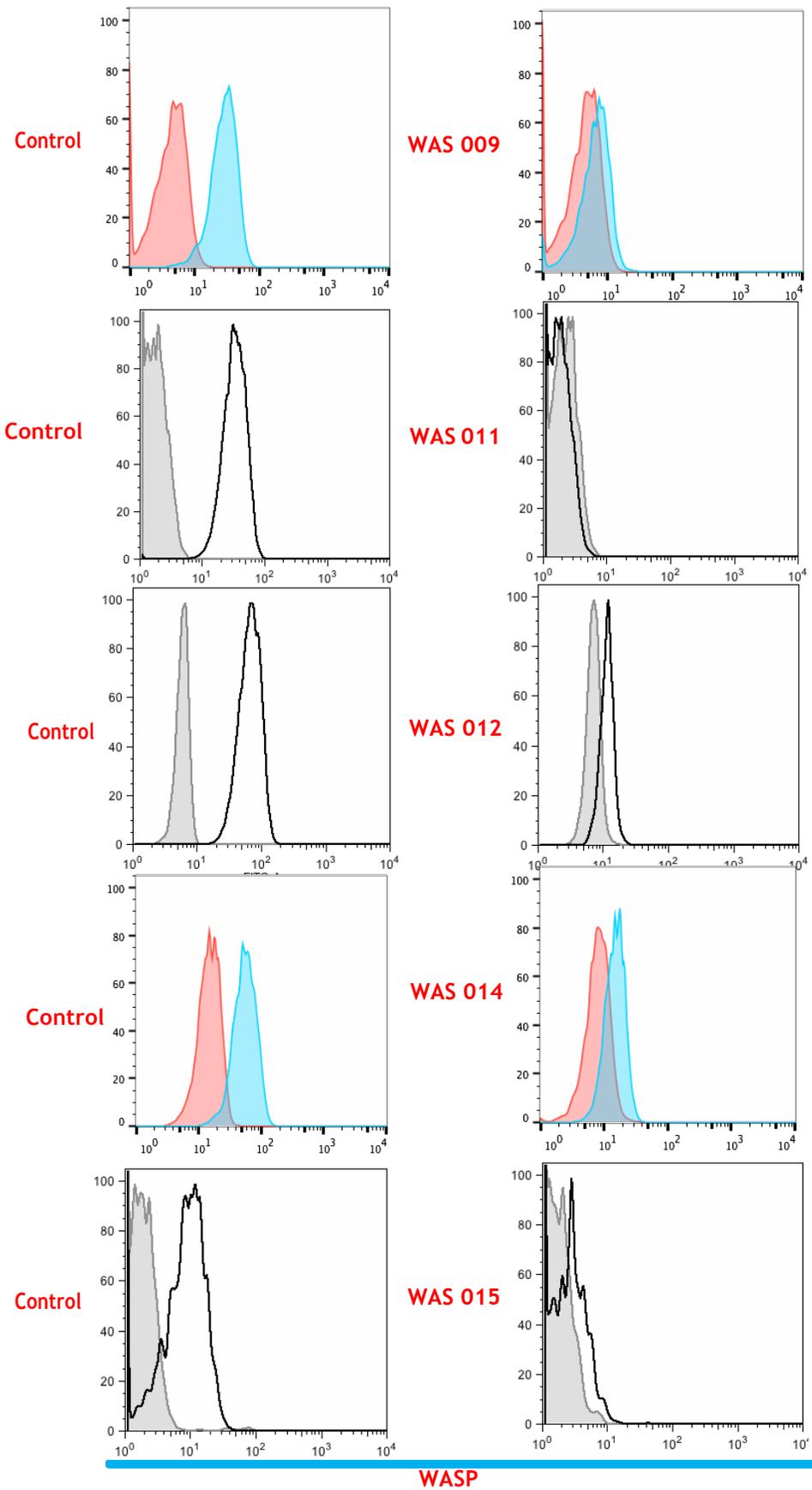


Figura 10. Histograma donde se muestra la intensidad media de fluorescencia. En gris o rojo se muestra el control de isotipo y en línea negra o azul WASP.

7.2 Identificación de mutaciones en el gen WAS

Con la finalidad de contribuir a un mejor diagnóstico de los pacientes con WAS, se evaluaron las alteraciones genéticas que son responsables de inducir la enfermedad. La identificación de mutaciones se llevó a cabo en las muestras de 18 pacientes que presentaron un cuadro clínico asociado a WAS. Brevemente, a partir de cada muestra se siguieron los siguientes pasos: extracción de RNA, generación de cDNA, amplificación de fragmentos del gen WAS con oligonucleótidos específicos que comprenden el total de la secuencia codificante del gen, secuenciación por el método de Sanger y análisis e identificación de las mutaciones.

La extracción de RNA se llevó a cabo a partir de 10×10^6 células PBMCs, las cuales fueron recuperadas al finalizar la expansión con PHA (1,25 ug/ml) e IL-2 (100U/ml). La extracción de RNA total se realizó siguiendo el método descrito de Trizol® (Ambion, LifeTechnologies). En todas las muestras se evaluó la integridad del RNA mediante un análisis electroforético. En la Figura 10 A se observan dos bandas que corresponden a las dos subunidades (28s y 18s) del RNA ribosomal, este patrón de bandas indica la extracción apropiada de RNA en las dos muestras representativas. Una vez obtenido el RNA, se generó el cDNA siguiendo el protocolo del kit ImProm-II™ Reverse Transcription System. Para corroborar la integridad del cDNA, se realizó una PCR confirmatoria utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen del factor de elongación 1 (EF1), un gen *housekeeping* o constitutivo. En la Figura 10 B se observa que la amplificación del gen EF1 fue exitosa, lo que confirma la integridad y funcionalidad del cDNA.

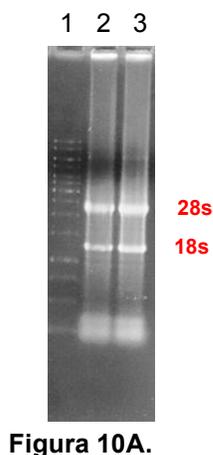


Figura 10A.

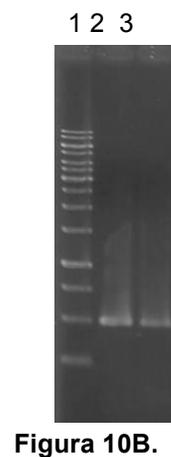


Figura 10B.

Figura 10. Integridad de RNA y cDNA. Electroforesis de dos muestras representativas para confirmar el procesamiento correcto del RNA (**A**) y DNA (**B**). En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular y en los carriles 2 y 3 se observan las bandas correspondientes a las subunidades del RNA ribosomal (A) y a la amplificación del gen EF1 (B).

Con el propósito de identificar mutaciones en la secuencia codificante del gen *WAS*, se sintetizaron 4 pares de oligonucleótidos que amplifican los 12 exones que conforman la secuencia codificante del gen *WAS*. En la Figura 11 se muestra una imagen representativa del patrón de bandas que se obtuvo en todas las muestras al amplificar el gen *WAS* con dichos oligonucleótidos: el par uno amplifica un fragmento de 495 pb que abarca los exones 1-4, el par dos genera un fragmento de 475 pb, abarcando los exones 4-9, el par tres amplifica un fragmento de 594 pb que abarca los exones 9-11, y el par cuatro da lugar a un fragmento de 303 pb que abarca los exones 11-12. En algunos casos se amplificó un fragmento inespecífico adicional; en estos casos se purificó el fragmento correspondiente al tamaño esperado a partir del gel de agarosa (Figura 11, carril 4). Una vez obtenida la amplificación de los cuatro fragmentos correspondientes, los productos de PCR fueron purificados usando el kit GeneJET gel extraction. En conjunto, el uso de los cuatro pares de oligonucleótidos nos permitió amplificar por completo la secuencia codificante del gen *WAS*.

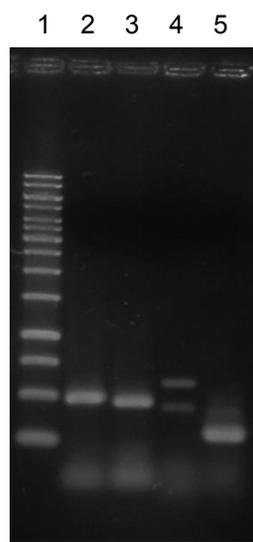


Figura 11. Amplificación de la secuencia codificante del gen WAS. Carril 1: MPM; carril 2: fragmento de 495 pares de bases (pb) correspondiente a los exones 1-4; carril 3: fragmento de 475 pb, correspondiente a los exones 4-9; carril 4: fragmento de 594 pb que corresponde a los exones 9-11; carril 5: fragmento de 303 pb que abarca los exones 11-12.

Para la identificación de las mutaciones en el gen WAS, los productos de PCR se secuenciaron por el método de Sanger. El análisis de las secuencias se hizo utilizando los programas Snap gene y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para identificar las mutaciones. A partir de los pacientes evaluados, se identificaron 13 mutaciones, entre las cuales se incluyen deleciones, inserciones, mutaciones con cambio de sentido (missense mutation) y mutaciones sin sentido (nonsense mutation). En la Figura 12 y la Tabla 4 se describen las mutaciones identificadas en los pacientes (WAS 001-WAS 018), así como el efecto de éstas en la expresión de la proteína WASp. Las deleciones o inserciones cambian el marco de lectura, lo que genera un codón de paro prematuro durante la síntesis proteica; dependiendo de la ubicación de la mutación, esto puede resultar en la producción de una proteína trunca o en la ausencia total de la proteína. De las 13 mutaciones identificadas, cuatro (WAS 001, WAS002, WAS004 y WAS017) corresponden a deleciones que tienen como consecuencia la generación de la

proteína WASp trunca. En las mutaciones con cambio de sentido, dependiendo el aminoácido que se genere, se puede afectar drásticamente la estructura y función de la proteína, diferenciando así el desarrollo de variedades XLT de WAS. Por lo tanto, dada la escasa información que se tiene sobre la funcionalidad de las proteínas que surgen como consecuencia de las mutaciones, la caracterización funcional de dichas proteínas WASp es de suma importancia para complementar el diagnóstico de cada paciente.

Tabla 4. Registro de mutaciones identificadas en pacientes con cuadro clínico asociado a WAS.

Paciente	Tipo de mutación	Mutación en cDNA	Exón	Cambio en proteína	Nivel de expresión
WAS001 ¥	Delección	c.1228delC	10	p.Pro410GlnfsX444	Reducido
WAS002 ¥†	Delección	c.888delC	9	p.Asp296fsX307	Reducido
WAS003 †	Nonsense	c.191G>A	2	p.Trp64X	Ausente
WAS004 ¥†	Delección	c.1424-1428del5pb	11	p.Gln475fsX492	Reducido
WAS005 *	Missense	c.256C>T	2	p.Arg86Cys	Ausente
WAS006	Neg				Detectado
WAS007	Delección	c.1093delG	10	p.Gly365fsX444	Ausente
WAS008	Delección	c.1459delG	12	p.Gly487fs	Reducido
WAS009 *	Missense	c.245C>T	2	p.Ser82Phe	Ausente
WAS010	Neg				ND
WAS011	Neg				Ausente
WAS012	Delección	c.290delG	3	p.Trp97fsX126	Reducido
WAS013	Delección	c.177delT	2	p.Pro59fsX75	ND
WAS014	Inserción	c.276insT	3	p.Ala92AspfsX121	ND
WAS015 †	Neg				Ausente
WAS016	Neg				ND
WAS017 ¥*	Delección	c.1032delT	10	p.Pro344fsX444	ND
WAS018	Missense	c.1294G>A	10	p.Gly432Arg	ND

¥, proteína trunca; †, decesos; *, mutaciones reportadas; Neg, sin mutación; ND, no determinado.

El sitio en el que ocurren las mutaciones puede definir los niveles de expresión de la proteína, así como su funcionalidad. En la Figura 13 se muestra una representación esquemática de todas las mutaciones identificadas, incluyendo su posición dentro del gen *WAS* y en la proteína *WASp*. Seis de las mutaciones identificadas se concentran en el dominio EVH1, un sitio que ha sido descrito como *hotspot* (sitio en el DNA con mayor frecuencia de mutación). Cabe resaltar que en las dos mutaciones identificadas de tipo missense, no se detecta la expresión de la proteína (Tabla 4, WAS005 y WAS009), lo que sugiere que el

cambio de aminoácido que surge como consecuencia de la mutación, podría inducir alteraciones en la estructura de la proteína que podrían promover su degradación.

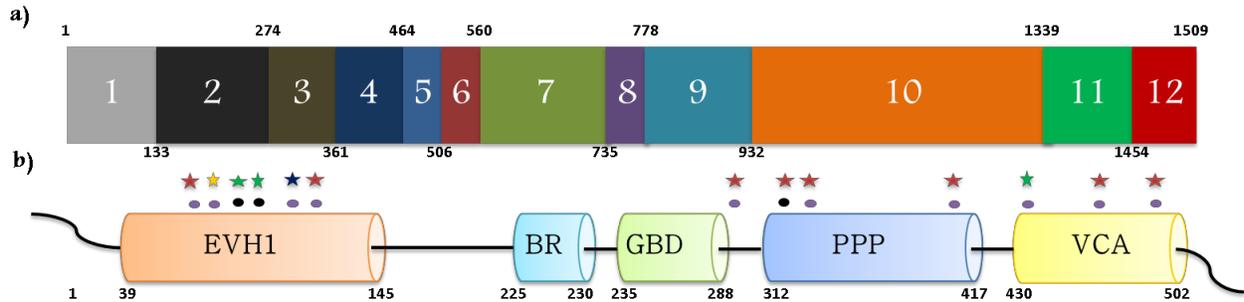


Figura 13. Representación esquemática de mutaciones identificadas en gen WAS. El gen WAS está formado por 12 exones (A) que codifican para los cinco dominios funcionales de la proteína WASp (B). Las estrellas rojas indican deleciones, las estrellas verdes indican sitios de mutaciones de tipo missense, las estrellas amarillas corresponden a mutaciones de tipo nonsense, las estrellas azules indican sitios de inserciones, los círculos negros representan mutaciones previamente reportadas, y los círculos morados, corresponden a mutaciones nuevas.

7.3 La subpoblación CD8+/CD57+ está incrementada en pacientes con WAS

La expresión del marcador CD57 es indicativo de células senescentes. Estas células tienen una capacidad disminuida para proliferar, pero mantienen un alto potencial citotóxico. Con el objetivo de caracterizar con detalle la funcionalidad de células citotóxicas en pacientes con WAS, se evaluó la presencia de subpoblaciones de linfocitos T CD8+ con diferentes capacidades citotóxicas. Para ello se analizó la presencia de la subpoblación CD8+/CD57+ en muestras de sangre total de pacientes con WAS. En la Figura 14 A se muestra un aumento en la cantidad de células en la subpoblación CD8+/CD57+, con respecto a los controles sanos. El análisis estadístico indica que en los pacientes con WAS, la subpoblación CD8+/CD57+ está enriquecida hasta en un 50% más, en comparación con los controles sanos.

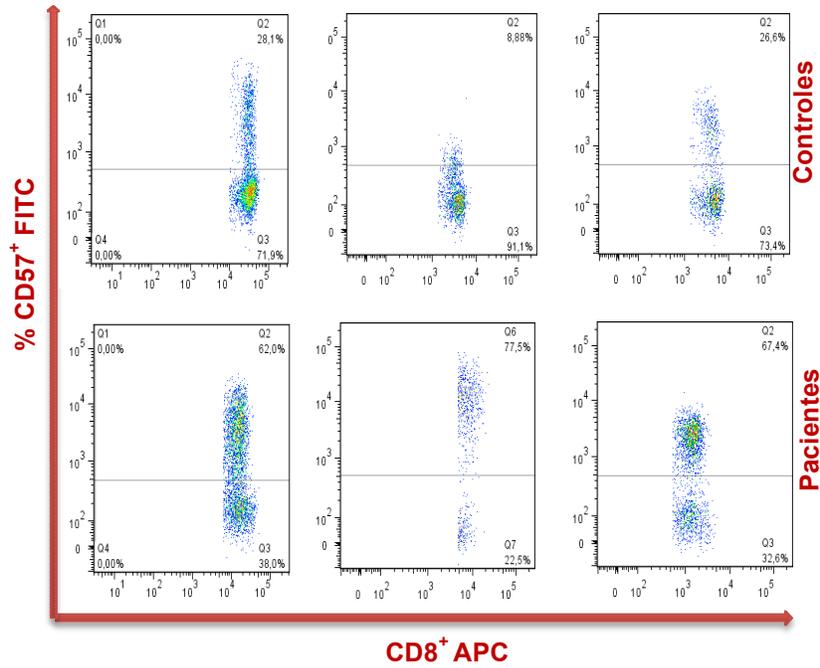
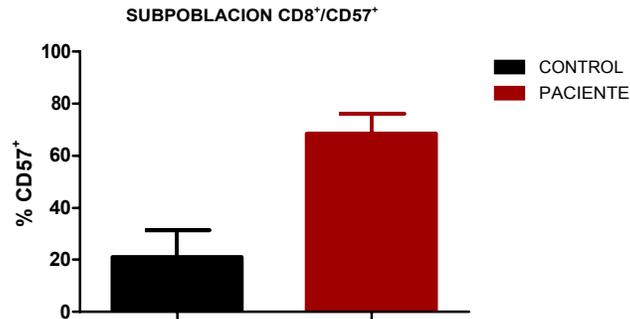
A**B**

Figura 14. Enriquecimiento de la población CD8⁺/CD57⁺ en sangre total de controles sanos y pacientes con WAS. Evaluación por citometría de flujo de la expresión de CD57 en linfocitos T CD8⁺ de controles sanos y pacientes WAS (A) y cuantificación del porcentaje de células CD8⁺/CD57⁺ en todos los pacientes (B).

7.4 Los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con WAS presentan deficiencias funcionales

Como se mencionó anteriormente, las consecuencias funcionales de mutaciones en WASp se han descrito solamente en células que han pasado por un proceso de expansión *in vitro*. Por tal motivo, en este estudio nos enfocamos en caracterizar los efectos de las mutaciones identificadas en WAS, primordialmente aquellas mutaciones que generan una proteína trunca, en células que se encuentran en estado fisiológico y que no han sido estimuladas para inducir la expansión celular. De forma específica, nos enfocamos en determinar el efecto de dichas mutaciones en la función citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con WAS. Para ello realizamos ensayos de degranulación basados en la detección por citometría de flujo de CD107a, o LAMP-1 (lysosomal-associated membrane protein-1), en la superficie de linfocitos T CD8⁺. CD107a se ha descrito como un marcador funcional, indicativo de la actividad citotóxica de células NK y linfocitos T CD8⁺.

En primer lugar, se determinó el tiempo óptimo de co-cultivo de los linfocitos T CD8⁺ con las células blanco P815. En el ensayo se consideraron células PBMCs incubadas con células P815, y PBMCs incubadas con células P815 previamente expuestas a un anticuerpo específico anti-CD3, lo que permite la unión del anticuerpo a la célula blanco a través de receptores Fc. De esta forma, la célula blanco es reconocida por medio del TCR de los linfocitos T CD8⁺, lo que induce la expresión del marcador CD107a en los gránulos citotóxicos de los linfocitos, y al fusionarse éstos con la membrana plasmática durante la secreción, es posible detectar a CD107a en la superficie celular. Para identificar la expresión de CD107a en la superficie de los linfocitos T CD8⁺, después del co-cultivo, las células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD107a acoplados a fluoróforos. En la Figura 15 se muestra la expresión del marcador CD107a en 40.8% de los linfocitos T CD8⁺ después de participar en un co-cultivo de 2 horas, y una expresión en el 43.4% de las células cuando el co-cultivo se mantuvo por 3 horas, motivo por el cual se realizaron las futuras incubaciones con una duración de 3 horas.

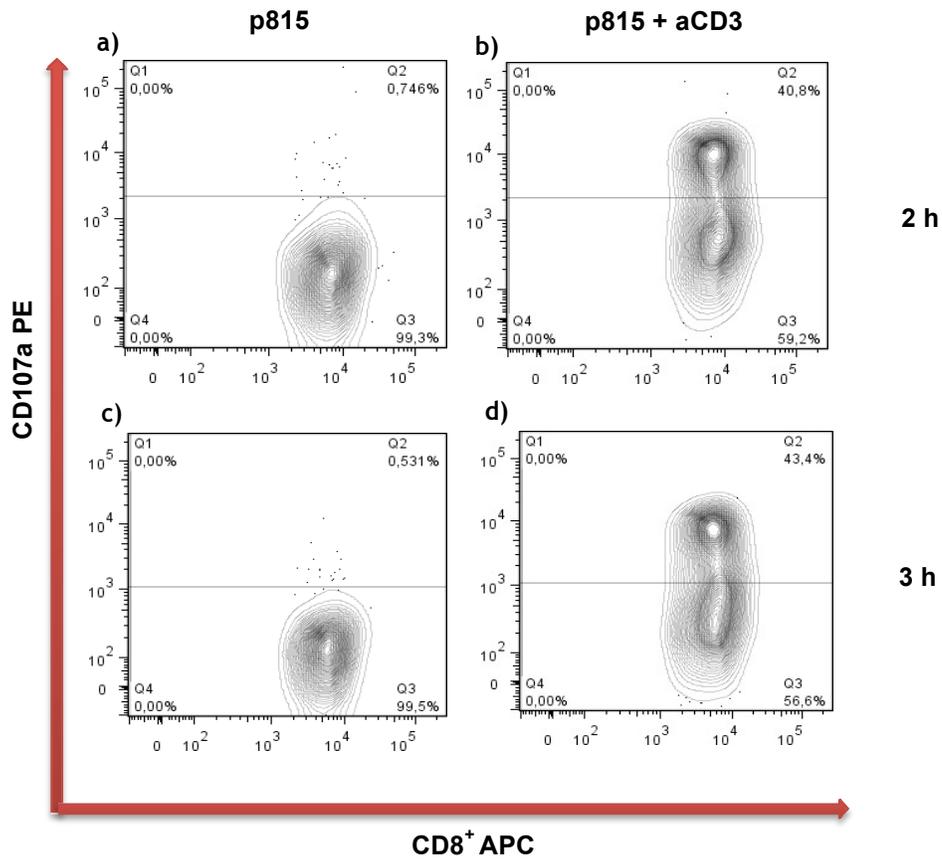


Figura 15. Degranulación de linfocitos T CD8⁺ frente a células blanco P815. Expresión de CD107a en la membrana de linfocitos T CD8⁺ de un donador sano después de haber sido co-incubadas con células P815 solas (a, c) o pre-incubadas con anticuerpo anti-CD3 (b, d) durante 2 (a, b) ó 3 horas (c, d).

Una vez optimizadas las condiciones para el co-cultivo de linfocitos T CD8⁺ con células blanco, se evaluó la actividad citotóxica de células T CD8⁺ de 3 pacientes con WAS, en respuesta a la activación con PHA (1,25 ug/ml) e IL-2 (100U/ml) durante 36 a 48 horas, un estímulo que induce la proliferación y la generación de gránulos citotóxicos en linfocitos T CD8⁺. Nuestros datos sugieren que el porcentaje de expresión del marcador CD107a en PBMCs no activadas de pacientes WAS es menor en células CD8⁺ totales, así como en células dobles positivas CD8⁺/CD57⁺, en comparación con los controles sanos (Figura 16 A, B). En las PBMCs activadas con PHA e IL-2, el porcentaje de expresión del marcador CD107a aumentó en células CD8⁺ de controles sanos y de los pacientes, sin

embargo, los pacientes mostraron una expresión menor del marcador CD107a con respecto a los controles sanos (Figura 17).

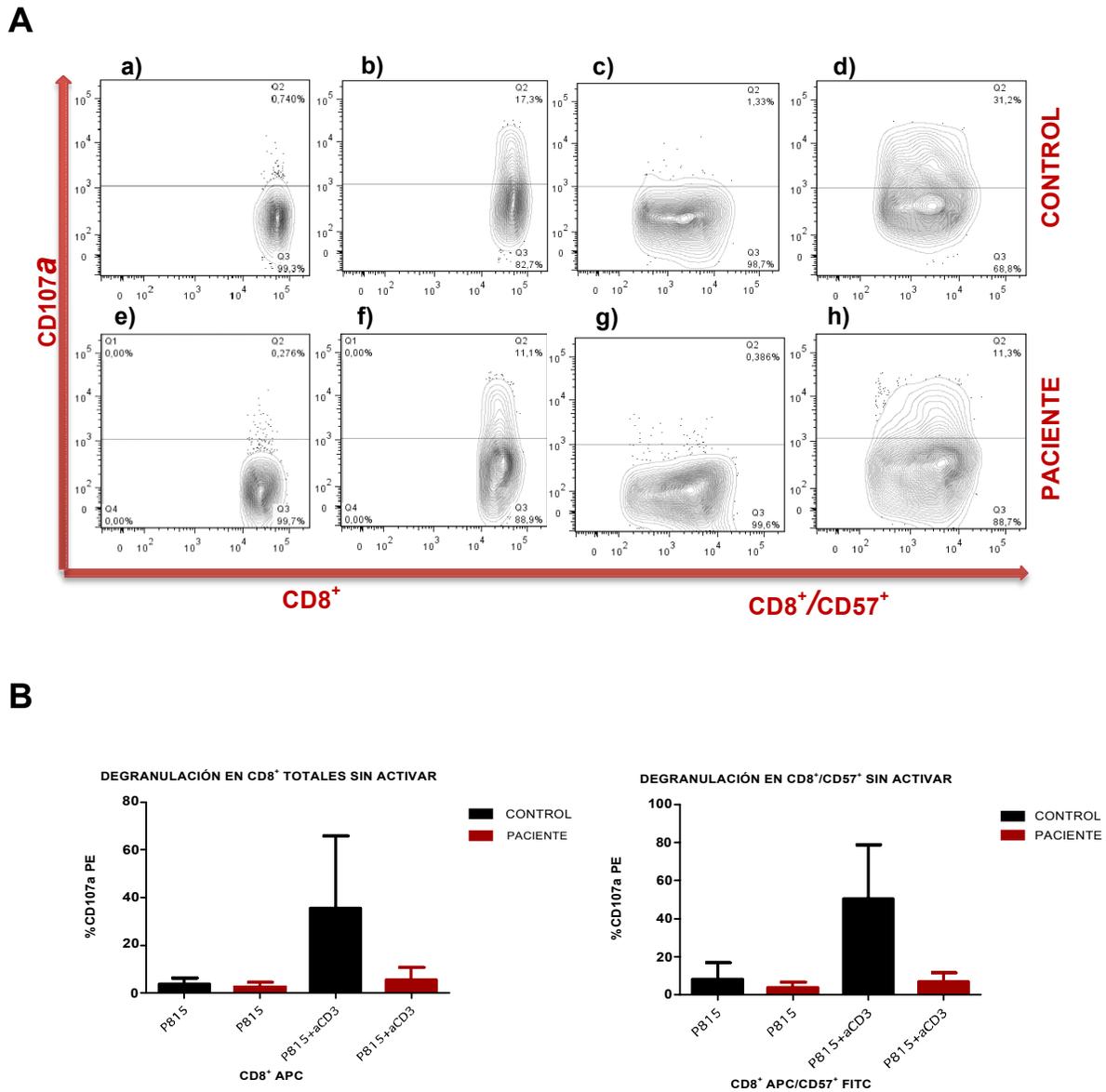


Figura 16. Degranulación disminuida en linfocitos T CD8⁺ no activados de pacientes con WAS. Expresión del marcador CD107a en células CD8⁺ (A: a, b, e, f) y células CD8⁺/CD57⁺ (A: c, d, g, h), co-cultivadas con células p815 (A: a, c, e, g) o con células p815 incubadas con el anticuerpo anti-CD3 (A: b, d, f, h). B, Cuantificación de los resultados obtenidos por citometría de flujo en 3 pacientes con WAS.

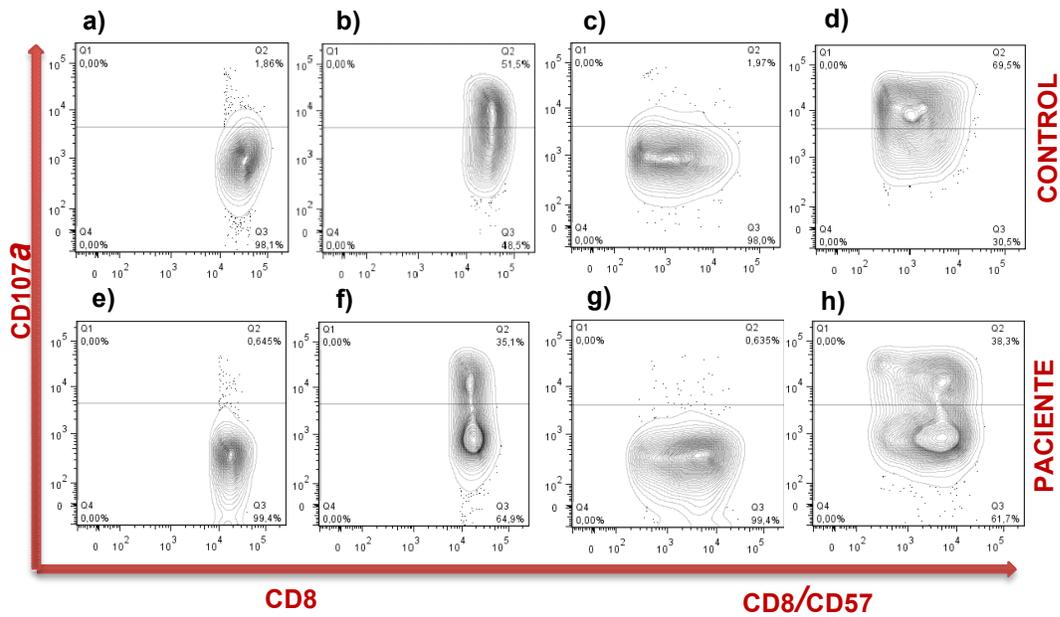


Figura 17. Degranulación disminuida en linfocitos T CD8⁺ activados de pacientes con WAS con PHA e IL-2. Las PBMCs se activaron con PHA (1,25 ug / ml) e IL-2 (100U/ml) en un período de 36 a 48 horas. Expresión del marcador CD107a en células CD8⁺ (a, b, e, f) y células CD8⁺/CD57⁺ (c, d, g, h), co-cultivadas con células P815 no activadas (a, c, e, f), y con células p815 incubadas con anti-CD3 (b, d, g, h).

8. DISCUSIÓN

El síndrome de Wiskott Aldrich (WAS) es causado por mutaciones en el gen *WAS*, y se reconocen tres variedades: WAS clásico, XLT y XLN. En México se carece de información acerca de la caracterización molecular de mutaciones en *WAS* en la población mexicana, así como de la descripción funcional a nivel citotóxico. Además, no se cuenta con estudios epidemiológicos que recopilen datos sobre la prevalencia o incidencia de esta enfermedad en México.

En este estudio analizamos 18 muestras de pacientes, de los cuales 13 presentaron mutaciones que van desde deleciones, inserciones, mutaciones con cambio de sentido (missense) y mutaciones sin sentido (nonsense). En diferentes estudios se ha reportado que la mutación más común en el gen *WAS* es la del tipo missense, seguido de las mutaciones que afectan los sitios de empalme (Derry *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1995; Schwarz *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 2001). Interesantemente, las mutaciones del tipo deleción fueron el principal tipo de mutación encontrada (ocho deleciones) en la población mexicana (Tabla 4, Figura 13). Asimismo, varios autores han descrito que el dominio EVH1 es considerado como un sitio *hotspot* (sitio donde hay mayor probabilidad de mutación), lo que concuerda con los datos de las mutaciones registradas, donde el 46% de las mutaciones que se han caracterizado se ubican en el dominio EVH1 (Jin *et al.*, 2004).

Cabe resaltar que en este estudio sólo se analizaron las secuencias codificantes del gen *WAS*, lo que permitió la identificación de mutaciones en 13 de los 18 pacientes incluidos en el estudio, sugiriendo que los 5 pacientes restantes que manifestaron sintomatología asociada a WAS, podrían presentar alguna mutación en zonas intrónicas que no fueron incluidas en este trabajo. Alternativamente, estos 5 pacientes podrían ser portadores de mutaciones en la proteína WIP (WASP interacting protein), pues se ha demostrado que la expresión de WIP es necesaria para la expresión funcional de WASp en células humanas, regulando su

distribución y función celular, así como su estabilidad al protegerla de la degradación (Matalon *et al.*, 2013; Anton *et al.*, 2002; Sasahara *et al.*, 2002).

Dado que en México no hay estudios acerca de la caracterización molecular de las mutaciones en WAS, es de suma importancia destacar que este estudio resulta novedoso en la población mexicana debido a que se identificaron 10 mutaciones no reportadas en la literatura (Tabla 4): 7 deleciones (c.1228delC, c.888delC, c.1424-1428del5pb, c.1093delG, c.1459delG, c.290delG, c.177delT), una mutación sin sentido (c.191G>A), una inserción (c.276insT) y una mutación con cambio de sentido (c.1294G>A). Sólo tres de las mutaciones identificadas ya estaban previamente reportadas (c.256C>T, c.245C>T y c.1032delT).

De las 7 deleciones identificadas en este estudio, 4 generaron una proteína trunca, que aunque fue detectada por citometría de flujo, su expresión se encontraba disminuida. Además, es muy probable que la mutación c.1032delT identificada en el paciente WAS018, genere también una proteína trunca. Aunque no contamos con el ensayo de citometría de flujo para la detección de WASp en este paciente, observamos que esta mutación caen en los exones, 9, 10, 11 y 12, los cuales abarcan desde el dominio rico en prolina hasta el dominio VCA, por lo tanto, esto sugeriría que las proteínas se están expresando, pero sin el dominio VCA. Aunque son escasos los reportes donde se caracterizan mutaciones que generan proteínas truncas de WASP, nuestros resultados concuerdan con reportes previos en los que se ha descrito que las deleciones presentes en el dominio PPP o VCA son capaces de generar WASp trunca (By Qili Zhu *et al.*, 1997; Jin, Y. *et al.*, 2004).

Interesantemente, los ensayos de degranulación de linfocitos T CD8⁺ y CD8⁺/CD57⁺ no activados, demostraron una disminución en la expresión del marcador CD107a en pacientes con WAS respecto al control (Figura 16). En PBMCs activadas con PHA e IL-2, el porcentaje de células positivas para la expresión del marcador CD107a incrementó. De forma similar a las células no activadas, tanto los linfocitos T CD8⁺ como la subpoblación CD8⁺/CD57⁺ de los pacientes con WAS presentaron una disminución en la expresión del marcador

CD107a en la superficie. Estos datos sugieren que los pacientes con WAS presentan una deficiencia en su capacidad citotóxica tanto en linfocitos T CD8⁺ totales como en la subpoblación doble positiva CD8⁺/CD57⁺.

Resulta interesante que el marcador CD57 ha sido identificado en poblaciones con un alto potencial citotóxico (Yannick *et al.*, 2006; Focosi *et al.*, 2009). Interesantemente, en este estudio reportamos que la expresión de CD57 en pacientes con WAS se encuentra incrementada (Figura 14) hasta en un 50% más, con respecto a los controles sanos. A pesar de que se esperaría una mayor degranulación en la subpoblación CD8⁺/CD57⁺, nuestros resultados sugieren que a pesar de que los linfocitos T CD8⁺ tienen una mayor expresión de CD57, la capacidad de degranulación no se ve aumentada, a diferencia de los controles, donde se observa claramente que la expresión de CD107a incrementa en la subpoblación CD8⁺/CD57⁺.

Se ha descrito que el incremento de la expresión de CD57 está relacionado con el incremento en la producción de gránulos citotóxicos. Por lo tanto, la disminución que observamos en la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ de los pacientes con WAS, podría deberse a un defecto en la polarización de los gránulos citotóxicos hacia el sitio de contacto con la célula blanco. Lo que concuerda con lo reportado por De Meester y colaboradores (2010) donde demostraron que los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con WAS expresan niveles normales de moléculas líticas, con una adecuada exocitosis en el encuentro con las células diana. Por tal motivo, es muy probable que el proceso crucial donde se ve afectada la capacidad citotóxica sea durante la polarización de los gránulos citotóxicos.

9. CONCLUSIÓN

En este estudio evaluamos la presencia de mutaciones en el gen *WAS* de 18 pacientes con manifestaciones clínicas del síndrome de Wiskott Aldrich. Se identificaron 13 mutaciones, de las cuales 10 no han sido reportadas. En los pacientes diagnosticados con *WAS*, se observó principalmente la presencia de deleciones y se identificaron 4 pacientes que expresan la proteína *WASP* trunca.

Los ensayos de degranulación indicaron que los linfocitos T $CD8^+$ de pacientes con *WAS* presentaron una disminución drástica en la expresión del marcador *CD107a* y se identificó que los pacientes con *WAS* tienen incrementada la subpoblación $CD8^+/CD57^+$, que es altamente citotóxica. Sin embargo, en los pacientes con *WAS* los niveles de degranulación resultaron estar importantemente disminuidos, tanto en linfocitos T $CD8^+$ totales, como en la subpoblación $CD8^+/CD57^+$, en comparación con los controles sanos. Estos datos sugieren que los pacientes con *WAS* son incapaces de realizar una correcta polarización de los gránulos citotóxicos, así como una deficiente sinapsis inmune.

10. BIBLIOGRAFÍA

- A. Gismondi, L. Cifaldi, C. Mazza, S. Giliani, S. Parolini, S. Morrone, J. Jacobelli, E. Bandiera, L. Notarangelo y A. Santoni (2004).** Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: ability of IL2 to correct NK cell functional defect. *Blood* 104, 436–443
- A.S. Kim, L.T. Kakalis, N. Abdul-Manan, G.A. Liu and M.K. Rosen (2000).** Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein, *Nature* 404 151–158.
- Anton, I. M., de la Fuente, M. A., Sims, T. N., Freeman, S., Ramesh, N., Hartwig, J. H., Dustin, M. L., and Geha, R. S. (2002).** WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in T and B cell activation. *Immunity* 16, 193–204. *Blood* 104: 436–443.
- Blundell MP, Worth A, Bouma G, Thrasher AJ (2010).** The Wiskott-Aldrich syndrome: The actin cytoskeleton and immune cell function. *Dis Markers*; 29(3-4):157-75. doi: 10.3233/DMA-2010-0735.
- Bonilla FA, et al. (2005).** Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 94(5 Suppl 1):S1-63.
- Bousfiha A, et al., 2015.** The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol* 2015;35:727–38
- Bousfiha et al. (2013).** Primary immunodeficiency diseases worldwide: more common than generally thought. *J Clin Immunol*.
- Casanova y Abel (2007).** Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science* 2007; 317:617-9.
- De Meester J, Calvez R, Valitutti S, Dupré L (2010).** The Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates CTL cytotoxicity and is required for efficient killing of B cell lymphoma targets. *J Leukoc Biol*; 88(5):1031-40. doi: 10.1189/jlb.0410197.
- Derry JM, Ochs HD, Francke U. (1994).** Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*.78: 635-644.

- Devriendt K, Kim AS, Mathijs G, et al., (2001).** Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet.* 27:313-317.
- Guinamard, R. et al. (1998).** Tyrosine phosphorylation of the Wiskott-Aldrich syndrome protein by Lyn and Btk is regulated by CDC42. *FEBS Lett.* **434**: 431–436.
- Higgs, H.N. & T.D. Pollard (2000).** Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* 150: 1311–1320.
- Ho LL, Ayling J, Prosser I, Kronenberg H, Iland H, Joshua D. (2001)** Missense C168T in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene is a common mutation in X-linked thrombocytopenia. *Br J Hematol.*112: 76-80.
- Imai, K., Morio, T., Zhu, Y., Jin, Y., Itoh, S., Kajiwara, M., Yata, J., Mizutani, S., Ochs, H. D., and Nonoyama, S. (2004).** Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood* 103, 456–464
- J. M. Boyle & R. H. Buckley (2007).** Population Prevalence of Diagnosed Primary Immunodeficiency Diseases in the United States. *J Clin Immunol.* 27:497–502 DOI 10.1007/s10875-007-9103-1
- Jin, Y. et al. (2004).** Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood.* 104: 4010–4019.
- Kohsuke Imai, Shigeaki Nonoyama and Hans D. Ochs (2003).** WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 3(6):427-36.
- Luthi, J.N., M.J. Gandhi & J.G. Drachman (2003).** X-linked thrombocytopenia caused by a mutation in the Wiskott Aldrich syndrome (WAS) gene that disrupts interaction with the WAS protein (WASP)-interacting protein (WIP). *Exp. Hematol.* 31: 150–158.
- M. Buck, W. Xu and M.K. Rosen, (2001).** Global disruption of the WASP autoinhibited structure on Cdc42 binding. Ligand displacement as a novel

method for monitoring amide hydrogen exchange, *Biochemistry* 40 14115–14122.

Maria Pia Cicalese y Alessandro Aiuti (2015). Clinical Applications of Gene Therapy for Primary Immunodeficiencies. *HUMAN GENE THERAPY*. 26:210–219 DOI: 10.1089/hum.2015.047

Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS (2013). Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Ann NY Acad Sci*; 285:26-43. doi: 10.1111/nyas.12049

Matalon, O., Reicher, B., and Barda-Saad, M. (2013). WiskottAldrich syndrome protein - dynamic regulation of actin homeostasis: from activation through function and signal termination in T lymphocytes. *Immunol Rev*. 256,10–29.

Notarangelo LD (2010). Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2):S182-194.

Notarangelo LD, Miao CH, Ochs HD (2008). Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol*; 15(1):30-6.

O. Parolini, S. Berardelli, E. Riedl, C. Bello-Fernandez, H. Strobl, O. Majdic and W. Knapp, (1997). Expression of WiskottAldrich syndrome protein (WASP) gene during hematopoietic differentiation, *Blood* 90 70-75.

Ochs, H. D. (1998). The Wiskott-Aldrich syndrome. *Springer Semin. Immunopathol*. 19:435

Ochs, H. D. (2002). The WiskottAldrich syndrome. *Isr. Med. Assoc. J.* 4, 379–384.

Ochs, H. D., and Thrasher, A. J. (2006). The Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 725–738; quiz 739.

Ochs, H.D. et al. 1980. The Wiskott-Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood* 55: 243–252.

Orange JS, Ramesh N, Remold-O'Donnell E, Sasahara Y, Koopman L, Byrne M, Bonilla FA, Rosen FS, Geha RS, Strominger JL (2002). Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(17):11351-6.

- Rivero-Lezcano OM, Marcilla A, Sameshima JH, Robbins KC (1995).** Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol*; 15:5725-5731.
- Roncarolo and L. Dupre, (2010).** Revertant T lymphocytes in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome: analysis of function and distribution in lymphoid organs, *J Allergy Clin Immunol* 125 (2010), 439–448 e438.
- Sasahara, Y., Rachid, R., Byrne, M. J., de la Fuente, M. A., Abraham, R. T., Ramesh, N., and Geha, R. S. (2002).** Mechanism of recruitment of WASp to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol. Cell* 10, 1269–1281.
- Sayandip Mukherjee y Adrian J. Thrasher (2013).** Gene therapy for PIDs: Progress, pitfalls and prospects. *Gene*. 10;525(2):174-81. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.098.
- Schwarz K. et al. (1996).** WASPbase: a database of WAS- and XLT-causing mutations. *Immunol Today*. (11):496-502.
- Snapper SB, Rosen FS (1999).** The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu Rev Immunol*;17:905-929.
- Strom TS, Turner SJ, Andreansky S, Liu H, Doherty PC, Srivastava DK, et al. (2003).** Defects in T-cell-mediated immunity to influenza virus in murine Wiskott-Aldrich syndrome are corrected by oncoretroviral vector-mediated gene transfer into repopulating hematopoietic cells. *Blood* 102:3108–16. doi:10.1182/blood-2002-11-3489
- Symons, M. et al. (1996).** Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell*. 84: 723–734.
- Trifari S, Sitia G, Aiuti A, Scaramuzza S, Marangoni F, Guidotti LG, et al. (2006).** Defective Th1 cytokine gene transcription in CD4+ and CD8+ T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. *J Immunol* 177:7451–61. doi:10.4049/jimmunol.177.10.7451

Villa A, Notarangelo L, Macchi P, Mantuano E, Cavagni G, Brugnoli D, Strina D, Patrosso MC, Ramenghi U, Sacco MG, et al. (1995). X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in the WASP gene. *Nat Genet*; 9(4):414-7.

W. Du, S. Kumaki, T. Uchiyama, A. Yachie, C. Yeng Looi, S. Kawai, M. Minegishi, N. Ramesh, R.S. Geha, Y. Sasahara and S. Tsuchiya, (2006). A second-site mutation in the initiation codon of WAS (WASP) results in expansion of subsets of lymphocytes in an Wiskott-Aldrich syndrome patient, *Hum Mutat* 27 370–375.

Zhu Q, Zhang M, Blaese RM, Derry JM, Junker A, Francke U, Chen SH, Ochs HD (1995). The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood*; 15;86(10):3797-804

Zhu Q, Zhang M, Blaese RM, et al. 1995. The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood*.;86: 3797-3804.



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

Cuernavaca, Mor., 23 de mayo de 2019.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez
Director
Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Estudio genético y funcional en una cohorte de pacientes con diagnóstico clínico de WAS**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Jonathan Gilberto Cuéllar Vega. 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



Dra. Laura Berrón Ruíz



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

Cuernavaca, Mor., 23 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 **"Estudio genético y funcional en una cohorte de pacientes con diagnóstico clínico de WAS"**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Jonathan Gilberto Cuéllar Vega. 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



Dra. Sara Elva Espinosa Padilla



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

Cuernavaca, Mor., 23 de mayo de 2019.

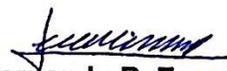
Dr. David Martínez Duncker Ramírez
Director
Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **"Estudio genético y funcional en una cohorte de pacientes con diagnóstico clínico de WAS"**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Jonathan Gilberto Cuéllar Vega. 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.

A t e n t a m e n t e



Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama



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

Cuernavaca, Mor., 23 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 **"Estudio genético y funcional en una cohorte de pacientes con diagnóstico clínico de WAS"**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Jonathan Gilberto Cuéllar Vega. 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. Jesús Santa Olalla Tapia



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

Cuernavaca, Mor., 23 de mayo de 2019.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez
Director
Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **"Estudio genético y funcional en una cohorte de pacientes con diagnóstico clínico de WAS"**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Jonathan Gilberto Cuéllar Vega. 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.

A t e n t a m e n t e



Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz