



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN**



**Estudio clínico, inmunológico y genético de  
pacientes con defecto en el estallido respiratorio:  
función de *NCF4* y *NRAMP1***

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS EN  
INMUNOLOGÍA

PRESENTA:

**M. en C. ALEJANDRO ULISES  
NIETO PATLÁN**

DIRECTORES: DRA. JEANET SERAFÍN LÓPEZ

DRA. JACINTA BUSTAMENTE

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Molecular II del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas bajo la dirección de la Dra. Jeanet Serafín López y en el Laboratorio de Genética Humana de las Enfermedades Infecciosas del Instituto Imagine, París bajo la dirección de la Dra. Jacinta Bustamante.

*“Nothing in immunology makes sense except in  
the light of evolution”*

Jean-Laurent CASANOVA

Esta tesis está dedicada a mi hija Ileana  
*... mi ilusión eres tú, una estrella que alumbr  
mi corazón...*

## **Acknowledgments**

I want to thank all the members of the laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases in Paris and New York, thanks for all your questions and comments on my projects during the meetings. I have special thanks to Prof. Jean-Laurent Casanova "JL" for gave me the opportunity to work in his lab, for inspiring me and for always treated me with respect, patience and professionalism. Thank you to all investigators from the lab, specially to Manu for all those talks in the stairs, to Bertrand, Anne, Laurent, Capucine.

I also want to thank to all my labmates and friends Tom, Melanie, Maya, Julien, Romain, Kunihiko, Ruben, Noe and special thanks to Vivien for all his advices, he taught me more than he realized, he taught me how to resist and how to pursuit your scientific dreams no matter what. Also special thanks to Maya for being our mom in the lab, for being protective and for always have a smile whenever we need you, ah and thank you for the delicious Lebanese meals you made.

Finally, I want to thank to my good friends Carmen, Valentine, Joelle, Cecile, Cecilia and Anna-lena. Thank you for all the incredible topics during lunch, for the good moments and your support during this adventure, thank you for all your love... I will always remember you.

## **Agradecimientos**

Ahora sí, empezaré con los agradecimientos en español. Quiero agradecer primero a mis directoras la Dra. Jeanet Serafín López por todo el apoyo durante mi doctorado, por guiarme y aconsejarme, por ser paciente, pero sobre todo por no olvidar que somos personas antes que solo alumnos. A mi directora externa la Dra. Jacinta Bustamante por la oportunidad de trabajar en su grupo, por incluirme en proyectos y por confiar en mí. Agradezco a todos los miembros de mi comité tutorial y predoctoral al Dr. Rommel Chacón, la Dra. Gabriela López, la Dra. Blanca García, la Dra. Isabel Wong y a los doctores Sergio e Iris Estrada por su apoyo e inspiración.

Agradezco a mi familia por todo el apoyo, por sus oraciones y buenos deseos en este largo camino. Agradezco a mi hija Ileana por iluminar mi camino y darme fuerza, por motivarme a ser un buen padre. Agradezco también a mis padres y hermanos por nunca dejarme solo a pesar de la distancia, siempre sentí su amor, su apoyo y sus ánimos. Agradezco especialmente a mi mamá Asun por ir a París durante 6 meses a ayudarnos, sin tu ayuda este trabajo simplemente no hubiera sido el mismo.

Agradezco a Areli por los buenos momentos, nunca nos imaginamos que nuestros sueños demandarían tanto de nosotros. Agradezco también a Noemi por ir a cuidar a Ileana por un tiempo.

Quiero también agradecer y dedicar este trabajo a una persona muy importante... sin tu ayuda este trabajo simplemente no existiría. Te agradezco todos tus consejos y tu apoyo, agradezco que te hayas preocupado y me

hayas animado a seguir no solo como un paciente sino como un amigo... este trabajo te lo dedico con cariño Roberto Pérez Soto que en paz descanses.

Agradezco de forma muy especial a mis grandes amigos que hice en París, Enrique y Mariana por apoyarnos y siempre animarnos a descubrir la hermosa ciudad. Agradezco a mis grandes amigos María Esnaola y el parcerero Carlos, a Cecilia por enseñarme a hablar pelotudeses y por último, a mi gran amiga y hermana Carmen... Caaarmen gracias por todas esas platicas y por todo el apoyo, definitivamente este doctorado no lo pude haber realizado sin tu apoyo y compañía, gracias por recibirme tan cálidamente en mi primer día en el lab, por tu eudemonismo que raya en lo patológico, por estar a mi lado en los buenos y malos momentos en el lab. Finalmente, agradezco a todos mis amigos y familiares en México y en el mundo, este largo camino ha llegado a su fin, me ha costado más de lo que creí, pero aquí esta el producto de 4 años.

GRACIAS!

Alejandro Ulises Nieto Patlán

# Inherited p40<sup>phox</sup> deficiency differs from classic chronic granulomatous disease

Annemarie van de Geer,<sup>1</sup> Alejandro Nieto-Patlán,<sup>2,3,4</sup> Douglas B. Kuhns,<sup>5</sup> Anton T.J. Tool,<sup>1</sup> Andrés A. Arias,<sup>6,7</sup> Matthieu Bouaziz,<sup>2,3</sup> Martin de Boer,<sup>1</sup> José Luis Franco,<sup>6</sup> Roel P. Gazendam,<sup>1</sup> John L. van Hamme,<sup>1</sup> Michel van Houdt,<sup>1</sup> Karin van Leeuwen,<sup>1</sup> Paul J.H. Verkuijlen,<sup>1</sup> Timo K. van den Berg,<sup>1,8</sup> Juan F. Alzate,<sup>9</sup> Carlos A. Arango-Franco,<sup>6,7</sup> Vritika Batura,<sup>10</sup> Andrea R. Bernasconi,<sup>11</sup> Barbara Boardman,<sup>12</sup> Claire Booth,<sup>13</sup> Siobhan O. Burns,<sup>14,15</sup> Felipe Cabarcas,<sup>9,16</sup> Nadine Cerf Bensussan,<sup>17,18,19</sup> Fabienne Charbit-Henrion,<sup>17,18,19,20</sup> Anniek Corveleyn,<sup>21</sup> Caroline Deswarte,<sup>2,3</sup> María Esnaola Azcoiti,<sup>2,22</sup> Dirk Foell,<sup>23</sup> John I. Gallin,<sup>24</sup> Carlos Garcés,<sup>6</sup> Margarida Guedes,<sup>25</sup> Claas H. Hinze,<sup>23</sup> Steven M. Holland,<sup>26</sup> Stephen M. Hughes,<sup>12</sup> Patricio Ibañez,<sup>27</sup> Harry L. Malech,<sup>24</sup> Isabelle Meyts,<sup>28,29</sup> Marcela Moncada-Velez,<sup>6</sup> Kunihiro Moriya,<sup>2,3</sup> Esmeralda Neves,<sup>30</sup> Matias Oleastro,<sup>11</sup> Laura Perez,<sup>11</sup> Vimel Rattina,<sup>2,3</sup> Carmen Oleaga-Quintas,<sup>2,3</sup> Neil Warner,<sup>31</sup> Aleixo M. Muise,<sup>10,31,32</sup> Jeanet Serafín López,<sup>4</sup> Eunice Trindade,<sup>33</sup> Julia Vasconcelos,<sup>30</sup> Séverine Vermeire,<sup>34,35</sup> Helmut Wittkowski,<sup>23</sup> Austen Worth,<sup>13</sup> Laurent Abel,<sup>2,3,36</sup> Mary C. Dinauer,<sup>37</sup> Peter D. Arkwright,<sup>12</sup> Dirk Roos,<sup>1</sup> Jean-Laurent Casanova,<sup>2,3,38,39</sup> Taco W. Kuijpers,<sup>1,40,41</sup> and Jacinta Bustamante<sup>2,3,42</sup>

<sup>1</sup>Department of Blood Cell Research, Sanquin Research, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands. <sup>2</sup>Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, INSERM U1163, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France. <sup>3</sup>Paris Descartes University, Imagine Institute, Paris, France. <sup>4</sup>Department of Immunology, National School of Biological Science, National Polytechnic Institute, ENCB – IPN, Mexico. <sup>5</sup>Neutrophil Monitoring Laboratory, Clinical Services Program, Leidos Biomedical Research Inc., Frederick National Laboratory for Cancer Research, Frederick, Maryland, USA. <sup>6</sup>Primary Immunodeficiencies Group, Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, and <sup>7</sup>School of Microbiology, University of Antioquia, Medellín, Colombia. <sup>8</sup>Department of Molecular Cell Biology and Immunology, VU Medical Center, VU University, Amsterdam, Netherlands. <sup>9</sup>National Center for Genomic Sequencing – CNSG-SIU, School of Medicine, University of Antioquia, Medellín, Colombia. <sup>10</sup>Department of Pediatrics and Biochemistry, University of Toronto, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada. <sup>11</sup>Service of Immunology and Rheumatology, Garrahan National Pediatric Hospital, Buenos Aires, Argentina. <sup>12</sup>Department of Pediatric Allergy and Immunology, Royal Manchester Children's Hospital, University of Manchester, Manchester, United Kingdom. <sup>13</sup>Department of Immunology, Great Ormond Street Hospital, NHS Foundation Trust, London, United Kingdom. <sup>14</sup>Institute of Immunity and Transplantation, University College London, London, United Kingdom. <sup>15</sup>Department of Clinical Immunology, Royal Free London, NHS Foundation Trust, London, United Kingdom. <sup>16</sup>SISTEMIC Group, Electronic Engineering Department, University of Antioquia, Medellín, Colombia. <sup>17</sup>Laboratory of Intestinal Immunity, INSERM U1163, Imagine Institute, Paris, France. <sup>18</sup>GENIUS group (GENetically ImmUne-mediated enteropathies) of the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN). <sup>19</sup>Paris Descartes University, Paris, France. <sup>20</sup>Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Unit, AP-HP, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France. <sup>21</sup>Department of Human Genetics, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium. <sup>22</sup>Department of Immunology, Ricardo Gutiérrez Children's Hospital, Buenos Aires, Argentina. <sup>23</sup>Department of Pediatric Rheumatology and Immunology, Munster University Hospital, Munster, Germany. <sup>24</sup>Laboratory of Clinical Immunology and Microbiology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH, Bethesda, Maryland, USA. <sup>25</sup>Department of Pediatrics, Santo Antonio Hospital, Porto, Portugal. <sup>26</sup>Laboratory of Clinical Infectious Diseases, NIAID, NIH, Bethesda, Maryland, USA. <sup>27</sup>Inflammatory Bowel Disease Program, Gastroenterology Department, Clinic Las Condes Medical Center, University of Chile, Santiago de Chile, Chile. <sup>28</sup>Department of Pediatric Hematology and Oncology and <sup>29</sup>Department of Microbiology and Immunology, University Hospitals Leuven, KU Leuven, Leuven, Belgium. <sup>30</sup>Department of Immunology, Santo Antonio Hospital, Porto, Portugal. <sup>31</sup>SickKids Inflammatory Bowel Disease Center and Cell Biology Program, Research Institute, and <sup>32</sup>Division of Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition, Department of Pediatrics and Biochemistry, University of Toronto, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada. <sup>33</sup>Pediatric Gastroenterology Unit, Sao Joao Hospital, Porto, Portugal. <sup>34</sup>Division of Gastroenterology and Hepatology, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium. <sup>35</sup>Department of Experimental Medicine, KU Leuven, Leuven, Belgium. <sup>36</sup>St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, The Rockefeller University, New York, New York, USA. <sup>37</sup>Department of Pediatrics, Washington University School of Medicine, Saint Louis, Missouri, USA. <sup>38</sup>Howard Hughes Medical Institute, New York, New York, USA. <sup>39</sup>Pediatric Hematology and Immunology Unit, AP-HP, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France. <sup>40</sup>Department of Pediatric Hematology, Immunology and Infectious Diseases, Emma Children's Hospital, Amsterdam, Netherlands. <sup>41</sup>Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands. <sup>42</sup>Center for the Study of Primary Immunodeficiencies, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France.

**Biallelic loss-of-function (LOF) mutations of the *NCF4* gene, encoding the p40<sup>phox</sup> subunit of the phagocyte NADPH oxidase, have been described in only 1 patient. We report on 24 p40<sup>phox</sup>-deficient patients from 12 additional families in 8 countries. These patients display 8 different in-frame or out-of-frame mutations of *NCF4* that are homozygous in 11 of the families and compound heterozygous in another. When overexpressed in NB4 neutrophil-like cells and EBV-transformed B cells in vitro, the mutant alleles were found to be LOF, with the exception of the p.R58C and c.120\_134del alleles, which were hypomorphic. Particle-induced NADPH oxidase activity was severely impaired in the patients' neutrophils, whereas PMA-induced dihydrorhodamine-1,2,3 (DHR) oxidation, which is widely used as a diagnostic test for chronic granulomatous disease (CGD), was normal or mildly impaired in the patients. Moreover, the NADPH oxidase activity of EBV-transformed B cells was also severely impaired, whereas that of mononuclear phagocytes was normal. Finally, the killing of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* hyphae by neutrophils was conserved in these patients, unlike in patients with CGD. The patients suffer from hyperinflammation and peripheral infections, but they do not have any of the invasive bacterial or fungal infections seen in CGD. Inherited p40<sup>phox</sup> deficiency underlies a distinctive condition, resembling a mild, atypical form of CGD.**

ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
ÍNDICE DE TABLAS .....	V
ABREVIATURAS .....	VI
RESUMEN .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Antecedentes históricos.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Inmunodeficiencias primarias.....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Inmunodeficiencias en inmunidad celular y humoral. ....	4
1.2.2. Inmunodeficiencias en la producción de anticuerpos. ....	5
1.2.3. Inmunodeficiencias en la regulación de la respuesta inmune. ....	6
1.2.4. Inmunodeficiencias en la inmunidad innata dependiente del fenotipo clínico.....	7
1.2.5. Inmunodeficiencias causantes de desórdenes autoinmunes. ....	9
1.2.6. Inmunodeficiencias del sistema de complemento. ....	9
1.2.7. Inmunodeficiencias en las células fagocíticas. ....	10
<b>1.3. Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC).....</b>	<b>10</b>
1.3.1 Complejo NADPH oxidasa.....	11
1.3.2. EGC ligada al cromosoma X.....	14
1.3.3. Deficiencia de p22 <sup>phox</sup> .....	15
1.3.3. Deficiencia de p47 <sup>phox</sup> .....	15
1.3.3. Deficiencia de p67 <sup>phox</sup> .....	15
1.3.2. Deficiencia de p40 <sup>phox</sup> .....	16
1.3.2. <i>SLC11A1</i> codifica a <i>NRAMP1</i> .....	16
<b>1.4. Secuenciación de nueva generación (NGS).....</b>	<b>18</b>
1.4.2. Análisis de NGS en Inmunodeficiencias Primarias. ....	20
1.4.3. Procesamiento de archivos brutos de NGS. ....	20
1.4.2. Filtro y selección de variantes.....	20
1.4.2. Variantes causantes de una enfermedad.....	21
1.4.2. Confirmación de hipótesis genética. ....	23
1.2.8. Inmunodeficiencias como modelo de estudio. ....	24
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>26</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>27</b>

<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	28
4.1. Objetivos particulares .....	28
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
5.1. Material biológico.....	29
5.2. Reclutamiento de pacientes y aspectos éticos.....	29
5.3. Procesamiento de muestras sanguíneas.....	30
5.4. Generación de líneas celulares EBV-B.....	30
5.5. NGS y análisis genético.....	30
5.6. Secuenciación por Sanger .....	31
5.7. Ensayo de Dihidrorodamina (DHR) .....	32
5.8. Expresión de los transcritos por qRT-PCR.....	32
5.9. Mutagénesis.....	33
5.10. Sistema de sobreexpresión.....	33
5.11. Western-Blot .....	34
5.12. Tinción intracelular de subunidades de la NADPH oxidasa.....	34
5.14. Ensayo de detección de $O_2^-$ .....	35
5.15. Diferenciación de macrófagos y células dendríticas derivadas de monocitos.....	35
5.16. Retro-transducción viral.....	36
<b>6. RESULTADOS</b> .....	38
6.1. Pacientes deficientes en NRAMP1 y p40 <sup>phox</sup> identificados por el análisis de NGS	38
6.2. Defecto en el estallido respiratorio en las células de los pacientes.....	42
6.3. Mutación p.V484M en <i>SLC11A1</i> no tiene impacto a nivel de RNA mientras que mutación en el sitio de empalme en <i>NCF4</i> es deletérea.....	44
6.4. Mutación p.V484M en NRAMP1 afecta la expresión de la proteína mientras que la mutación en c.32+2T>C causa la pérdida completa de la expresión de p40 <sup>phox</sup> .....	44
6.5. Mutación p.V484M en NRAMP1 no afecta la expresión de las subunidades del complejo NADPH oxidasa mientras que la ausencia de p40 <sup>phox</sup> afecta la expresión de p67 <sup>phox</sup> .....	46
6.6. Mutación deletérea de p40 <sup>phox</sup> afecta el estallido respiratorio en la línea celular EBV-B.....	47
6.7. Rescate genético con el alelo WT en EBV-B de P2 revierte el defecto en el estallido respiratorio.....	48

6.8. Compilación de la cohorte más larga de pacientes con deficiencia en p40 <sup>phox</sup> .....	49
6.9. Los alelos mutados en <i>NCF4</i> de los pacientes son pérdida de función excepto los alelos c.120_134del y p.R58C que son hipomórficos .....	52
6.10. Los alelos mutados de <i>NCF4</i> causan pérdida de la expresión de p40 <sup>phox</sup> excepto para los alelos p.R105Q y p.R58C.....	53
6.11. Actividad del complejo NADPH oxidasa en neutrófilos de los pacientes con deficiencia en p40 <sup>phox</sup> se encuentra de normal a ligeramente afectada ante la estimulación con PMA.....	55
6.12. Actividad del complejo NADPH oxidasa en células mononucleares de pacientes con deficiencia en p40 <sup>phox</sup> .....	56
6.13. La pérdida de la función de p40 <sup>phox</sup> causa el defecto en el estallido respiratorio en la línea celular EBV-B p40 <sup>phox</sup> <sup>-/-</sup> .....	57
6.14. El pronóstico de los pacientes deficientes de p40 <sup>phox</sup> .....	59
7. DISCUSIÓN .....	62
7.1. NGS en el estudio de Inmunodeficiencias. ....	62
7.2. Selección de variantes candidatas. ....	62
7.3. Deficiencia de NRAMP1. ....	64
7.4. Deficiencia de p40 <sup>phox</sup> .....	68
8. CONCLUSIONES.....	75
9. BIBLIOGRAFÍA.....	76
10. APÉNDICE 1. Compilación de los pacientes deficientes de p40 <sup>phox</sup> .....	89
11. ARTÍCULOS.....	92
11.1 Artículos de primer autor.....	92
11.2 Artículos de coautor.....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción enzimática de producción de ROS por el complejo NADPH oxidasa.....	12
Figura 2. Interacción molecular entre las subunidades del complejo NADPH oxidasa.....	13
Figura 3. Esquema de la activación del complejo NADPH oxidasa en células fagocíticas.....	14
Figura 4. Diagrama de flujo de NGS.....	18
Figura 5. Patrón de expresión tejido específico en distintas bases de datos, <a href="http://www.genecards.com">www.genecards.com</a> .....	22
Figura 6. Genética de poblaciones de las variantes en P1 .....	39
Figura 7. Segregación familiar y secuenciación por Sanger de P1 y P2 ....	40
Figura 8. Predicciones <i>In silico</i> de la mutación en P2.....	41
Figura 9. Ensayo de DHR en células de P1 .....	42
Figura 10. Ensayo de DHR en PMN de P2 .....	42
Figura 11. Niveles de transcripción de <i>SLC11A1</i> en P1 y <i>NCF4</i> en P2 .....	43
Figura 12. Western-blot de NRAMP1 en un sistema de sobreexpresión en células HEK-293.....	44
Figura 13. Western-blot de p40 <sup>phox</sup> en neutrófilos .....	45
Figura 14. Expresión intracelular de las subunidades NADPH oxidasa en P1 y P2.....	46
Figura 15. Estallido respiratorio en líneas celular EBV-B .....	47
Figura 16. Rescate en el estallido respiratorio en células EBV-B de P2 ....	48
Figura 17. Segregación familiar de pacientes con mutaciones bi-alélicas en <i>NCF4</i> .....	49
Figura 18. Representación esquemática de <i>NCF4</i> .....	50
Figura 19. Sistema de retro-transducción en células EBV-B <i>NCF4</i> <sup>-/-</sup> .....	51
Figura 20. Expresión de p40 <sup>phox</sup> endógeno en células primarias de pacientes con deficiencia en p40 <sup>phox</sup> .....	52

<b>Figura 21. Estallido respiratorio en neutrófilos de pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup>.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 22. Estallido respiratorio en células mononucleares de pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup>.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 23. Rescate genético en EBV-Bs de pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup>.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 24. Curva Kaplan-Meier de supervivencia de pacientes con deficiencia p40<sup>phox</sup> y pacientes con EGC clásica.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 25. Esquema de la posible función de NRAMP1 en el estallido respiratorio.....</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Variaciones homocigotas en P1 y P2 con frecuencia alélica menor al 1% de la población.....</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 2. Principales genes con distancia biológica cercana a genes involucrados en el estallido respiratorio de P1 y P2.....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 3. Compilación de la predicción <i>in silico</i> de tres bases de datos y el GDI de cada gen.....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 4. Fenotipo clínico de pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup> y cohortes publicadas de pacientes con EGC.....</b>	<b>58</b>

## ABREVIATURAS

<b>AD</b>	Autosómico Dominante
<b>AR</b>	Autosómico Recesivo
<b>BAM</b>	Del inglés: Binary Alignment map
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>BTK</b>	Del inglés: Bruton´s Tyrosine Kinase
<b>CADD</b>	Del inglés: Combined annotation-dependent depletion
<b>CD</b>	Del inglés: Cluster of differentiation
<b>CDDMs</b>	Células dendríticas derivadas a partir de monocitos
<b>CMC</b>	Candidiasis mucocutánea crónica
<b>DHR</b>	Ensayo de oxidación de Dihidrorodamina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNTP´s</b>	Del inglés: Deoxynucleotide Triphosphates
<b>EBV-B</b>	Del inglés: Epstein-Barr Virus- Immortalized B cell lines
<b>EGC</b>	Enfermedad Granulomatosa Crónica
<b>EV</b>	Empty vector
<b>ExAC</b>	Exome Aggregation Consortium
<b>GDI</b>	Del inglés: Gene Damage Index
<b>GOF</b>	Del inglés: Gain of Function
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogeno
<b>HEK</b>	Del inglés: Human Embrionic Kidney
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IP</b>	Inmunodeficiencia Primaria
<b>LED</b>	Lupus Eritematoso Discoide
<b>LES</b>	Lupus Eritematoso Sistémico
<b>LOF</b>	Del inglés: Loss of function
<b>MDMs</b>	Macrófagos derivados a partir de monocitos

<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>MSC</b>	Del inglés: Mutation Significance Cutoff
<b>MSMD</b>	Susceptibilidad Mendeliana a Infecciones por Micobacterias
<b>NADPH</b>	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
<b>NGS</b>	Del inglés: Next Generation Sequencing
<b>NT</b>	No transducidas / No transfectadas
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PID</b>	Del inglés: Primary immunodeficiency
<b>PMA</b>	Forbol-12-Miristato-13-Acetato
<b><i>PRKCD</i></b>	Protein cinasa C Delta
<b>QC</b>	Del inglés: Quality Control
<b>SIFT</b>	Del inglés: Sortig Intolerant from Tolerant
<b>TLR</b>	Del inglés: Toll like receptor
<b>VCF</b>	Del inglés: Variant call format
<b>WES</b>	Del inglés: Whole Exome Sequencing
<b>WGS</b>	Del inglés: Whole Genome Sequencing
<b>WT</b>	Del inglés: Wild type
<b>XL</b>	Ligado al cromosoma X

## RESUMEN

### Introducción.

Las inmunodeficiencias primarias (PID) son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas que afectan el desarrollo o función del sistema inmunológico. El diagnóstico de PID puede realizarse evaluando de manera funcional las células del paciente y actualmente se están utilizando técnicas moleculares como la secuenciación de nueva generación (NGS). La NGS consiste en la secuenciación masiva del exoma, genoma o transcriptoma de pacientes. A partir de la utilización de NGS en el 2010, se han descrito más de 100 nuevos genes asociados a un defecto inmunológico.

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una inmunodeficiencia primaria que afecta el complejo NADPH oxidasa, causando defectos en el estallido respiratorio. Los pacientes con EGC sufren de infecciones invasivas y severas, por lo general son diagnosticados a edades tempranas y a la fecha los tratamientos consisten en profilaxis con antibióticos y antifúngicos, las curas para esta enfermedad son el trasplante de medula ósea y en algunos casos la terapia génica.

**Metodología.** Se analizó por NGS el exoma completo de pacientes con infecciones recurrentes y que no habían sido diagnosticados previamente con alguna inmunodeficiencia primaria, del análisis realizado se encontraron mutaciones en los genes *NCF4* y *SLC11A1* las cuales fueron caracterizadas en modelos de sobreexpresión utilizando células HEK-293T y células EBV-B. Asimismo, se evaluó la actividad del complejo NADPH oxidasa en neutrófilos de los pacientes utilizando estímulos PMA en ensayos de DHR. Finalmente se realizó el rescate genético utilizando un modelo de retro-transducción viral en células EBV-B de pacientes con deficiencia en  $p40^{phox}$ .

**Resultados.** Se encontraron 24 pacientes con deficiencia en  $p40^{phox}$ , los pacientes presentaron siete mutaciones no descritas. Se caracterizaron funcionalmente los alelos demostrando que todos son pérdida de función a excepción de los alelos c.120\_134del y p. R58C que son hipomórficos. Al evaluar las células de pacientes se encontró que todas las células evaluadas presentan defecto en la expresión de  $p40^{phox}$  a excepción de los pacientes con mutaciones en p. R58C y p. R105Q. Se encontró que el estallido respiratorio inducido por PMA es residual en polimorfonucleares de los pacientes, en donde el efecto era siempre más elevado comparada a las células de pacientes con EGC clásica. Sin embargo, al utilizar líneas celulares EBV-B de los pacientes, todos mostraron defectos en el estallido respiratorio con PMA. Posteriormente, se realizó el rescate genético de EBV-B de pacientes con deficiencia en  $p40^{phox}$  insertando el gen silvestre de  $p40^{phox}$  mediante retro-transducción viral. Se encontró que sólo las células rescatadas con  $p40^{phox}$  silvestre recuperan la actividad del complejo NADPH oxidasa en este sistema, comprobando así que la ausencia de  $p40^{phox}$  es la responsable del defecto el estallido respiratorio. Adicionalmente, utilizando la NGS se encontró el primer paciente con deficiencia en *SLC11A1*, gen que codifica para la proteína NRAMP1. Se evaluó la actividad de la NADPH oxidasa en polimorfonucleares y monocitos del paciente, se encontró defecto exclusivamente en los polimorfonucleares. Se evaluó la cantidad de RNA mensajero en polimorfonucleares y se observó que no hay diferencia en el nivel de transcritos comparado a controles sanos. Finalmente, se evaluó el alelo mutado p. V484M en un modelo de sobreexpresión en células HEK-293T y se encontró que la expresión de NRAMP1 a nivel de proteína se ve disminuida.

**Conclusión.** El uso de la NGS es útil para el diagnóstico genético de pacientes con inmunodeficiencias y permite la descripción de nuevas etiologías genéticas. Con respecto al gen ***NCF4* –  $p40^{phox}$** . Se describieron 24 nuevos casos con deficiencia de  $p40^{phox}$  y se caracterizaron 7 nuevas mutaciones de  $p40^{phox}$ . La deficiencia de  $p40^{phox}$  difiere de la EGC al presentar mayor número de infecciones superficiales y mayor desregulación de la respuesta inmune en contraste a las recurrentes infecciones severas e invasivas observadas en EGC. Finalmente, respecto al gen ***SLC11A1* – NRAMP1** se describió al primer paciente con deficiencia en NRAMP1 la cual es célula-específica afectando exclusivamente a los neutrófilos.

## ABSTRACT

### Introduction

Primary immunodeficiencies (PID) are genetic diseases that affect the correct function of the immune system. The PIDs are diagnosed evaluating the presence or the function of the immune cells and more recently using molecular techniques such as next generation sequencing (NGS). The NGS consist in the massive sequencing of the genome, exome or transcriptome of the patients. Since the implementation of NGS as a diagnostic method, more than 100 genes have been described conferring PID.

Chronic granulomatous disease (CGD) is a PID characterized by defects in the NADPH oxidase complex affecting the oxidative burst in patient's cells. Patients with CGD suffer life-threatening invasive infections, they have an early onset and are diagnosed early in life. The only curative treatment is the Human Stem Cell Transplantation.

**Methods.** We used NGS to analyze the whole exome sequence patients with recurrent infections that haven't been diagnosed previously. Subsequent WES data analysis lead to the discover of bi-allelic mutations in genes *NCF4* and *SLC11A1*. Mutations were further characterized in overexpression system using HEK293 cells and EBV-B cells. Moreover, we evaluated the oxidative burst in patient's polymorphonuclears stimulated with PMA using the DHR method. Finally, we performed the genetic rescue by viral retro-transduction in EBV-B cells from patients with  $p40^{phox}$  deficiency.

**Results.** We found 24 patients with  $p40^{phox}$  deficiency. Patients carried seven novel mutations in *NCF4*. Molecular characterization of the alleles showed six of them were Loss of Function whereas only two were hypomorphic (c.120\_134del y p. R58C). All the mutated alleles lead to a severe defect in the expression of *p40phox* protein except in the alleles with missense mutations (p. R58C y p. R105Q). Afterwards, we evaluated the activity of the NADPH oxidase complex. The oxidative burst in polymorphonuclears induced by PMA was from residual to normal but in all cases higher compare as the cells from classic CGD. By contrast when using the EBV-B cell lines from the patients, all patient's EBV-B cells showed a severe defect in the oxidative burst after PMA stimulation. Finally, we performed the genetic rescue in EBV-B cells from  $p40^{phox}$  deficient patients, we found that only when cells were reconstituted with the  $p40^{phox}$  wild-type and stimulated with PMA the cellular defect is rescued. These results confirm that the absence of a functional  $p40^{phox}$  protein is the cause of the severe defects in the NADPH oxidase activity.

Additionally, using NGS we found the first case of NRAMP1 deficiency. Homozygous mutation in *SLC11A1* was found in another patient. We tested the oxidative burst in polymorphonuclears and monocytes. Interestingly, NRAMP1 deficient cells showed impair oxidative burst exclusively in neutrophils compare as monocytes. Finally, we evaluated the impact of the mutation at transcriptional and protein level. We found *SLC11A1* mutation p.V484M does not affect the level of mRNA transcripts but it impairs the protein expression using an overexpression system in HEK293 cells.

**Conclusions.** NGS techniques are useful for the diagnostic of PID patients and allows the discover of new genetic etiologies. Regarding ***NCF4-p40<sup>phox</sup>***. We found the largest cohort of  $p40^{phox}$  deficient patients. We found seven novel genetic etiologies of  $p40^{phox}$  deficiency. Finally,  $p40^{phox}$  deficiency differs from classic CGD.  $p40^{phox}$  deficient patients showed a milder clinical phenotype characterized by superficial infections and immune dysregulations. On regard with ***SLC11A1-NRAMP1*** we reported the first patient with NRAMP1 deficiency associated to susceptibility of infections. This deficiency is suggested to be cell-dependent affecting exclusively the neutrophils.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antecedentes históricos.

Las enfermedades infecciosas han afectado a los humanos a lo largo de la historia. Los primeros reportes de procesos infecciosos fueron llamados “fiebre”. Esta “fiebre” era la principal causa de muerte en la población, causando un promedio de vida alrededor de los 20-25 años (Casanova & Abel, 2013).

Los primeros investigadores en tratar de describir los procesos infecciosos fueron Lavoisier, François Magendie y Claude Bernard, quienes proponían que la fiebre era un fenómeno intrínseco, todos ellos argumentaron que los organismos vivos respetaban las leyes de la física y la química, concluyendo que las enfermedades infecciosas no son algo más que la alteración del organismo. Ellos estipularon que tanto humanos y animales están conformados por un “ambiente interno” que los protege de los cambios ambientales.

Posteriormente, Louis Pasteur fue el primero en relacionar a los microorganismos con los procesos infecciosos. En su investigación con gusanos de seda describe a *pébrine* y *flacherie* como procesos infecciosos y contagiosos (Kruif, 1926) (Pasteur L., 1926). Pasteur también describió microorganismos patógenos como *Pasteurella multocida* y *Bacillus anthracis*, que son capaces de infectar animales, así como virus que eran capaces de afectar al humano como el virus de la rabia. Debido a sus descubrimientos, Louis Pasteur establece por primera vez la “teoría microbiana de las enfermedades infecciosas”, la cual postula que los microorganismos patógenos son el principal factor responsable de los procesos infecciosos (R. Vallery-Radot, 1926). Esta teoría fue apoyada por los postulados de Koch y el descubrimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en 1882. Koch postula que para que exista un proceso infeccioso es necesario poder aislar y crecer al microorganismo (Metchnikoff, 1933).

Con el paso del tiempo, la teoría microbiana empezó a resultar incompleta. Fue el mismo Louis Pasteur con sus estudios del virus de la rabia y el descubrimiento de la vacunación, que introduce, por primera vez la teoría inmunológica de los procesos infecciosos. Esta nueva teoría, adoptada por inmunólogos de la época, postula que la inmunidad de cada

individuo establece las condiciones para que se desarrolle o no un proceso infeccioso. Con esta nueva corriente transcurre más de medio siglo buscando y describiendo cada proceso infeccioso como un fallo en la respuesta inmune sobre todo en la inmunidad adquirida. A pesar de los avances científicos de la época en el área de la inmunología, existían cuestiones como el explicar porque algunas personas generaban una mejor respuesta adaptativa que otras, o en su caso porque algunos individuos eran susceptibles de desarrollar enfermedades a pesar del uso de vacunas y de antibióticos.

Aunque la teoría inmunológica hace referencia a variaciones somáticas (recombinación VDJ) no se centra en la capacidad “intrínseca” de un organismo a desarrollar una infección, el cual en un futuro se establecería como la teoría genética de las infecciones. Interesantemente, es Louis Pasteur el primero que hace referencia a la posibilidad de que existe una capacidad intrínseca que predispone a los procesos infecciosos, en sus estudios con gusanos de seda describe a *Flacherie* como una enfermedad hereditaria. Esta predisposición intrínseca o genética comienza a tomar importancia al describirse que existen individuos que a pesar de estar expuestos a microorganismos patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, no todos presentan síntomas de infección e incluso algunos son capaces de controlar la infección en un estado latente. En este punto de la historia diversos genetistas empezaron a describir el fenómeno de infecciones asintomáticas y proponen que la carga genética de línea germinal del hospedero determina la susceptibilidad o resistencia a cada microorganismo (Pearson, 1912).

Con la llegada de la era molecular y celular, se comienza a consolidar la teoría genética de la susceptibilidad a infecciones con la primera descripción de una inmunodeficiencia primaria (PID). En 1952, se describe la primera PID: la Agammaglobulinemia Ligada al X (ALX). Ogden Bruton reportó a un paciente masculino con infecciones recurrentes por neumococo y con ausencia de la fracción gamma de las proteínas séricas; el fenotipo clínico del paciente mejoró al administrarse gammaglobulina por vía intravenosa (Bruton, 1952). Esta fue la primera referencia en donde existía una deficiencia en el sistema inmunológico que predisponía a infecciones y en donde el fenotipo podía ser “rescatado” con la administración de gamma globulinas. Aunque esta primera descripción de PID fue reportada clínicamente como una enfermedad ligada al X y con penetrancia completa, tomó 40 años para describirse por primera vez la etiología genética causante de ALX. En

1993, se describen mutaciones en la tirosina-quinasa localizada en el citoplasma de células de linaje hematopoyético que está presente durante la diferenciación de los linfocitos B, Tirosina-quinasa de Bruton (BTK) por sus siglas en inglés (Vetrie et al., 1993). BTK es activada en los linfocitos B a través del BCR (Saouaf et al., 1994). Una vez activada BTK junto con la fosfolipasa C  $\gamma 2$  (PLC $\gamma 2$ ) se unen a la proteína adaptadora BLNK permitiendo que BTK fosforile a PLC $\gamma 2$ , llevando así a la generación de diacilglicerol e inositol trifosfato (IP $_3$ ). IP $_3$  a su vez, incrementa los niveles de calcio en el citosol, que conducen a la proliferación celular (Rawlings, 1999). Hasta el momento, se han descrito más de 600 mutaciones en BTK, la mayoría de estas mutaciones afectan la expresión de la proteína. Aquellas mutaciones que no afectan la estabilidad de la proteína están asociadas a un fenotipo clínico e inmunológico menos severo (Valiaho *et al* 2006). Esta amplia descripción de la primera PID asociada a la susceptibilidad de infecciones por patógenos en su mayoría bacterias piógenas, resalta la importancia de las gamma globulinas (anticuerpos) en el sistema inmune como parte esencial para combatir las infecciones. Hasta cierto punto, este ángulo de estudio pudo ser cubierto por la teoría inmunológica de las infecciones. Sin embargo, la etiología genética causante de esta PID cae más propiamente en la teoría genética, en donde se adjudica que los errores de línea germinal (mutaciones) en BTK son las responsables de los subsecuentes eventos que conllevan a la susceptibilidad a las infecciones.

En la actualidad gracias al acceso a técnicas como la secuenciación de nueva generación (NGS) se ha aumentado considerablemente la descripción de nuevas mutaciones que se asocian a una susceptibilidad de enfermedades infecciosas. A la fecha se han descrito más de 300 genes asociados a PID.

## **1.2. Inmunodeficiencias primarias.**

Desde la primera PID descrita, las inmunodeficiencias fueron definidas como enfermedades raras, mendelianas y con penetrancia completa, con desarrollo temprano de infecciones múltiples y recurrentes, así como infecciones por microorganismos oportunistas y en donde se asocia alguna anomalía inmunológica observable (Casanova & Abel, 2013).

Las PIDs en la actualidad representan un excelente modelo de estudio para describir la importancia y la función del sistema inmune. En muchos casos, el estudio de las inmunodeficiencias ha llevado a la identificación de nuevos genes que son cruciales en el desarrollo de células del sistema inmune o con una función efectora o que contribuyen a la homeostasis para mantener un adecuado funcionamiento durante la respuesta inmune (Fischer, 2004). Estas inmunodeficiencias se consideran “experimentos de la naturaleza” y durante más de 50 años de estudio se han descrito más de 350 inmunodeficiencias asociadas a un gen específico.

Existe una amplia clasificación de las PID en este escrito se describirán las inmunodeficiencias de acuerdo a la más reciente actualización realizada por el Comité de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología realizada en 2015 (Picard et al., 2015).

### **1.2.1. Inmunodeficiencias en inmunidad celular y humoral.**

Este grupo de inmunodeficiencias se caracteriza por deficiencia en el desarrollo o función de los linfocitos T y/o linfocitos B. Dentro de este grupo, se han descrito mutaciones *IL2RG*, gen que codifica para la cadena gamma común del receptor de IL-2, IL-7 e IL-15. Deficiencias en esta proteína afecta la proliferación de los linfocitos por parte de IL-2, defectos en la vía de IL-7 afecta la diferenciación de los linfocitos y defectos en la vía de IL-15 afecta la generación de células NK (Kruger et al., 1984; Schmalstieg & Goldman, 2002). Asimismo, se han descrito en este grupo de PID, genes encargados en la recombinación VDJ (*RAG1*, *RAG2*, *Artemisa*, *PRKCD*, etc.), estos genes codifican proteínas encargadas de realizar y controlar el proceso de la recombinación somática en los linfocitos; deficiencias en estos genes conllevan a la marcada disminución de linfocitos B y T circulantes (Moshous et al., 2001; Villa, Santagata, Bozzi, Imberti, & Notarangelo, 1999)(Moshous et al., 2001). Otro proceso involucrado en este grupo de PID consiste en la deficiencia de realizar adecuadamente la activación entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos, mutaciones en proteínas que interfieren en la correcta presentación de antígeno por MHC de clase I y II, mutaciones en *CD3*, *CD4*, así como mutaciones en las moléculas de co-estimulación (*CD40*, *CD40L*); el fenotipo

inmunológico en pacientes con deficiencias en el proceso de la presentación de antígenos comúnmente se observa un nivel de linfocitos T disminuido o normal pero no funcionales. Los linfocitos B en su mayoría se encuentran en niveles normales, sin embargo, no son funcionales. Por ejemplo, se ha observado que en deficiencias de CD40/CD40L los valores de IgM se encuentran elevados mientras que los otros isotipos de anticuerpos se encuentran bajos, afectando claramente al cambio de clase en las inmunoglobulinas (DiSanto, Bonnefoy, Gauchat, Fischer, & de Saint Basile, 1993). Finalmente, en este grupo, un proceso ampliamente estudiado es la señalización en la activación de los linfocitos. Se han descrito mutaciones en proteínas clave durante la activación que conllevan a diversos fenotipos clínicos; dentro de este proceso se encuentran mutaciones en genes como: *ZAP-70*, *MST1*, *MAGT1*, *ITK*, etc. (Roifman et al., 2012).

### **1.2.2. Inmunodeficiencias en la producción de anticuerpos.**

En este grupo de PID se encuentra ALX o comúnmente llamada “Inmunodeficiencia de Bruton”, esta fue la primera inmunodeficiencia en ser descrita y asociada a BTK como etiología genética. La mayoría de PID en este grupo se asocian a alguna deficiencia en el desarrollo de los linfocitos B y a la producción de anticuerpos. Pacientes con deficiencias en la producción de anticuerpos, normalmente son susceptibles a infecciones por bacterias piógenas. Esto se debe en general, a que estas bacterias presentan dentro de sus componentes celulares una capa de polisacáridos, esto hace que sean difíciles de ser eliminadas por las células fagocíticas; los anticuerpos sirven para opsonizar a las bacterias y facilitar la fagocitosis por las células como macrófagos y neutrófilos (Janeway, Travers, Walport, & Shlomchik, 2001).

Además de BTK, el fenotipo de agammaglobulinemia se encuentran mutaciones en genes que codifican para proteínas estructurales de los anticuerpos o en el desarrollo de los linfocitos B, como por ejemplo: *IGHM* (cadena pesada  $\mu$ ), *IGLL1* (cadena ligera), CD79A, CD79B (Smith & Cunningham-Rundles, 2019; Y. Wang et al., 2002). Las PID de este grupo también se asocian con la disminución de al menos 2 isotipos de anticuerpos y con un número normal o bajo de linfocitos B. Mutaciones en CD19 (van Zelm et al.,

2006), CD81 (van Zelm et al., 2010), CD20 y CD21 se han descrito como responsable de esta deficiencia, las proteínas codificadas en estos genes se han asociado en la activación de las células B y a la diferenciación a células plasmáticas (Kuijpers et al., 2010; Thiel et al., 2012). Asimismo, otras PID de este grupo se caracterizan por el defecto en la producción de anticuerpos IgA e IgG, pero con valores normales o altos de IgM y linfocitos B. Dentro de estas PID, se han descrito mutaciones en *AICDA*, *UNG*, *INO80* y *MSH6*, estos genes se asocian a los procesos de cambio de clase y a la reparación del *DNA* (Qamar & Fuleihan, 2014). Por último, en este grupo se encuentran PID que presentan la deficiencia completa de anticuerpos, pero con un valor normal en los linfocitos B. Mutaciones en *PIK3CD*, *IKGC*, *PIK3R1*, *CARD11*, etc. Estas mutaciones se asocian a defectos en la activación de los linfocitos B, por ejemplo en el proceso de biogénesis de anticuerpos y la señalización de linfocitos B (Bogaert et al., 2016).

### **1.2.3. Inmunodeficiencias en la regulación de la respuesta inmune.**

La regulación de la respuesta inmune es crucial para mantener la homeostasis del organismo, tanto la regulación en la activación como la regulación en la inhibición está estrictamente controlada por mediadores solubles y células específicas, defectos en la regulación pueden llevar a fenotipos clínicos como enfermedades autoinmunes y/o susceptibilidad a infecciones. Dentro de este grupo se encuentran mutaciones en una familia de genes asociados a algunos síndromes como Linfocitosis hemofagocítica con mutaciones en *PRF1*, *UNC13D*, *STX11*, entre otras, en este tipo de etiologías genéticas a pesar de no estar involucradas directamente a una deficiencia en linfocitos afecta procesos como la fusión de vesículas afectando en algunos casos la citotoxicidad mediada por las células NK (Feldmann et al., 2003; Stadt et al., 2006; Tesi et al., 2015). Dentro de este grupo de PID también se encuentran mutaciones en genes asociados al desarrollo y función de las células T reguladoras, estas células juegan un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmune: las células T reguladoras se han visto afectadas en mutaciones en genes como *FOXP3*, *IL2RA*, *CTLA4*, *STAT3 GOF* (Ganancia de función por sus siglas en inglés) (Chang, Zheng, & Liu, 2006; Minegishi et al., 2007; Oaks et al., 2000; Sharfe, Dadi, Shahar, & Roifman, 1997). Las deficiencias en

regulación por las células T reguladoras por lo general conducen a un fenotipo clínico caracterizado por autoinmunidad. Existen otro tipo de PID que se caracterizan específicamente en causar un fenotipo clínico de enfermedad autoinmune, dentro de este fenotipo se han descrito mutaciones en genes como *AIRE* el cual es un factor de transcripción importante en el proceso de tolerancia central. Asimismo, deficiencias en IL10 o IL10R que se han visto relacionadas con un fenotipo de a colitis en pacientes (Meng et al., 1998).

Por último, en este grupo de PID también se encuentran deficiencias llamadas interferonopatías. Las interferonopatías son causadas por mutaciones que afectan la señalización y función de los interferones del tipo I. Se han descrito mutaciones en *TREX1*, *RNASEH2C*, *ADAR1*, *ACP5*, *ADA2* (Rodero & Crow, 2016).

#### **1.2.4. Inmunodeficiencias en la inmunidad innata dependiente del fenotipo clínico.**

En este grupo de inmunodeficiencias se agrupan mutaciones en genes involucrados en ciertos procesos específicos, que en la mayoría de los casos conlleva a un fenotipo clínico similar, la redundancia de la respuesta inmune ante la infección con ciertos patógenos ha permitido clasificar las siguientes deficiencias en los siguientes grupos:

- **Susceptibilidad Mendeliana a Infecciones por Micobacterias** (MSMD, por sus siglas en inglés). MSMD es caracterizada por infecciones recurrentes por micobacterias de baja virulencia como BCG (el bacilo atenuado de *Mycobacterium bovis*), *Salmonella* spp. y en algunos casos por *Candida albicans*. Pacientes diagnosticados con MSMD por lo regular presentan mutaciones en genes que se relacionan con la inducción, reconocimiento o señalización de la vía del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Mutaciones en *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12RB1*, *IRF8*, *IL12B*, *STAT1*, *CYBB*, *TYK2*, *ISG15*, *RORC* han sido ampliamente descritas y estudiadas por el grupo del Prof. JL Casanova. En estas deficiencias se ha demostrado que el IFN $\gamma$  juega un papel muy importante durante las infecciones por micobacterias, el estudio de estas mutaciones ha conducido al consejo genético y al tratamiento

específico dependiendo de la mutación presente en este grupo de pacientes (Rosain et al., 2019).

- **Epidermodisplasia verruciforme.** Este tipo de susceptibilidad fue descrita por primera vez en 1922, en donde se describe que hay pacientes que desarrollan verrugas planas o algún otro tipo de lesiones en la piel. Existen varios serotipos de HPV descritos, la mayoría de ellos se comportan como comensales; Sin embargo, existe un grupo de pacientes que son susceptibles a desarrollar epidermodisplasia. Mutaciones en *TMC6*, *TMC8*, *CXCR4*, *CXCL12* han sido descritas como etiologías genéticas, a pesar del estudio aún no se dilucida cuál es la importancia de proteínas del grupo TMC en la respuesta inmune contra el virus HPV por lo que es necesario realizar más estudios en pacientes diagnosticados con epidermodisplasia y que no cuenten con mutaciones en los genes ya reportados (Przybyszewska, Zlotogorski, & Ramot, 2017).
- **Predisposición a infecciones virales severas.** Existen pacientes en donde se encuentran predispuestos a sufrir infecciones graves por diversos tipos de virus. Estos pacientes por lo general son portadores de mutaciones que confieren una deficiencia completa (perdida de función) de genes clave para la respuesta inmune contra virus. Dentro de estos genes, se encuentran *STAT1*, *STAT2*, *IRF7*, *CD16*.
- **Encefalitis por Herpes Simple (HSE, por sus siglas en inglés).** HSE es una enfermedad causada por el virus Herpes simple, este virus es ubicuo y normalmente inocuo. Sin embargo existen pacientes en su mayoría niños que desarrollan encefalitis. Al estudiar de forma epidemiológica a pacientes con HSE, se encontró que existían mutaciones en *TLR3*, *TRAF3*, *TRIF*, *TBK1*. Deficiencias en estos genes se asocian directamente a la respuesta mediada por interferones del tipo I (IFN- $\alpha$ /IFN- $\beta$ ) (Gnann & Whitley, 2017) .
- **Candidiasis Mucocutánea Crónica (CMC, por sus siglas en inglés).** *Candida albicans* es un hongo comensal, se encuentra en mucosas y piel. Pacientes con CMC presenten infecciones recurrentes por este microorganismo, y en su gran mayoría portan deficiencias en la respuesta inmune mediada por IL-17. El eje de IL-17 es importante para el control y la eliminación del hongo, se han descrito mutaciones en *CARD9*, *IL17RA*, *IL17RC*, *IL17F*, *Dectina-1*, *STAT1-GOF*, *ACT1*

como etiologías genéticas de CMC (Lehman & Gordon, 2019; Reyes-Martínez et al., 2014).

- **Deficiencias en la vía de señalización de TLRs.** Algunos pacientes se han descrito clínicamente que sufren de infecciones recurrentes por bacterias piógenas. Sin embargo al realizar estudios genéticos y funcionales se han relacionado con deficiencias en la señalización de los TLRs. Los TLRs son receptores propios de la inmunidad innata y tienen una importancia esencial en el reconocimiento de los microorganismos. Se han reportado mutaciones en *IRAK4*, *MYD88*, *RSPA*, *APOL-1* (Picard et al., 2010).

#### **1.2.5. Inmunodeficiencias causantes de desórdenes autoinmunes.**

Los desórdenes autoinmunes se asocian a una deficiencia en el control y regulación de la respuesta inmune. Esencialmente, estas etiologías genéticas no representan una deficiencia en la respuesta inmune contra microorganismos, sino que causan una inadecuada regulación de la respuesta, generando como consecuencia daño en el organismo o inhibición de otros procesos que son importantes para el control de microorganismos. Dentro de este grupo de deficiencias encontramos mutaciones en genes involucrados en el inflammasoma como: *MEFV*, *MVK*, *NLRP3*, *NLRP2*, *NLRC4* (Sönmez & Özen, 2017).

#### **1.2.6. Inmunodeficiencias del sistema de complemento.**

El sistema de complemento es un sistema de vital importancia en la inmunidad, se encarga de realizar funciones como la quimiotaxis, opsonización y elimina directamente a microorganismos. El sistema de complemento cuenta con proteínas de regulación y proteínas efectoras. Mutaciones en genes que codifican para C1q, C1s, C4; C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9 o para las proteínas reguladoras como: Factor H (CFH), Factor D, properdina, o el receptor de complemento (CR3), se asocian a infecciones recurrentes por microorganismos capsulados como *Neisseria* spp y con procesos autoinmunes (Conigliaro et al., 2019).

### 1.2.7. Inmunodeficiencias en las células fagocíticas.

Las células fagocíticas tienen una función crucial durante la respuesta inmune, son necesarias para realizar una adecuada presentación de antígeno y consecuente activación de los linfocitos T. Asimismo, son necesarias para eliminar las bacterias durante una infección. Por lo tanto, mutaciones que impactan el número o la función de las células fagocíticas afectan considerablemente la adecuada respuesta inmune conduciendo a un fenotipo clínico caracterizado por infecciones recurrentes de bacterias piógenas, micobacterias y/o bacterias intracelulares. Prácticamente, la inmunidad celular se ve comprometida en pacientes que este tipo de deficiencias. Dentro de los genes que conllevan a la deficiencia de las células fagocíticas se encuentran mutaciones que están ligadas a una deficiencia de neutrófilos, específicamente: *WAS*, *GFI1*, *TAZ*, *ELANE*, *GATA2*, entre otros. La mayoría de estas mutaciones impacta en el desarrollo del linaje mieloide generando así neutropenia en este tipo de pacientes (Hsu et al., 2011; Lemahieu, Gastier, & Francke, 1999).

Existe otro grupo de genes asociado a deficiencias de fagocitos ligada directamente a procesos como la migración y la adhesión. Mutaciones en *ITGB2*, *SLC35C1*, *ACTB*, *RAC2*, *SBDS*; este grupo de genes afecta la motilidad de las células fagocíticas, así como la quimiotaxis y no necesariamente se ven afectados los valores de monocitos o neutrófilos en los pacientes (Picard et al., 2015).

Otro proceso importante en las células fagocíticas es el estallido respiratorio, mutaciones en moléculas encargadas de realizar el estallido respiratorio han sido ampliamente descritas por médicos y se les ha agrupado en la enfermedad granulomatosa crónica. En esta enfermedad se han descrito mutaciones en genes como *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2*, *NCF3* y *NCF4* este grupo de genes codifica para subunidades del complejo NADPH oxidasa el cual es necesario para realizar el estallido respiratorio en las células fagocíticas después de ser activadas (Holland, 2014).

### 1.3. Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC).

La EGC es una inmunodeficiencia primaria causada por un defecto, principalmente en las células fagocíticas (Neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) caracterizado

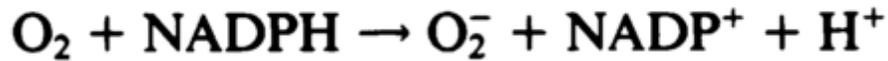
por la ausencia o disminución en el estallido respiratorio, conllevando así a una deficiente eliminación de bacterias y hongos. La EGC es caracterizada por infecciones severas, invasivas y recurrentes causadas por bacterias como *Staphylococcus aureus* y hongos como *Aspergillus* spp., también existe una desregulación en la respuesta inflamatoria conllevando a la formación de granulomas y otros desordenes inflamatorios como colitis o autoinmunidad. La EGC se presenta principalmente antes de los 5 años sin embargo algunos pacientes pueden desarrollar síntomas en una edad adulta. El uso de antibióticos como profilaxis ha aumentado considerablemente la sobrevivencia de estos pacientes y el tratamiento definitivo para estos pacientes es el trasplante de medula ósea o la recientemente descrita, terapia génica (Holland, 2014).

La EGC se diagnostica evaluando la función del complejo enzimático NADPH oxidasa en neutrófilos. Actualmente el ensayo de Dihidrorodamina (DHR) es el ensayo más utilizado en el área clínica ya que es más fácil y sensible que el antiguo método para evaluar la función del estallido respiratorio, la oxidación del azul de tetrazolio (NBT). En la actualidad existen métodos más específicos para el diagnóstico de EGC como la secuenciación. La EGC es causada por variantes patogénicas en uno de los 5 genes que codifican para las subunidades del complejo NADPH oxidasa. Mutaciones bi-alélicas en *CYBA* – *gp91<sup>phox</sup>*, *NCF1* – *p47<sup>phox</sup>*, *NCF2* – *p67<sup>phox</sup>* y *NCF4* – *p40<sup>phox</sup>* son causantes de EGC autosómica recesiva (EGC-AR); mutaciones en *CYBB* – *gp91<sup>phox</sup>* conllevan EGC ligada al cromosoma X (EGC-X) (Holland, 2014). Recientemente, con el uso de NGS, se ha descrito una nueva etiología genética para EGC, mutaciones deletéreas en el gen *C17orf62* o *CYBC1*.

### 1.3.1 Complejo NADPH oxidasa.

El complejo NADPH oxidasa es un complejo enzimático con gran importancia en células del sistema inmune. Este complejo enzimático tiene la función de transportar electrones provenientes de la forma reducida de la coenzima NADPH a la molécula de oxígeno para así generar especies reactivas del oxígeno (ROS). La primera molécula formada debido a la translocación de electrones es anión superóxido  $O_2^-$  (Figura 1). El anión superóxido posteriormente puede ser transformado por la enzima superóxido dismutasa a peróxido

de hidrogeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estos ROS generados son utilizados por las células fagocíticas como un mecanismo microbicida (Badwey & Karnovsky, 1980).



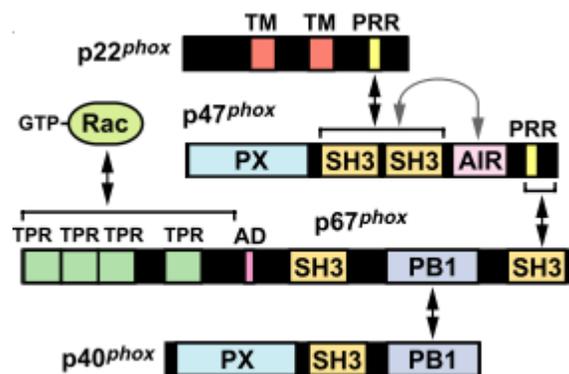
**Figura 1. Reacción enzimática de producción de ROS por el complejo NADPH oxidasa.**

El complejo NADPH oxidasa está conformado por un núcleo enzimático y subunidades citosólicas. El núcleo enzimático también conocido como flavocitocromo b558 se localiza en la membrana de los fagosomas y está formado por un heterodímero de la glicoproteína gp91<sup>phox</sup> y la proteína p22<sup>phox</sup>. Las demás subunidades del complejo se encuentran en el citoplasma y son las proteínas p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y p40<sup>phox</sup>. Las subunidades citosólicas que forman el complejo NADPH oxidasa son translocadas a la membrana del fagosoma cuando hay activación celular, por ejemplo, en macrófagos estimulados con  $\text{IFN}\gamma$ , las subunidades se acoplan al flavocitocromo b558 para comenzar la producción de ROS. La activación del complejo NADPH oxidasa es un proceso finamente regulado y conlleva la interacción de dominios específicos de cada subunidad, la subunidad gp91<sup>phox</sup> es el núcleo catalítico del transporte de electrones, está conformado por seis dominios transmembranales que contienen 2 grupos *hemo*, también en el carboxilo terminal se localizan dos dominios citoplásmicos de unión a las coenzimas FAD y NADPH. La otra subunidad parte del flavocitocromo b558 es p22<sup>phox</sup>, esta subunidad se une y estabiliza a gp91<sup>phox</sup>, contiene dos dominios transmembranales y un dominio citoplásmico con una región rica en prolinas (PRR) que funciona como sitio de anclaje para la subunidad p47<sup>phox</sup>, la primera subunidad citosólica necesaria para el ensamblaje del complejo, por lo que p22<sup>phox</sup> es una subunidad con la capacidad reguladora ya que interconecta a las subunidades citoplasmáticas con el flavocitocromo b558.

La subunidad citoplásmica p47<sup>phox</sup> contiene dentro de su estructura varios dominios SH3 los cuales, son necesarios para la interacción con otras proteínas. Sin embargo, en estado basal, los dominios SH3 presentes en p47<sup>phox</sup> se encuentran estéricamente bloqueados, para habilitar estos dominios SH3 la proteína cuenta con una región auto inhibitoria rica en serinas las cuales son susceptibles a fosforilación. Durante activación,

por ejemplo, con forbol 12- miristato 13- acetato (PMA), las serinas son fosforiladas causando un cambio conformacional y dejando estéricamente disponibles los dominios SH3 y el dominio PHOX. Los dominios SH3 de  $p47^{phox}$  permiten la interacción entre  $p47^{phox}$  y  $p22^{phox}$ , el dominio PHOX, por otra parte, interacciona con fosfatidil-inositoles de la membrana celular (Figura 2).

La segunda subunidad citoplásmica en interaccionar es  $p67^{phox}$ , esta subunidad contiene tres dominios principales: dominios SH3 que permiten la interacción con  $p47^{phox}$ , una región con repeticiones tetra-trico peptídicas que son importantes para la interacción con RAC1 o RAC2 y finalmente el dominio PB1 el cual, permite la interacción con  $p40^{phox}$ . Durante la activación del complejo NADPH oxidasa,  $p67^{phox}$  es traslocado a la membrana a través de la interacción entre el dominio PRR de  $p47^{phox}$  y el dominio SH3 de  $p67^{phox}$ , la asociación entre  $p47^{phox}$  y  $p67^{phox}$  es dependiente de la activada de RAC1 o RAC2 (Figura 2).



**Figura 2. Interacción molecular entre las subunidades del complejo NADPH oxidasa.**

Finalmente, la subunidad  $p40^{phox}$  está conformada por tres dominios: dominio SH3, dominio PHOX y dominio PB1. El dominio PB1 de  $p40^{phox}$  interacción con el dominio PB1 de la subunidad  $p67^{phox}$  permitiendo que  $p67^{phox}$  interaccione con  $p47^{phox}$  por medio de los dominios SH3 y así formar el hetero-trímero  $p47^{phox}$ - $p67^{phox}$ - $p40^{phox}$ . (Figura 2). Durante la activación  $p40^{phox}$  estabiliza a  $p67^{phox}$  permitiendo la formación del hetero trímero de las subunidades citosólicas, finalmente se activa el complejo NADPH oxidasa favoreciendo la formación de ROS (Figura 3)

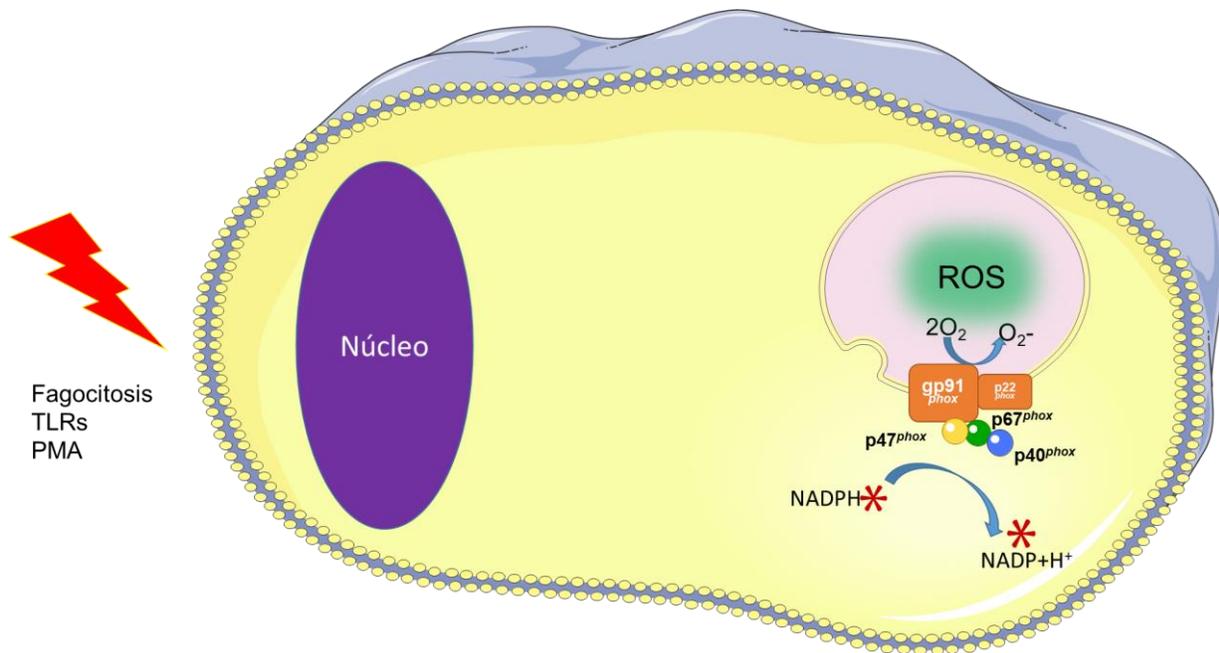


Figura 3. Esquema de la activación del complejo NADPH oxidasa en células fagocíticas.

### 1.3.2. EGC ligada al cromosoma X

El tipo de EGC ligada al cromosoma X es causada por mutaciones en el gen *CYBB* causando la deficiencia en la proteína gp91<sup>phox</sup>. Esta deficiencia fue la primera etiología genética identificada causante de EGC (Dinauer et al., 1987). Pacientes con pérdida de función de la proteína gp91<sup>phox</sup> presentan EGC clásica caracterizada por la deficiencia total del complejo NADPH oxidasa, las células fagocíticas ante estímulos como el PMA son incapaces de producir ROS en ensayos de DHR. Estos pacientes debutan a edades tempranas con infecciones pulmonares recurrentes, principalmente por el género *Aspergillus* spp (Holland, 2014). Por otro lado, mutaciones hipomórficas en el gen *CYBB* causan un defecto parcial en la actividad del complejo NADPH oxidasa, esta actividad residual se correlaciona con un mejor pronóstico para los pacientes (Kuhns et al., 2010). Esta actividad residual se ha demostrado con ensayos de DHR en neutrófilos en donde se detectan niveles elevados de ROS en comparación con los pacientes con mutaciones amorficas causantes de pérdida de función en gp91<sup>phox</sup>, a esta variante en el fenotipo celular y clínico se le denomina: variante de EGC. Esta deficiencia representa la causa

del 60% de los casos de EGC reportados en literatura (de Oliveira-Junior et al., 2015; van den Berg et al., 2009; Winkelstein et al., 2000).

### 1.3.3. Deficiencia de p22<sup>phox</sup>

La deficiencia de p22<sup>phox</sup> confiere EGC autosómica recesiva, estas etiologías genéticas son menos frecuentes comparado con EGC ligada al X. La mayoría de las mutaciones en p22<sup>phox</sup> afectan severamente la expresión de esta subunidad, la capacidad de producir ROS en estos pacientes se encuentran en un rango muy amplio siendo los pacientes con mutaciones un cambio puntual en un aminoácido los que tienen niveles residuales de ROS más altos (Kuhns et al., 2010).

### 1.3.4. Deficiencia de p47<sup>phox</sup>

La deficiencia de p47<sup>phox</sup> confiere EGC autosómica recesiva. La proteína p47<sup>phox</sup> es una subunidad citosólica del complejo NADPH oxidasa, las mutaciones en el gen NCF1 confieren este tipo de EGC, dentro de las tres subunidades citosólicas (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y p40<sup>phox</sup>) las mutaciones en p47<sup>phox</sup> son las más abundantes. El locus de NCF1 presenta un *hot spot* en el exón 1 causando una delección y una pérdida de función en p47<sup>phox</sup>. Los pacientes con deficiencia en p47<sup>phox</sup> presentan niveles más altos que los pacientes con mutaciones en gp9<sup>phox</sup>, también presentan mejor pronóstico y mayor supervivencia que los pacientes con EGC ligada al X (Kuhns et al., 2010).

### 1.3.5. Deficiencia de p67<sup>phox</sup>

La deficiencia de p67<sup>phox</sup> confiere EGC autosómica recesiva. La proteína p67<sup>phox</sup> es también una subunidad citosólica del complejo NADPH oxidasa. Pacientes con mutaciones en el gen *NCF2* en su mayoría presentan ausencia en la expresión de p67<sup>phox</sup>.

La producción de ROS es residual en un rango muy amplio, algunas veces incluso con niveles muy similares a los normales (Kuhns et al., 2010).

### 1.3.7. Deficiencia de p40<sup>phox</sup>

La proteína p40<sup>phox</sup> es una subunidad citosólica que conforma el complejo NADPH oxidasa. A la fecha el papel de p40<sup>phox</sup> sigue siendo controversial. En modelos de ratones knockout de *NCF4*<sup>-/-</sup> se ha observado una disminución en el estallido respiratorio de neutrófilos sin embargo no se encuentra totalmente abolido. Así mismo se describe que p40<sup>phox</sup> interactúa directamente con p67<sup>phox</sup> y el ratón deficiente de p40<sup>phox</sup> también presenta una disminución en p67<sup>phox</sup>. Por otra parte se encontró que la capacidad de eliminar bacterias en neutrófilos de ratones *NCF4*<sup>-/-</sup> se ve afectada al no poder eliminar adecuadamente *Staphylococcus aureus* (Ellson et al., 2006) .

En humanos, Matute *et al* en 2009 describió el primer y único caso de un paciente con una mutación heterocigota compuesta en el gen *NCF4*, el paciente no presenta un fenotipo clásico de EGC sino presenta Enfermedad de Crohn, con granulomas en intestino, el ensayo de oxidación de la Dihidrorodamina (DHR) del paciente se muestra anormal, aunque no disminuida como los pacientes *CYBB*<sup>-/-</sup>. Al caracterizar los alelos se describió que el paciente presentaba una duplicación con un corrimiento en el marco de lectura que conlleva a un codón de paro en un alelo; en el segundo alelo se encontró una mutación con pérdida de sentido con la modificación R105Q que al caracterizarse se encontró que este alelo codifica para una proteína p40<sup>phox</sup> que pierde la capacidad de translocarse al fagosoma, por lo que no se puede unir al complejo NADPH oxidasa. Sin embargo al evaluar el estallido respiratorio ante estímulos como PMA se observa una respuesta normal, interesantemente cuando el estímulo es causado por partículas de látex recubiertas con zimosan como un estímulo fisiológico se encontró que existe un defecto en el estallido en células con el alelo R105Q (Matute *et al.* 2009).

### 1.3.7. *SLC11A1* codifica a NRAMP1

El gen *SLC11A1* (Solute carrier family 11 member 1) codifica para NRAMP1 (Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1). NRAMP1 es una proteína altamente glicosilada con localización transmembranal, cuenta con 12 dominios transmembranales y se encuentra altamente conservada en humanos y bacterias. Se han asociado variantes en *SLC11A1* a susceptibilidad a infecciones y enfermedades autoinmunes (Jenefer M Blackwell, Searle, Mohamed, & White, 2003). La expresión de NRAMP1 se restringe a células mieloides, neuronas y algunos tejidos endocrinos (White *et al.* 2004). En macrófagos, NRAMP1 se localiza en la membrana de los endosomas tardíos, lisosomas y fagolisosomas. A la fecha sigue siendo controversial el papel que tiene NRAMP1 en células humanas pero se cree es importante en regular la concentración de iones divalentes en citoplasma y vacuolas (Goswami *et al.*, 2001). En macrófagos RAW264.7 derivados de ratones con mutación en NRAMP1 en la posición G169D muestran una deficiencia de NRAMP1. Estas células en particular mostraron que NRAMP1 es esencial para el transporte de hierro al interior de fagosomas conteniendo partículas de látex o micobacterias (Kuhn, Baker, Lafuse, & Zwilling, 1999). Estos resultados condujeron a la hipótesis de que NRAMP1 transporta el hierro dentro de los fagosomas conteniendo bacterias y así limitar el crecimiento de la micobacteria catalizando la producción de ROS. Por otro lado, otros estudios sugieren que el papel de NRAMP1 en procesos infecciosos transportando los iones divalentes del interior de los fagosomas hacia el citoplasma y así limitar el crecimiento bacteriano al secuestrar nutrientes esenciales para el crecimiento bacteriano (Barton, Biggs, Baker, Bowen, & Atkinson, 1999). A la fecha se sabe que la regulación en la concentración de iones divalentes en especial hierro regulado por NRAMP1 tiene un papel importante para una buena función celular. Bajos niveles de hierro están ligados con una baja producción de Óxido Nítrico y la incapacidad de producir reacciones proinflamatorias de manera rápida (Valdez *et al.*, 2009). Sin embargo, estudios en genética de poblaciones concluyen que existen variantes y polimorfismos asociados a una susceptibilidad a infecciones y a procesos autoinmunes (Malik *et al.*, 2005). Sin embargo, no existe una prueba molecular o un mecanismo que explique cuál es el papel que NRAMP1 tiene para favorecer un fenotipo u otro.

#### 1.4. Secuenciación de nueva generación (NGS)

Se denomina secuenciación de nueva generación o (NGS) por sus siglas en inglés, al procesamiento, secuenciación y análisis masivo de información codificada en el DNA. Desde 2007, esta tecnología ha sido accesible para los investigadores, actualmente el precio de esta tecnología oscila alrededor de los 1000 USD comparado con el “Human Genome Project” que tuvo un costo alrededor de 3,000,000,000 USD (Illumina, [www.illumina.com](http://www.illumina.com)). A la fecha existen tres grandes compañías que ofrecen esta tecnología: Agilent, Illumina y Nimblegen. La NGS es un proceso totalmente automatizado, inicia con la adición de una muestra de DNA, posteriormente el DNA es fragmentado para construir una librería de pequeñas secciones del DNA, estos fragmentos son hibridados en una placa que contiene secuencias adaptadoras, una vez hibridado se realiza una polimerización para generar una doble cadena, el DNA es desnaturalizado permitiendo una nueva hibridación y polimerización. Este proceso es repetido gran cantidad de veces y posteriormente se comienza la secuenciación de cada grupo de fragmentos DNA amplificados. La secuenciación varía dependiendo de la compañía, en general se utilizan DNTP’s que al polimerizarse emiten fluorescencia (Figura 2). (Bamshad et al., 2011)

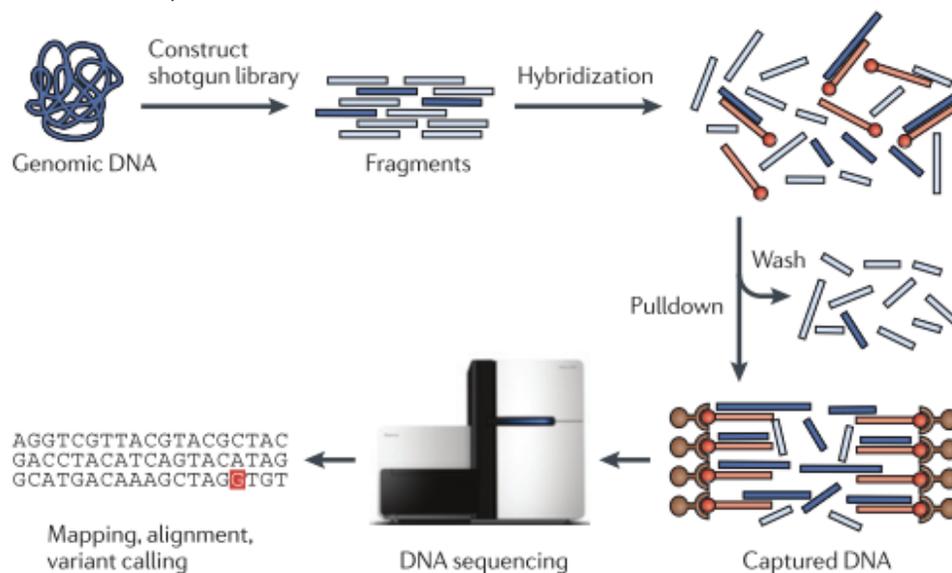


Figura 4. Diagrama de flujo de NGS.

Actualmente está disponible tres tipos de NGS, cada una de ellas ofrece ventajas dependiendo del estudio que se pretende realizar:

- **Secuenciación del exoma completo (WES, por sus siglas en inglés).** WES o secuenciación del exoma completo consisten en la amplificación y secuenciación de todos los fragmentos codificantes del DNA. En el humano esto equivale tan solo al 2% del genoma completo, sin embargo, el estudio del WES ha permitido dilucidar gran cantidad de polimorfismos y defectos genéticos, esto debido a que la gran mayoría de desórdenes mendelianos tiene consecuencias que afectan la expresión y/o función de las proteínas. Asimismo, variaciones en el genoma como mutaciones sin sentido, inserciones y deleciones también tienen un impacto en las regiones codificantes (Kryukov *et al* 2007).
- **Secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés).** WGS o secuenciación del genoma completo consiste en la amplificación de las regiones codificantes y no codificantes del DNA. Algunas desventajas de esta técnica son que es más costosa, requiere de mayor cantidad de DNA y más tiempo en el procesamiento y análisis. Sin embargo, el tener acceso a la secuencia de todo el genoma completo permite una mejor lectura de las regiones codificantes (Belkadi *et al.*, 2015). Asimismo, permite un análisis de los sitios de splicing esenciales y de las regiones que forman estructuras secundarias en la maduración de los RNA “Lariat Branch points” alrededor de las posiciones -20 de los intrones (Di Leo *et al.*, 2004). De igual forma esta técnica permite el análisis de las secuencias promotoras y reguladoras de los genes.
- **Secuenciación del transcriptoma completo (WTSS, por sus siglas en inglés).** WTSS o RNA-seq a diferencia de WES y WGS se enfoca en el RNA y permite obtener de manera cuantificable un análisis de todo el transcriptoma completo en una célula eucariota. Permite el análisis de la expresión de genes, así como su regulación, actualmente es muy utilizada para evaluar efectos epigenéticos ya que permite el análisis de todo el transcriptoma en una sola célula (Wang *et al* 2009).

Todas estas herramientas han permitido a los investigadores encontrar variaciones en el genoma que llevan como consecuencia a un fenotipo clínico en particular.

#### **1.4.7. Análisis de NGS en Inmunodeficiencias Primarias.**

La gran cantidad de datos generados por NGS por lo regular debe seguir un proceso muy estructurado al estar gran cantidad de datos, en general se basa en un enfoque multiparamétrico dependiente del tipo de variación o variaciones, de la genética de poblaciones, del tipo de segregación que se buscan, es decir si el modelo es monogénico o poligénico y principalmente fundamentado en un claro fenotipo clínico. Las PID son causadas por errores genéticos en un modelo monogénico y con una segregación mendeliana. En general, las PID abarcan una amplia variedad de fenotipos clínicos que se pueden clasificar en los siguientes: Infección, autoinmunidad, autoinflamación, alergia y tumores.

#### **1.4.3. Procesamiento de archivos brutos de NGS.**

Al terminar la secuenciación del DNA se origina un archivo en formato BAM, éste archivo permite alinear la secuencia de la muestra con las secuencias de referencia para agilizar la búsqueda de cada variante. Posteriormente, se genera un archivo VCF el cual es más pequeño que los archivos BAM y que permite un análisis más simple de las variantes encontradas, en los archivos VCF se numeran las variaciones encontradas en la muestra con respecto a la secuencia de referencia y se reporta un QC (Quality Control, por sus siglas en inglés) que es una unidad de confianza que permite evaluar que tan cubierta esta esa región. El QC no se puede modificar y depende de la calidad del kit que se use durante la secuenciación, sin embargo, para un análisis correcto se deben de filtrar las variantes que cuenten con un QC alto para discriminar entre un error en el procesamiento y una variante verdadera (Meyts *et al.* 2016).

#### **1.4.7. Filtro y selección de variantes.**

Una técnica de WES puede generar alrededor de 20,000 a 50,000 variantes de buena calidad, es decir con un QC alto. El filtro y la selección de las variantes depende de varios factores:

- **Genética de poblaciones:** Se evalúa la frecuencia del alelo de la(s) variante (s). Existen múltiples bases de datos que permiten verificar la frecuencia de cada alelo, por ejemplo: 1000 genomes, ExAC data base, Human Gene Mutation Data Base. Si la frecuencia del alelo es mayor al 1% se considera una variante común, debajo de esta frecuencia se consideran variaciones raras y si la frecuencia es cero son consideradas variantes privadas.
- **Predicciones *In silico*.** Las consecuencias de una variante pueden ser rápidamente evaluadas por herramientas *In silico*, variaciones sin sentido (nonsense), en el sitio esencial de empalme, deleciones o inserciones con o sin corrimiento en el marco de lectura, todas ellas en su mayoría tienen un efecto deletéreo a nivel de proteína. Por otro lado, las variaciones con pérdida de sentido (missense) son las más comunes después de las variaciones silenciosas y por lo regular son difíciles de concluir si una variante es deletérea o no por el simple cambio de un aminoácido. Existen varias bases de datos que analizan el potencial impacto que una variación puede representar, por ejemplo: Sortig Intolerant from Tolerant (SIFT), Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen 2) y Combined annotation-dependent depletion (CADD score), este último, es altamente utilizado ya que se enfoca en la conservación de cada residuo. Sin embargo, un CADD score elevado no siempre se asocia a una variación deletérea por lo que se debe tener de referencia el MSC (Mutation Significance Cutoff) que depende de cada gen y se basa en la conservación entre especies, la regulación y transcripción del gen (Meyts *et al.* 2016).

#### 1.4.7. Variantes causantes de una enfermedad.

Una vez encontradas las variantes con un potencial impacto a nivel de proteína se debe considerar tres criterios para encontrar causalidad.

- El gen debe codificar a una proteína que interactúa en una vía o proceso asociado al fenotipo. Yuval Itan desarrolló una herramienta llamada Human Connectome Server la cual describe la distancia biológica entre una proteína y otra, esta herramienta es capaz de asociar un gen candidato con otro gen permitiendo relacionar las funciones y clasificarlas entre más cercanas a una vía o proceso en particular (Itan et al., 2013).
- El patrón de expresión del gen en células específicas, tejidos u órganos. Existen bases de datos públicas Ej. [www.genecards.com](http://www.genecards.com) con información obtenida a partir de la secuenciación RNA-Seq en varios tipos celulares. En el área de PID, la expresión es del gen debe encontrarse en las células involucradas en el fenotipo clínico o en los sitios anatómicos característicos de la enfermedad (Figura 3).



Figura 5. Patrón de expresión tejido específico en distintas bases de datos, [www.genecards.com](http://www.genecards.com).

- Las características del gen basado en la genética de poblaciones, es decir se debe conocer cómo se comporta el gen en cuanto a presión evolutiva, si tiene un comportamiento autosómico dominante o recesivo. Por ejemplo, las variaciones heterocigotas en genes del sistema inmune innato son purificadas evolutivamente con mucha más presión si se compara con variaciones deletéreas en otros genes que no se relacionan con la inmunidad. El GDI (Gene Damage Index) es una unidad que correlaciona la presión evolutiva de cada gen, la complejidad de la

proteína, la longitud de la región codificante y el número de parálogos que presenta. En general una variante benigna con un GDI alto se espera que no tenga consecuencia en el fenotipo ya que la mutación no se predice deletérea y porque el gen no tiene alta presión evolutiva, por el contrario si una variación presenta un CADD score elevado y un GDI bajo se esperaría tener un impacto elevado en el fenotipo (Quintana-Murci & Clark, 2013).

- Generar una hipótesis genética basado en el modo de herencia, la penetrancia clínica y la heterogeneidad genética. Por ejemplo, si existe consanguineidad en la familia, la hipótesis genética sugiere que el modelo de segregación es del tipo autosómico recesivo (AR) o bien una heterocigosis compuesta. Por otro lado, si no hay consanguineidad se debe considerar un modelo autosómico dominante (AD) o un modelo ligado al X.

En conjunto, la selección de variantes que potencialmente confieren una enfermedad debe ser priorizado en base al conocimiento del gen, el fenotipo clínico y fenotipo celular, la prevalencia en la población en general, su distribución étnica asociada con la segregación familiar y el grado de consanguineidad. Una vez seleccionada una variante como una hipótesis genética se debe confirmar experimentalmente (Meyts *et al.* 2016).

#### **1.4.7. Confirmación de hipótesis genética.**

La validación de lo encontrado por la NGS con el fenotipo clínico es un punto crucial. En el campo de las PID existen guías para la correcta validación de los genes candidatos (Casanova, Conley, Seligman, Abel, & Notarangelo, 2014). La validación experimental debe probar que la variante o 2 variantes (en casos de heterocigosis compuesta), afecta o altera la expresión y/o la función del producto del gen. El primer paso consiste en evaluar si la variante afecta la expresión de la proteína, en la mayoría de los casos un sistema de sobreexpresión puede arrojar una respuesta clara a esta interrogante. En general, estos sistemas permiten la evaluación del alelo mutado (insertado por un plásmido) en una célula eucariota e indica si el gen puede ser traducido hasta proteína

de manera normal o no y en caso de resultar anormal observar las características que ha causado la variación. Sin embargo, aunque el sistema de sobreexpresión es ampliamente utilizado existen variantes que no pueden ser analizadas en estos sistemas en casos en donde las variaciones se encuentran fuera de la región codificante o bien cuando las variantes se asocian a genes que son RNAs no codificantes. Una vez analizado el alelo, se evalúa su efecto en alguna célula primaria relevante en el paciente (en caso de contar con ella), en algunos casos las células importantes para evaluar el alelo son poco accesibles o muy escasas como en casos como neuronas o células epiteliales de pulmón (Ciancanelli et al., 2015) se procede al uso del sistema iPSC (Inducible Pluripotent Stem Cells) que consiste en reprogramar células del paciente comúnmente fibroblastos primarios o células CD34+ en células pluripotenciales para después diferenciarlas *In vitro* a células relevantes para el estudio de la variante a probar. Posteriormente, para corroborar que la variación es la consecuencia del fenotipo celular, se debe evaluar al menos un ensayo funcional en donde los resultados pueden ser la pérdida de función o una ganancia de función. Finalmente, para confirmar que la variante es causante de enfermedad se debe realizar un rescate genético, este tipo de experimento es la clave para probar que solo esa mutación es la responsable de todo el fenotipo celular. Existen varios métodos para realizar un rescate genético, estos dependen de las células en donde se realice el ensayo funcional y pueden ser, por ejemplo, transfecciones, transducciones y recientemente se comienza a utilizar la edición de genes con tecnologías como el CRISPR/Cas9 la cual permite la corrección única de la variante estudiada sin alterar la regulación en la expresión del gen y mantener el resto del genoma intacto.

Con la gran cantidad de datos obtenidos en NGS es necesario seguir todas las guías de procedimiento de manera rigurosa y estructurada, así como apoyarse del fenotipo clínico y la hipótesis genética para evitar falsos positivos (Meyts, Bosch, Bolze, Boisson, Itan, Belkadi, Pedergnana, Moens, Picard, Cobat, et al., 2016).

### **1.2.8. Inmunodeficiencias como modelo de estudio.**

Durante décadas se han reportado y descrito las características clínicas de las PID. Sin embargo, con el uso de nuevas tecnologías como la NGS y la secuenciación completa del genoma humano se ha podido descubrir y describir nuevas etiologías genéticas que confieren un fenotipo clínico de susceptibilidad a infecciones.

Existen muchos grupos de investigación que intentan describir la conexión entre el fenotipo y genotipo en pacientes con inmunodeficiencias. Las inmunodeficiencias pueden ser consideradas como experimentos de la naturaleza que nos permiten a través de un modelo genético poder caracterizar las deficiencias que tiene el sistema inmune de cada paciente y describir las causas moleculares que confieren la susceptibilidad.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades infecciosas han sido la principal causa de muerte en la humanidad, la teoría genética de las infecciones ha sido apoyada por estudios recientes concluyendo que un defecto congénito confiere susceptibilidad a las infecciones. Sin embargo, aún hay un gran número de pacientes que sufren infecciones recurrentes a los cuales no se les ha asociado un defecto genético, sugiriendo que la respuesta inmune es muy heterogénea entre individuos. En la actualidad existen tecnologías que permiten el análisis de gran número de genes y son una herramienta rápida y eficaz para detectar mutaciones en pacientes. Estudios como la secuenciación del genoma o el exoma completo favorecerían el diagnóstico oportuno, tratamiento específico, y un adecuado seguimiento epidemiológico.

### 3. HIPÓTESIS

Con el uso de secuenciación de nueva generación se encontrarán nuevas etiologías genéticas asociadas a enfermedades infecciosas.

## 4. OBJETIVO GENERAL

Describir nuevas etiologías genéticas causantes de defectos en el estallido respiratorio utilizando la secuenciación de nueva generación.

### 4.1. Objetivos particulares

- Analizar el exoma completo de pacientes con susceptibilidad a infecciones que no presenten etiologías genéticas previamente reportadas y con defectos en el estallido respiratorio.
- Evaluar y caracterizar mutaciones nuevas que confieran el fenotipo clínico de susceptibilidad a infecciones y defectos en el estallido respiratorio.
  - Evaluar las variantes alélicas en sistema de sobreexpresión.
  - Evaluar en células primarias el fenotipo celular de paciente y controles sanos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material biológico.

- Sangre periférica de pacientes con fenotipo clínico de infecciones recurrentes
- Línea celular EBV-B de pacientes y controles sanos
- Línea celular HEK-293

### 5.2. Reclutamiento de pacientes y aspectos éticos.

Los pacientes (P1 y P2) fueron referidos al Hospital Necker en París, los experimentos realizados con las células de los pacientes fueron realizados en el Laboratorio de genética humana de las enfermedades infecciosas en el instituto Imagine en París. La historia clínica y material biológico fue obtenido una vez firmado el consentimiento informado de los pacientes y familiares y siguiendo todas las normas éticas de las instituciones locales, nacionales e internacionales siguiendo los protocolos de Helsinki firmados en 1962.

P1, es un paciente varón de 19 años de padres consanguíneos de origen hindú, presentó infecciones recurrentes por *Staphylococcus epidermidis* en piel, desarrolló adenitis a la edad de 12 años, los hemogramas mostraron un nivel normal de leucocitos,

P2, es una niña de 4 años de padres consanguíneos de origen pakistaní, presentó neumonitis con infecciones recurrentes en pulmón, la histología en biopsia de pulmón muestra un infiltrado de eosinófilos. El paciente desarrolló interferonopatía y no se logró aislar ningún microorganismo en esputo y lavado bronquial.

Ambos pacientes mostraron defectos en el ensayo de estallido respiratorio sugiriendo diagnóstico de enfermedad Granulomatosa Crónica. Estudios genéticos se realizaron en genes como *CYBB*, *CYBA* y *NCF1* para buscar diagnóstico de EGC, pero los resultados fueron negativos.

Los pacientes P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24 fueron reclutados de diferentes instituciones a nivel mundial. En el Apéndice 1 se describe el origen étnico, la edad y las características clínica de cada paciente. Para todos los pacientes el material biológico fue obtenido una vez

firmado el consentimiento informado de los pacientes y familiares y siguiendo todas las normas éticas de las instituciones locales, nacionales e internacionales siguiendo los protocolos de Helsinki firmados en 1962.

### **5.3. Procesamiento de muestras sanguíneas.**

Se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes P1 y P2, de familiares y sangre de donadores sanos. A partir de sangre heparinizada, se recolectaron 300µL de sangre periférica en tubos eppendorf de 1.5 mL para extracción de DNA genómico utilizando el sistema automatizado lprep (Invitrogen, California, Estados Unidos de América). Por otra parte, se centrifugó la sangre heparinizada a 250g durante 5 min y se recolectó el plasma. Se procedió a realizar la separación de células mononucleares por el método de Ficoll-Hypaque en donde, se diluyó la sangre en 35mL volumen final con PBS 1X y se agregó a 15 mL de Ficoll-Hypaque de manera cuidadosa formando un gradiente de densidad en un tubo de 50 mL, finalmente se centrifugo a 363g durante 20 minutos. Una vez realizada la centrifugación se recolectó la banda media en donde se encontraban las células mononucleares, se cuantificaron y se crio-preservaron en Suero Fetal Bovino) (SFB) (Invitrogen) con 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos de América).

### **5.4. Generación de líneas celulares EBV-B.**

El procedimiento de inmortalización con virus Epstein Baar (EBV) se realizó como se reporta en (Bustamante et al., 2011). Brevemente, células mononucleares frescas o crio-preservadas se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen) con 20% de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen) fueron infectadas con 3mL de medio con virus EBV, se incubaron a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas se adicionó ciclosporina al medio y se mantuvo a una densidad de 4x10<sup>5</sup> a 1x10<sup>6</sup> hasta su uso (Bustamante *et al* 2011).

### **5.5. NGS y análisis genético.**

El DNA genómico de los pacientes (5µg) fue extraído a partir de sangre periférica, fue fragmentado por ultra sonicación (Covaris, Massachusetts, Estados Unidos de América). Se preparó una librería de exoma utilizando el kit SureSelect Human All Exon Kit (Agilent Technologies, California, Estados Unidos de América) y se procedió a la amplificación y secuenciación siguiendo los parámetros del secuenciador Illumina HiSeq 2000 (Illumina, California, Estados Unidos de América), generando fragmentos de 100pb que fueron alineados para crear un archivo BAM. Posteriormente, se obtuvo el archivo VCF el cual es cargado a la base Polyweb de la Universidad Paris Descartes o al servidor del laboratorio Human Genetic of Infectious Diseases en Nueva York.

El análisis genético utilizado fue en búsqueda de una variación AR debido al grado de consanguineidad, por lo que se buscaron mutaciones homocigotas con una frecuencia alélica menor al 1%.

A partir de este primer filtrado se realizó la predicción *In silico* para las variantes en base al CADD score utilizando el servidor:

<http://pec630.rockefeller.edu:8080/MSC/>.

Finalmente, las variantes fueron seleccionadas en orden de prioridad basado en su proximidad a los genes asociados al estallido respiratorio utilizando la herramienta The Human Connectome Server <http://hgc.rockefeller.edu/>. Se utilizó como “core genes” los genes *NCF1*, *NCF2*, *NCF4*, *CYBB* y *CYBA*.

## 5.6. Secuenciación por Sanger

De los genes seleccionados como posibles causantes de la enfermedad se confirmó el resultado de NGS por el método de Sanger. Se diseñaron iniciadores que cubrieran los sitios en donde se encuentra la variación. En P1 se utilizaron iniciadores flanqueando el exón 14 de *SLCA11*, gen que codifica para la proteína NRAMP1. Para P2 se realizó la confirmación en el Exón 1 abarcando los sitios de splicing de *NCF4* que codifica para la proteína p40<sup>phox</sup>. Se realizó una PCR de cada juego de iniciadores utilizando Taq polimerasa (Invitrogen). Se reveló el producto de PCR en geles de agarosa al 1%. Una vez validada la PCR se purificó el producto de PCR en Sephadex (GE health care, Chicago, Estados Unidos de América). Posteriormente, se realizó una reacción de

secuenciación adicionando el producto purificado, iniciador y Bigdye (Life Technologies, California, Estados Unidos de América). El producto de la reacción se purificó por segunda vez y se colocó en el Secuenciador 3500XL Genetic Analyzer, (Applied Biosystem, California, Estados Unidos de América).

Finalmente, se recolectaron los datos y se hizo un alineamiento con la secuencia de referencia NM\_013416.3 del NCBI data bank, utilizando el software GenanalysWin3 y Snapgene. Una vez confirmada la mutación en el paciente, se procedió a realizar la segregación familiar.

### **5.7. Ensayo de Dihidrorodamina (DHR)**

El ensayo de DHR se realizó con muestras de sangre en heparina en un periodo de tiempo no mayor a 48h después de la obtención de la muestra. Se colectó 1mL de sangre total y se lisaron los glóbulos rojos con buffer de Cloruro de Amonio al 1X durante 5 o 10 min. Una vez finalizado el tiempo se lavaron las células con PBS (Invitrogen) hasta obtener un botón celular blanco. Se resuspendió el paquete celular en 1mL de PBS y se distribuyó 250µl de células en 4 tubos para citometría. Se colocó 150µl de DHR a 5µg/mL (Sigma-Aldrich) y se incubó a 37°C por 5 min. Posteriormente, se estimuló con Forbol Miristato acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) a 400ng/mL y se incubó por 10 min. Finalmente, se adquirió en el citómetro Gallios (Beckman-Coulter) seleccionando la población de neutrófilos y monocitos y se detecta la fluorescencia por los canales y FL2.

### **5.8. Expresión de los transcritos por qRT-PCR.**

A partir de polimorfonucleares o líneas celulares se realizó extracción de RNA utilizando el kit MicroRNA easy (Quiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se determinó la concentración de RNA y se procedió a realizar reacción de retrotranscripción utilizando SuperScript II (Invitrogen) para obtener una concentración final de 100ng/µL de cDNA. Finalmente, se evaluó la expresión de los genes de interés: *SLC11A1* (Hs00184453\_m1), *NCF4* (Hs00241129\_m1) y *GUS* (Hs99999908\_m1) utilizando el sistema TaqMan (Applied Biosystem) en donde, se colocó 75ng de cDNA junto con la sonda del gen

específico y el buffer MasterMix (Applied Biosystem). Se procedió a realizar la reacción de PCR en las condiciones recomendadas para el sistema TaqMan. Una vez obtenidos los datos se analizó la expresión relativa de los genes utilizando el gen constitutivo de la beta- glucuronidasa *GUS* para normalizar como gen constitutivo.

### **5.9. Mutagénesis.**

A partir del plásmido pCMV6-DDK con el ORF de *SLC11A1* (Origene, Maryland, Estados Unidos de América) se clonó en *E. coli* Topten (Invitrogen) y realizó una Maxiprep (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez que se obtuvo y purificó el plásmido, se procedió a realizar las mutagénesis dirigidas para las variantes V484M, V484I y V484Q, para esto se realizó una PCR con polimerasa Pfu (Agilent Technologies, California, Estados Unidos de América) siguiendo las condiciones del inserto. Posteriormente, se clonó el producto en *E. coli* Topten (Invitrogen) para realizar miniprep (QIAGEN). Una vez obtenidos los plásmidos *SLC11A1* (WT, V484M, V484I y V484Q) se secuenció utilizando los iniciadores del vector T6 y BGH, así como con iniciadores internos para cubrir todo el ORF de *SLC11A1* y asegurarse que el plásmido solo presenta la variación deseada. Finalmente, se realizó una Maxiprep de los plásmidos con la secuencia deseada y se almacenaron para ensayos de sobreexpresión.

### **5.10. Sistema de sobreexpresión.**

Se cultivaron células HEK-293  $1 \times 10^6$  en placas Petri en RPMI (Invitrogen) con 10% SFB (Invitrogen) durante 24h, posteriormente se agregó 500 $\mu$ L de una mezcla con lipofectamina (Invitrogen) y plásmido en distintas condiciones: Vector vacío, V484M, V484I, V484Q y se dejó una condición con células sin transfectar. Se dejó la transfección por 24h. Posteriormente, se colectaron las células en PBS y se procedió a una lisis celular con buffer 50 $\mu$ L de IPB casero (con un cóctel de inhibidores de proteasas (PMSF, Chymostatin, ABESF y Leupeptina) (Sigma-Aldrich) durante 30 min en hielo, posteriormente se procedió a centrifugar durante 5min a 15,000 rpm y se recolectó el sobrenadante. El extracto proteico se almacenó a -80°C hasta su uso.

### 5.11. Western-Blot

Para p40<sup>phox</sup> y NRAMP1 se siguió el mismo procedimiento de WB. Brevemente, una vez obtenido el extracto se cuantificó la concentración de proteína utilizando el método de Bradford (Biorad, California, Estados Unidos de América). En geles de poliacrilamida SDS al 10% (Biorad) se cargó 30µg de proteína en Laemmli buffer (Biorad). Se corrió el gel en solución amortiguadora de Tris-Glicina (1X) (Biorad) a 35mA constantes durante 1.5h. Posteriormente, se realizó la transferencia en membranas de nitrocelulosa 0.2µm (Biorad) utilizando el sistema TransTurbo (Biorad). Se bloqueó la membrana por 2h con solución amortiguadora de Tris-Base (Sigma-Aldrich) suplementado con 0.01% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) (TBST) y 5% de leche descremada a temperatura ambiente. Se colocó el anticuerpo primario; Anti-p40<sup>phox</sup> (Merck, Nueva Jersey, Estados Unidos de América) o anti-NRAMP1 (R&D, Minneapolis, Estados Unidos de América) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron tres veces las membranas con TBST y se colocó el anticuerpo secundario Anti-IgG-rabbit-HRP (Biorad) diluido en TBST y 3% de albumina Sérica Bovina 1h. Finalmente, el WB fue revelado en el equipo ChemiDoc (Biorad) utilizando Clarity Western ECL (Biorad).

### 5.12. Tinción intracelular de subunidades de la NADPH oxidasa.

Se cultivaron líneas celulares EBV-B de los pacientes y controles sanos en placas de 96 pozos con fondo "v". Se lavaron las células con PBS y se incubaron 10min a 37°C con Aqua (Invitrogen) como marcador de viabilidad. Posteriormente, se lavaron de nuevo con PBS y se procedió al marcaje extracelular, en caso de neutrófilos con anti-CD15 APC (551376, Beckton-Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos de América) y se incubó durante 30min a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizó la fijación y permeabilización utilizando FixPerm (eBioscience, California, Estados Unidos de América) durante 20min, una vez permeabilizadas las células se procedió a la tinción intracelular con anticuerpos anti-gp91<sup>phox</sup>, anti-p22<sup>phox</sup>, anti-p47<sup>phox</sup> (Santa Cruz, California, Estados Unidos de América) y p67<sup>phox</sup> (Merck) durante 30min a temperatura

ambiente en oscuridad. Finalmente, se procedió a agregar el anticuerpo secundario anti-IgG mouse marcado en Alexa488 (Invitrogen) y se analizaron las células en un citómetro de flujo Galios (Beckman Coulter).

### **5.13. Ensayo de detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

La detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó utilizando el sistema AmplexRed (Invitrogen) en donde 30,000 células EBV-B fueron purificadas y resuspendidas en buffer Krebs con pH de 7.4 y se adicionó una mezcla con el compuesto AmplexRed y HRP con o sin PMA (Sigma-Aldrich) a 400ng/mL y se realiza una cinética, midiendo cada 10 minutos a una absorbancia de 535nm en el espectrofotómetro Victor™ (Invitrogen) a 37°C durante 2 horas. Una vez obtenidos los datos se cuantificó la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen).

### **5.14. Ensayo de detección de O<sub>2</sub><sup>-</sup>**

La detección de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se realizó utilizando el sistema Superoxide (Sigma-Aldrich) en donde 30,000 células EBV-B purificadas se resuspendió en los medios de ensayo recomendados siguiendo el protocolo del fabricante, posteriormente se estimularon las células con o sin PMA (Sigma-Aldrich) a 400ng/mL. Se realizó una cinética, midiendo cada 10 minutos a una absorbancia de 535nm en el espectrofotómetro Victor™ (Invitrogen) a 37°C durante 2 horas. Una vez obtenidos los datos se cuantifica la cantidad de O<sub>2</sub><sup>-</sup> siguiendo las recomendaciones del fabricante (Sigma-Aldrich).

### **5.15. Diferenciación de macrófagos y células dendríticas derivadas de monocitos.**

Los macrófagos derivados de monocitos (MDMs) y las células dendríticas derivadas de monocitos (CDDMs) fueron diferenciados a partir de células mononucleares CD14+ obtenidas por selección positiva con perlas magnéticas (Miltenyi). Para los MDMs, 30,000 células CD14+ fueron colocadas por pozo en placas de 96 pozos, las células fueron

diferenciadas en medio RPMI (Invitrogen) condicionado con 10% de SFB (Invitrogen) y las citocinas MCS-F (R&D) a 50ng/mL concentración final. Al día siete de la diferenciación se adicionó al medio condicionado IL-4 (R&D) a 50ng/mL concentración final. Al día 13 de diferenciación se colocó el estímulo de PPD o IFN- $\gamma$  durante 16 horas. Finalmente, se evaluó el estallido respiratorio por el método de AmplexRed (Invitrogen) o se recolectaron las células para realizar Western-blot. Para las CDDMs,  $3 \times 10^6$  células CD14+ fueron colocadas en botellas de 10mm<sup>3</sup> en medio RPMI (Invitrogen) suplementado con 10% de SFB (Invitrogen), GMCS-F (R&D) concentración final 50ng/mL e IL-13 (R&D) A 20ng/mL concentración final. Al día 6 de diferenciación, las CDDMs se maduraron con LPS a 100ng/mL concentración final. Finalmente, se evaluó el estallido respiratorio por el método de AmplexRed (Invitrogen) o se recolectaron las células para realizar Western-blot.

#### **5.16. Retro-transducción viral.**

Para obtener células pluripotenciales inducidas se realizó la retro-transducción viral de acuerdo al protocolo publicado por (Martínez-Barricarte et al., 2016), Brevemente, se clonó la secuencia WT de p40<sup>phox</sup> en el de plásmido pLZRS-IRES- $\Delta$ NGFR, el plásmido codifica para el dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR o CD271). Posteriormente se transfectaron las células empacadoras de virus (células Phoenix) con 10 microgramos de plásmido utilizando el sistema X-tremeGENE9 (Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza) durante 48 horas, se cosecharon las células y se colocaron en botellas de 75cm<sup>2</sup> con medio IMDM (Invitrogen) + puromicina (Invivogen, California, EUA) hasta alcanzar confluencia (2 semanas). Una vez que las botellas estaban confluentes se procedió a evaluar la expresión extracelular de la proteína reportera del plásmido (CD271) por citometría de flujo, utilizando el anticuerpo anti-CD271 (Beckton-Dickinson). Cuando la eficiencia de transfección de las células Phoenix fue arriba del 90% se removió el medio con puromicina y se cultivó con medio IMDM (Invitrogen) fresco durante 24 horas para cosechar las partículas virales. Se obtiene todo el sobrenadante y se mezcla con X-Concentrator (Addgene, Massachusetts, EUA) y se incubó a 4°C durante 16 horas. Después de la incubación se centrifugó durante 30

minutos a 300g a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el concentrado viral se reconstituyó en 1.5mL de medio RPMI (Invitrogen) con 10% de SFB (Invitrogen). Se incubaron las células EBV-B con las partículas virales durante 24 horas. Posteriormente, se lavaron las células con PBS (Invitrogen) y se transfirieron a botellas de cultivo para su expansión. Una vez alcanzando confluencia, las EBV-B transducidas se seleccionaron por la expresión extracelular de CD271+ utilizando perlas magnéticas MACS (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania). Finalmente, se confirmó que el 100% de las células fueron transducidas con una tinción extracelular de CD271+. Una vez confirmada la transducción se procedió a realizar ensayos funcionales del estallido respiratorio.

## 6. RESULTADOS.

### 6.1. Pacientes deficientes en NRAMP1 y p40<sup>phox</sup> identificados por el análisis de NGS

Se realizó la secuenciación del exoma completo para P1 y P2 para buscar la causa genética del fenotipo de susceptibilidad a infecciones y posible defecto en el estallido respiratorio. P1 y P2 son pacientes con padres consanguíneos por lo que la filtración de variantes fue basada en un modelo autosómico recesivo. Después de la filtración, para P1 se encontraron 34 variantes raras y para P2 se encontraron 52 variantes (Tabla 1).

**Tabla 1. Variaciones homocigotas en P1 y P2 con frecuencia alélica menor al 1% de la población.**

<i>PROK1</i>	<i>AHRR</i>	<i>AC090616.2</i>	<i>GDI1</i>	<i>PICALM</i>
<i>IGSF3</i>	<i>SLC6A19</i>	<i>AHNAK2</i>	<i>GOLGA6L2</i>	<i>PLXNB3</i>
<i>THEM5</i>	<i>TCF19</i>	<i>ANKRD32</i>	<i>GOLGA6L6</i>	<i>POGK</i>
<i>DPAGT1</i>	<i>HLA-DQB2</i>	<i>ANKRD36</i>	<i>GOLGA8B</i>	<i>RABAC1</i>
<i>DNAH10</i>	<i>SYNE1</i>	<i>AQP12A</i>	<i>GPR98</i>	<i>RBMS1</i>
<i>HP</i>	<i>TIAM2</i>	<i>ATP1B2</i>	<i>HLA-A</i>	<i>RNA5-8SP6</i>
<i>CELF4</i>	<i>SLC22A2</i>	<i>BCAS1</i>	<i>HRNR</i>	<i>RNA5SP387</i>
<i>YJEFN3</i>	<i>NACAD</i>	<i>CCDC50</i>	<i>IGLV5-37</i>	<i>RNU1-61P</i>
<i>CRIM1</i>	<i>STS</i>	<i>CNOT6L</i>	<i>ITIH4</i>	<i>RNU2-64P</i>
<i>RPE</i>	<i>SHROOM2</i>	<i>COL13A1</i>	<i>JAG2</i>	<i>RP5-966M1.6</i>
<i>SLC11A1</i>	<i>MAP7D2</i>	<i>DCAF4</i>	<i>MIR3148</i>	<i>TMEM217</i>
<i>ZNF142</i>	<i>RPGR</i>	<i>DENND1B</i>	<i>MIR4756</i>	<i>TNXB</i>
<i>CCDC108</i>	<i>KDM5C</i>	<i>DGKD</i>	<i>MPHOSPH9</i>	<i>TP63</i>
<i>RNF24</i>	<i>RIBC1</i>	<i>DMBT1</i>	<i>MYH9</i>	<i>TREML2</i>
<i>KCNG1</i>	<i>MID2</i>	<i>DMWD</i>	<i>NCF4</i>	<i>TUBA8</i>
<i>SLC5A4</i>	<i>ZNF280C</i>	<i>FAM210B</i>	<i>OR6B3</i>	<i>VWF</i>
<i>TRAPPC11</i>	<i>PLXNA3</i>	<i>FAM83H-AS1</i>	<i>PHEX</i>	
		<i>FRG1</i>	<i>PI4KA</i>	

Una vez obtenidas las variantes raras, se evaluó *In silico* la cercanía de los genes mutados con los genes involucrados en la producción de ROS, genes que codifican para las subunidades del complejo NADPH oxidasa. Se realizó un análisis utilizando el Human Connectome Server para priorizar las variantes de acuerdo con su función biológica (Tabla 2)

Tabla 2. Principales genes con distancia biológica cercana a genes involucrados en el estallido respiratorio de P1 y P2

		Genes involucrados en el estallido respiratorio			
Variantes homocigotas de P1	RANK	CYBB	NCF1	CYBA	NCF2
	1	TIAM2	SLC11A1	TIAM2	TIAM2
	2	SLC11A1	TIAM2	NACAD	SLC11A1
	3	CRIM1	PROK1	ZNF280C	PROK1
	4	DPAGT1	CRIM1	PROK1	CRIM1
	5	ZNF280C	HP	MAP7D2	DPAGT1
	6	PROK1	KCNG1	RPE	HP
	7	HP	SYNE1	TRAPPC11	SLC5A4
	8	SLC5A4	DPAGT1	ZNF142	SYNE1
	9	SYNE1	RNF24	DPAGT1	KCNG1
	10	MAP7D2	SLC5A4	HP	PLXNA3
		Genes involucrados en el estallido respiratorio			
Variantes homocigotas de P2	RANK	CYBB	NCF1	CYBA	NCF2
	1	NCF4	NCF4	NCF4	NCF4
	2	MYH9	GOLGA6L2	JAG2	MYH9
	3	GOLGA6L2	ITIH4	CCDC50	GOLGA6L2
	4	ITIH4	VWF	TP63	ITIH4
	5	JAG2	MYH9	POGK	RABAC1
	6	VWF	TP63	CNOT6L	GDI1
	7	RABAC1	COL13A1	COL13A1	CNOT6L
	8	GDI1	DCAF4	MYH9	COL13A1
	9	TP63	JAG2	OR6B3	JAG2
	10	CCDC50	OR6B3	PI4KA	OR6B3

Para P1 se encontraron dos genes candidatos basado en la distancia biológica: *TIAM2* que codifica para una proteína tipo Rho, asociada al desarrollo de linfoma y *SLC11A* que codifica para la proteína NRAMP1. Por otro lado, en P2 se encontró una variación no reportada en el gen *NCF4* lo cual lo coloca como el único gen candidato ya que existe un paciente reportado con mutaciones heterocigotas compuestas en este gen con defectos en el estallido respiratorio (Matute et al., 2009a).

Para P1 se procedió a evaluar las variantes en *TIAM2* y en *SLC11A1* en términos de genética de poblaciones, impacto de la mutación y presión evolutiva (Tabla 3)

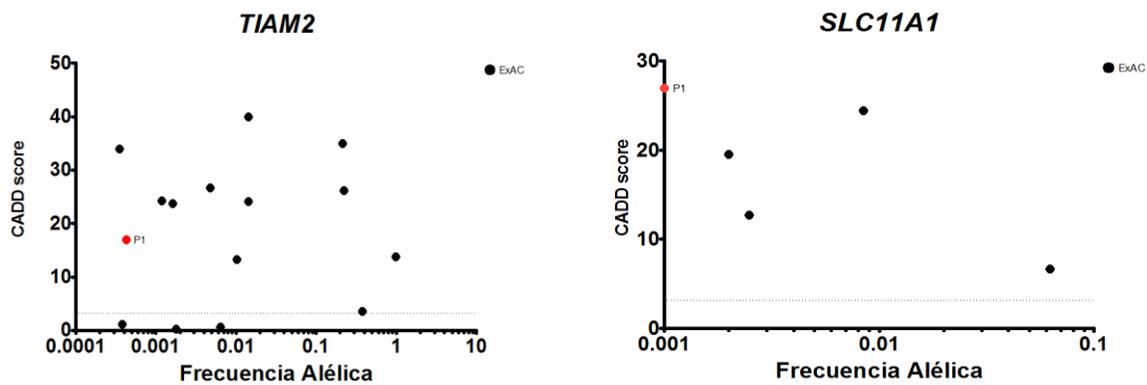
**Tabla 3. Compilación de la predicción *in silico* de tres bases de datos y el GDI de cada gen.**

Gen	Cromosoma	Posición	Alelo de referencia	Alelo alternativo	Impacto predicho por CADD	Predicción Polyphen2-MS	Impacto predicho por MSC-SIFT	GDI
<i>SLC11A1</i>	2	219259416	G	A	Alto	Alto	Alto	4.14
<i>TIAM2</i>	6	155575572	A	G	Alto	Bajo	Alto	15.12

\*MSC: Mutation Significance Cutoff

GID: Gene damage index

Para P1, las predicciones *In silico* predicen que el impacto de estas mutaciones es alto. Sin embargo, para seleccionar al gen candidato se realizó un enfoque basado en el CADD score y por genética de poblaciones. Se buscaron en la base de datos pública Exome aggregation consortium (ExAC) todas las mutaciones homocigotas y la frecuencia alélica (Figura 4). En *TIAM2* se observa que en la población existe un gran número de individuos

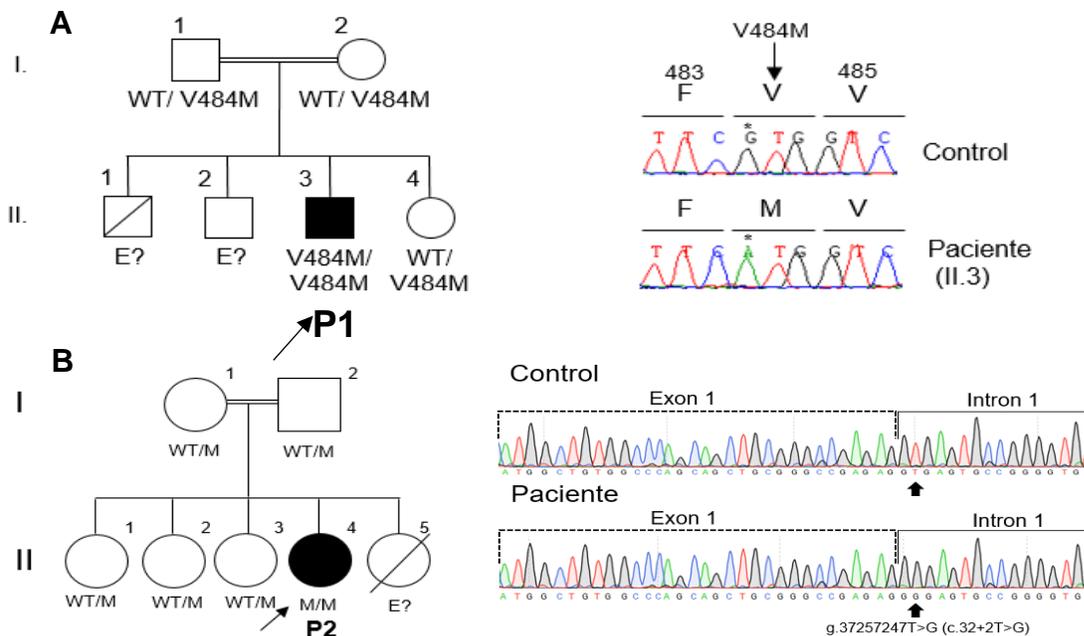


**Figura 6. Genética de poblaciones de las variantes en P1.** Predicción deletérea *In silico* de las variantes homocigotas encontradas en ExAC y la frecuencia alélica.

con variantes homocigotas y con un alto impacto en CADD score, además el GDI de este gen es de 15.12 lo cual indica que el gen no se encuentra sujeto a una fuerte presión evolutiva. Por otro lado, en *SLC11A1* solo se encontraron 4 variaciones homocigotas con alto CADD score y el GDI es de 4.14, estos datos sugieren que la variante candidata que confiere el fenotipo clínico es *SLC11A1* para P1.

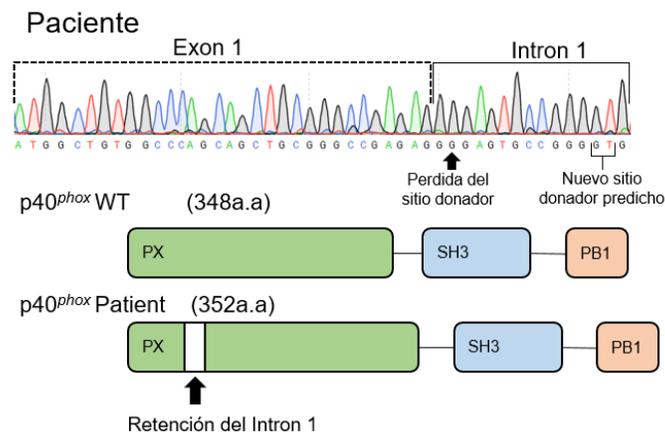
Una vez seleccionados los genes candidatos causantes de la enfermedad para P1 (*SLC11A1*, NM000578.3) y P2 (*NCF4*, NM\_013416.3). La localización de la mutación en el P1 se encuentra en la zona media del exón 14 de *SLC11A1*, se confirmó que el paciente presenta una variación homocigota en la posición genómica 219259416 en el cromosoma 2 con un cambio de una guanina por una adenina generando como consecuencia a un cambio de aminoácido entre una valina por una metionina en la posición 484 (p.V484M) (Figura 5-A). Asimismo, se encontró que en los padres la mutación se encuentra en estado heterocigoto, por lo que el gen tiene una segregación AR.

P2, presenta una variación homocigota en el intrón 1 del gen *NCF4* en el cromosoma 22, en la posición c.30+2T>G con un cambio entre una timina por una guanina (Figura 5-B), la mutación se localiza en el sitio esencial de empalme por lo que se requirió de un análisis *In silico* en bases de datos especializadas. La variación se encuentra en estado homocigoto en el único miembro de la familia, mientras que en los familiares se encuentra en estado heterocigoto por lo que gen tiene una segregación AR con una aparente penetrancia completa.



**Figura 7. Segregación familiar y secuenciación por Sanger de P1 y P2.** A) P1 presenta la mutación homocigota V484M en un modelo de herencia AR; B) P2 presenta la variación homocigota c.32+2T>G en un modelo de herencia AR con penetrancia completa.

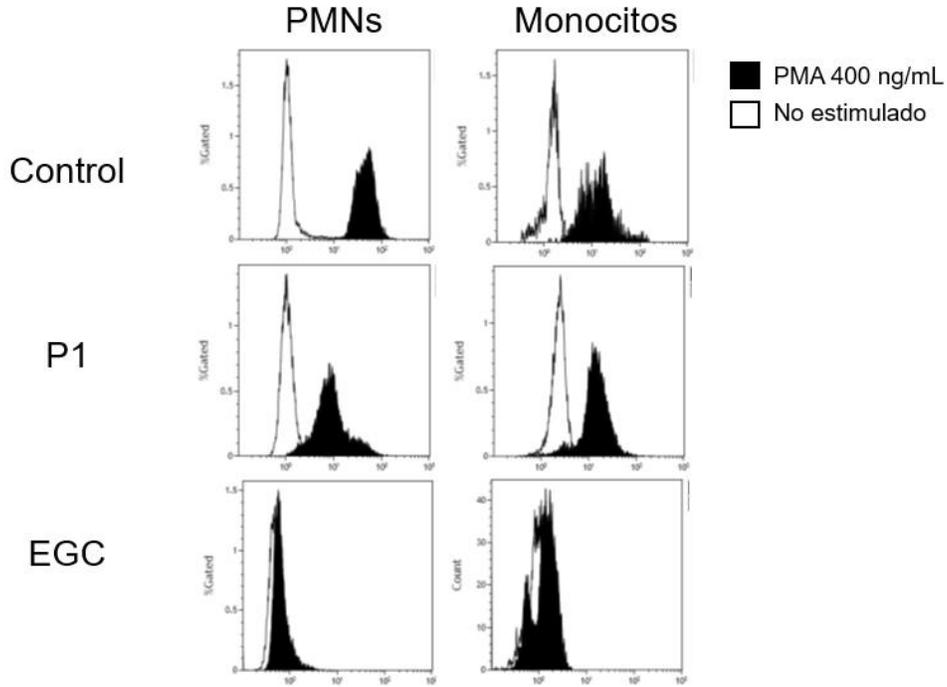
De acuerdo con predicciones *In silico*, la variación en P2 tiene como consecuencia la pérdida del sitio donante en el procesamiento de splicing por lo que se espera una inserción de 12 pares de bases generando una proteína más grande con 4 aminoácidos adicionales de acuerdo con la base de datos Human Splicing Finder (Figura 6).



**Figura 8. Predicciones *In silico* de la mutación en P2.** Esquematación del impacto de la mutación c.32+2T>C causando una retención del Intrón 1 y el corrimiento en el marco de lectura.

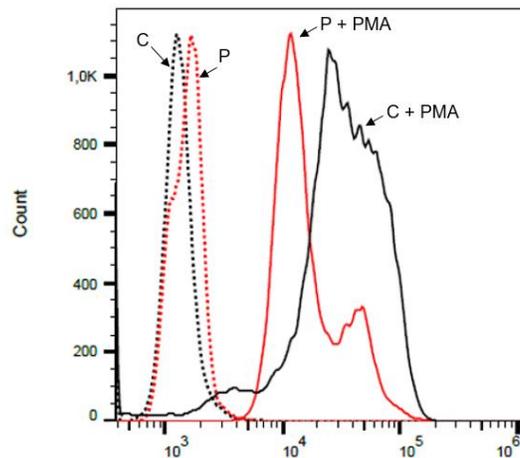
## 6.2. Defecto en el estallido respiratorio en las células de los pacientes.

Para comprobar que las mutaciones en P1 y P2 tienen un impacto en el funcionamiento del complejo NADPH oxidasa basado en las predicciones *In silico*. Se realizó un ensayo de DHR a partir de sangre total de los pacientes. En P1 se encontró que el estallido está afectado en neutrófilos o polimorfonucleares (PMNs) mientras que la población de monocitos parece que tiene una respuesta similar a los controles sanos ante la estimulación con PMA a 400ng/mL. (Figura 7).



**Figura 9. Ensayo de DHR en células de P1.** Evaluación del estallido respiratorio ante la estimulación con PMA (400ng/mL) en PMN y monocitos de controles sanos, P1 y células de pacientes con EGC clásica.

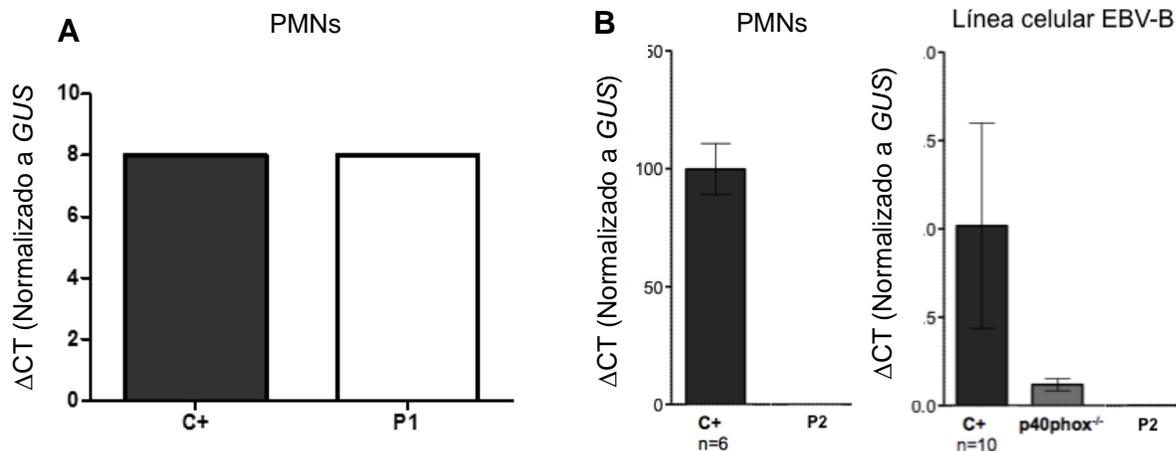
En P2 se realizó el ensayo de DHR obteniéndose aparentemente actividad normal en el estallido respiratorio. Sin embargo, al hacer un análisis por histogramas sobreponiendo las respuestas entre los neutrófilos de P2 y controles sanos. Se observa que las células del paciente tienen afectado el estallido respiratorio, pero no es abolido (Figura 8).



**Figura 10. Ensayo de DHR** Sobreposición del estallido estimulación con PMA (400ng/mL) en PMN de controles sanos (Negro) y P1 (rojo). **en PMN de P2. respiratorio ante la**

### 6.3. Mutación p.V484M en *SLC11A1* no tiene impacto a nivel de RNA mientras que mutación en el sitio de empalme en *NCF4* es deletérea.

Se evaluó la expresión de los genes *SLC11A1* en neutrófilos de P1 y *NCF4* en neutrófilos y línea celular EBV-B de P2. En donde, se encontró que para P1 los niveles de expresión de *SLC11A1* se encuentran a niveles similares comparados a los de controles sanos (Figura 9-A.). En P2 se observa que la expresión de *NCF4* en neutrófilos y líneas celulares EBV-B se observó una ausencia total de la transcripción de *NCF4* en P2 (Figura 9-B). Con el propósito de corroborar esta ausencia se procedió a realizar una nueva qPCR con una sonda que reconoce un sitio diferente y se obtuvieron los mismos resultados (datos no mostrados).

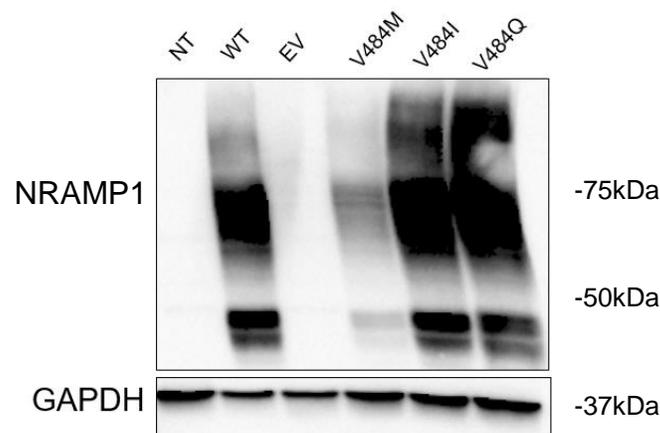


**Figura 11. Niveles de transcripción de *SLC11A1* en P1 y *NCF4* en P2.** A) RNA de neutrófilos de P1 y de controles sanos fue evaluado por qPCR para obtener los niveles de expresión de *SLC11A1*, utilizando GUS como gen constitutivo. B) RNA de neutrófilos de P2 y controles sanos (n=6) y línea celular EBV-B de P2, del primer paciente con deficiencia p40<sup>phox</sup> (p40<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>) y controles sanos (n=10).

### 6.4. Mutación p.V484M en *NRAMP1* afecta la expresión de la proteína mientras que la mutación en c.32+2T>C causa la pérdida completa de la expresión de p40<sup>phox</sup>.

La variación presente en P1 se encuentra en la región codificante por lo que es factible el uso del sistema de sobreexpresión para evaluar si el alelo tiene consecuencias en la

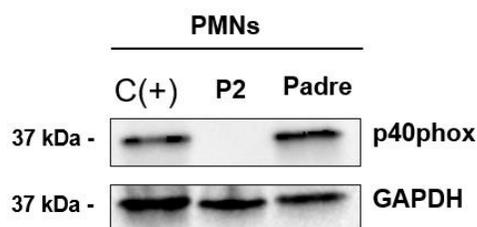
expresión de la proteína. Por lo que se construyeron plásmidos pCMV6 con la secuencia del gen *SLC11A1* Wild Type (WT) y la secuencia mutada de P1. Posteriormente se transfectó células HEK293 con el plásmido WT, el plásmido con la variante V484M y el vector vacío (EV). Se realizó un western-blot para evaluar la expresión de la proteína utilizando una secuencia reportera DDK colocada en el carboxilo terminal de NRAMP1. Se encontró que la proteína con variación en V484M tiene una considerable disminución en la expresión de la proteína (Figura 10). Adicionalmente, se realizaron mutagénesis generando plásmidos con distintas variantes en la misma posición 484, esto para comprobar si la mutación V484M es la responsable de la disminución de la expresión de la proteína. Se encontró por western-blot la expresión de la proteína a la altura de 70kDa con un barrido, particular en las proteínas altamente glicosiladas. Las células transfectadas con NRAMP1 V484M, presentaron el mismo patrón de barrido que NRAMP1 WT. Sin embargo, la expresión total de la proteína NRAMP1 V484M se observa disminuida en comparación de NRAMP WT, NRAMP1 V484I y NRAMP1 V484Q (Figura 10).



**Figura 12. Western-blot de NRAMP1 en un sistema de sobreexpresión en células HEK-293.** Western-blot de extractos proteicos totales fueron obtenidos de células HEK293 sin transfectar (NT), transfectadas con NRAMP1 WT, V484M, V484I y V484Q. Expresión de NRAMP1 fue determinada con el péptido reportero DDK.

Por otro lado, P2 tiene una mutación el sitio de empalme del Intrón 1 en *NCF4*, se observó que esta mutación afecta completamente la transcripción de *NCF4*. Por lo tanto, se evaluó la expresión de la proteína p40<sup>phox</sup> en neutrófilos del paciente utilizando un anticuerpo anti-p40<sup>phox</sup>. Los neutrófilos de P2 muestran una ausencia completa de la proteína p40<sup>phox</sup>.

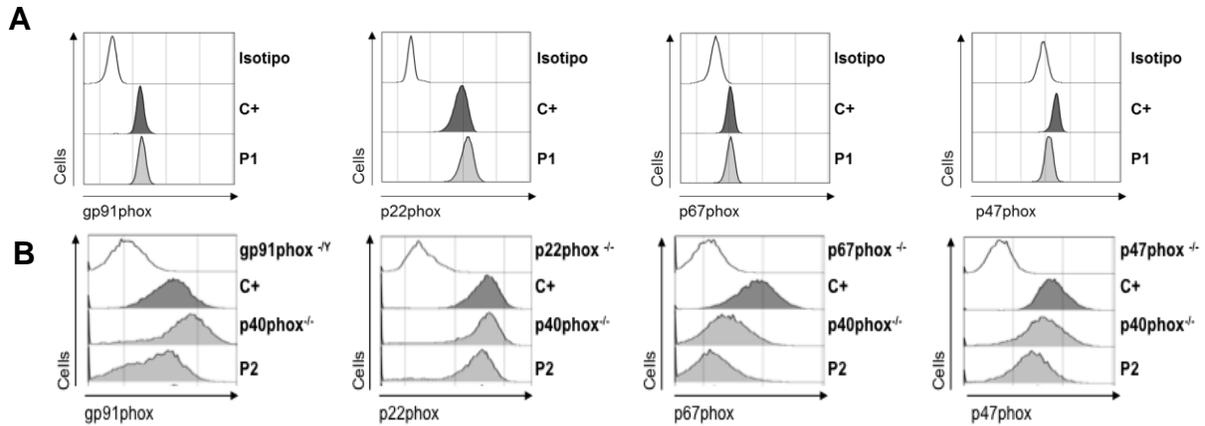
mientras que neutrófilos de control sano presentan una banda a la altura de 40kDa que corresponde a la proteína p40<sup>phox</sup> (Figura 11).



**Figura 13. Western-blot de p40<sup>phox</sup> en neutrófilos.** Extracto proteico total fueron obtenidos de neutrófilos (PMNs) de P2, de control sano C (+); y el padre de P2, que es heterocigoto para la mutación c.32+2T>C.

### 6.5. Mutación p.V484M en NRAMP1 no afecta la expresión de las subunidades del complejo NADPH oxidasa mientras que la ausencia de p40<sup>phox</sup> afecta la expresión de p67<sup>phox</sup>

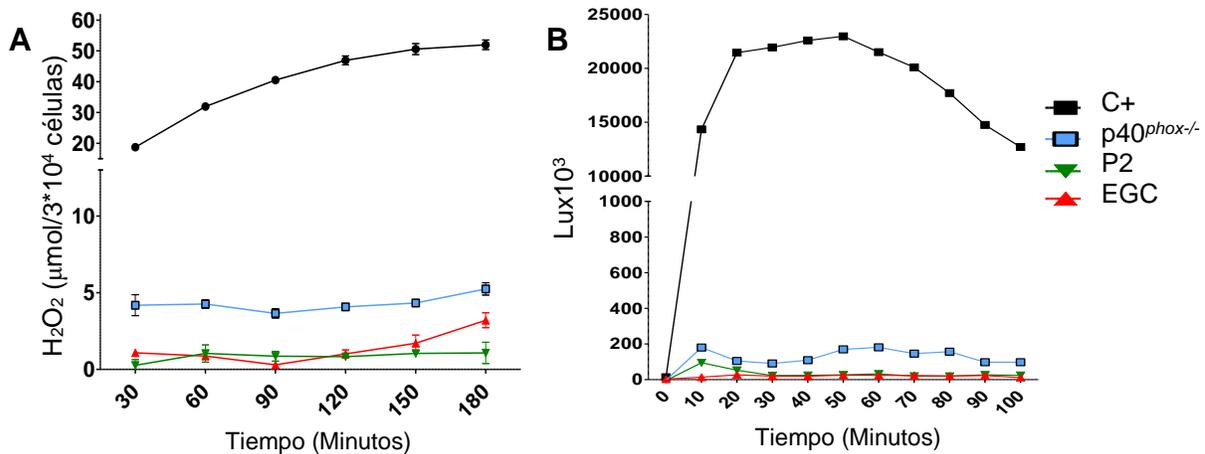
Para evaluar si las mutaciones en *SLC11A1* y *NCF4* afectan a alguna de las subunidades del complejo NADPH oxidasa, se evaluó de forma intracelular la expresión de gp91<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> en neutrófilos del paciente P1 y en la línea celular EBV-B de P2. Se encontró para P1 que todas las subunidades se expresan de manera similar a controles sanos, estos resultados sugieren que *SLC11A1* no interfiere con la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa (Figura 12-A). Por otro lado, para P2 que tiene la mutación c.32+2T>C que confiere la pérdida total de la expresión de p40<sup>phox</sup> se observa que las subunidades gp91<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> se expresan de manera similar a las células de controles sanos. Sin embargo, la subunidad p67<sup>phox</sup> se observa severamente reducida en las células de paciente P2 (Figura 12-B), esto es consistente con el modelo de ratón deficiente de p40<sup>phox</sup> en donde se describe una interacción directa entre p40<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> (Ellson et al., 2006).



**Figura 14. Expresión intracelular de las subunidades NADPH oxidasa en P1 y P2.** A) Neutrófilos de P1 y de controles sanos (C+) fueron aislados y marcados por una tinción intracelular para evaluar la expresión intracelular de las subunidades del complejo NADPH oxidasa, el isotipo fue considerado como control negativo. B) Líneas celulares EBV-B de P2, del primer paciente descrito con deficiencia en  $p40^{phox}$  ( $p40^{phox-/-}$ ), como control negativo se utilizaron células de pacientes con deficiencia completa de cada una de las subunidades ( $gp91^{phox-/-}$ ,  $p22^{phox-/-}$ ,  $p67^{phox-/-}$  y  $p47^{phox-/-}$ ).

## 6.6. Mutación deletérea de $p40^{phox}$ afecta el estallido respiratorio en la línea celular EBV-B.

El complejo NADPH oxidasa se expresa principalmente en células fagocíticas, sin embargo, se ha descrito que los linfocitos B y T presentan de igual forma las subunidades de este complejo. Por esa razón, líneas celulares EBV-B son un excelente modelo para evaluar el papel de *NCF4* en un modelo de estallido respiratorio. Se generó una línea celular EBV-B del P2 y se evaluó la función del complejo NADPH oxidasa en términos de producción de  $H_2O_2$  y anión superóxido  $O_2^-$ . En los resultados se muestra que las células EBV-B de P2 presentan un defecto severo defecto en la producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  al ser estimuladas con PMA 400ng/mL (Figura 13), este defecto es similar al observado en células de pacientes con EGC

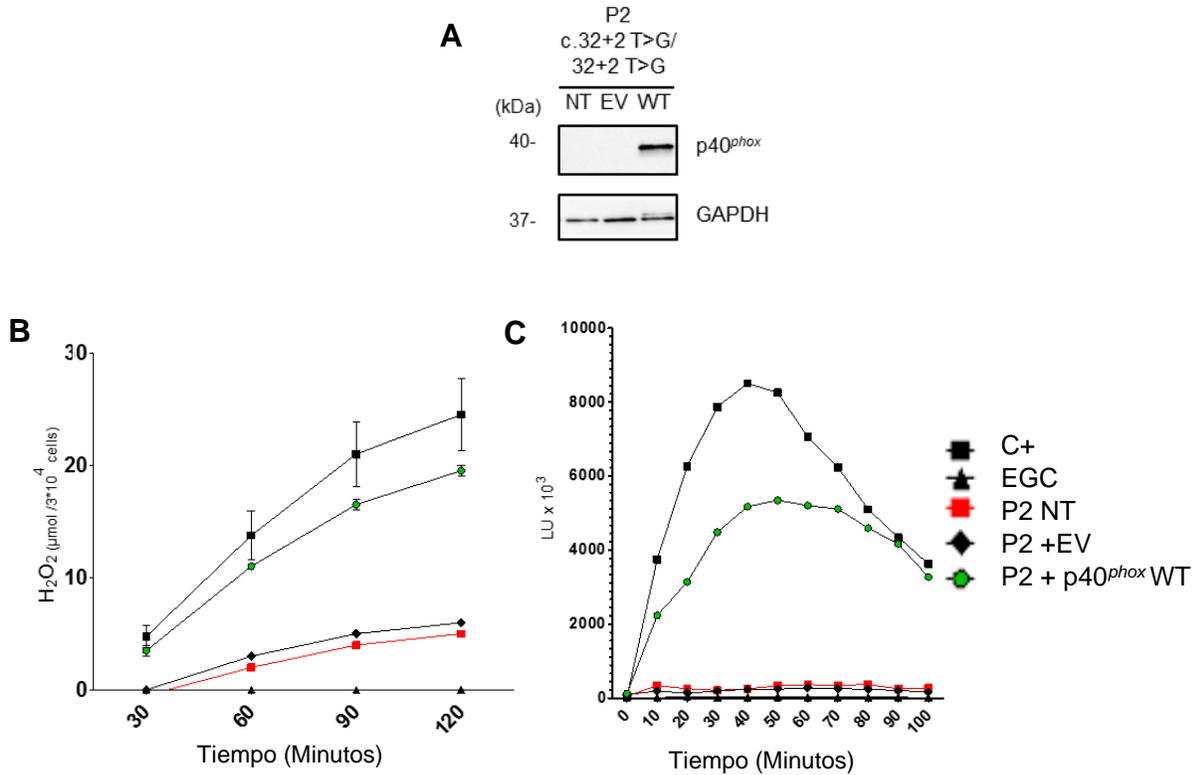


**Figura 15. Estallido respiratorio en líneas celular EBV-B.** Cinética de liberación de A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y producción de B) anión O<sub>2</sub><sup>-</sup> en línea celular EBV-B. 30,000 células EBV-B de un control sano (C+), del primer paciente descrito con deficiencia en p40<sup>phox</sup> (p40<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>), P2 y como control negativo células de un paciente con EGC clásica (EGC) ante la estimulación con PMA (400ng/mL).

### 6.7. Rescate genético con el alelo WT en EBV-B de P2 revierte el defecto en el estallido respiratorio.

Las células del paciente P2 muestran un marcado defecto en la producción de ROS. Para corroborar que el defecto en el estallido respiratorio es debido a la deficiencia de p40<sup>phox</sup>, se realizaron ensayos de retro-transducción. Se transdujeron células EBV-B de P2 con un retrovirus codificante para la secuencia WT de p40<sup>phox</sup> como control se utilizaron partículas de retrovirus con el plásmido vacío (EV). Las células eficientemente retrotransducidas fueron separadas por MACS utilizando el marcador CD271+. Posteriormente, se comprobó por citometría de flujo el 100% de pureza de la población celular con la tinción de CD271+. Una vez que las células fueron transducidas de forma estable, se procedió a verificar la reconstitución de la expresión de p40<sup>phox</sup> por western-blot, se observó que las células EBV-B de P2 retrotransducidas con p40<sup>phox</sup> las células expresan la proteína p40<sup>phox</sup> a la altura de 40kDa. Por el contrario, células no transducidas (NT) o con EV no presentan expresión de p40<sup>phox</sup> (Figura 14A). Finalmente, se evaluó el estallido respiratorio en las células retrotransducidas, se observó que cuando las células EBV-B de P2 recuperan la expresión de la proteína p40<sup>phox</sup> se presenta el estallido respiratorio, en términos de producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al ser

estimulados con PMA, mientras que las células NT o transducidas con EV continúan mostrando defecto en la producción de ROS (Figura 14B-C). Esto comprueba que el defecto en el estallido respiratorio de P2 es debido a la deficiencia de p40<sup>phox</sup>.

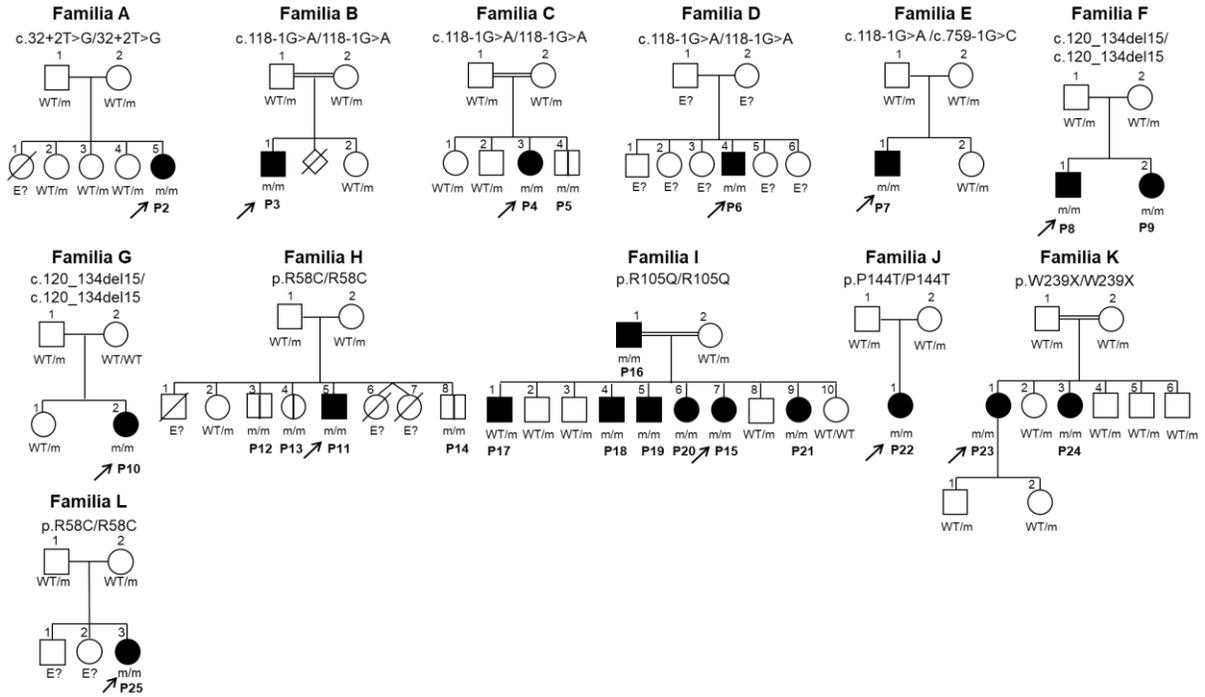


**Figura 16. Rescate en el estallido respiratorio en células EBV-B de P2.** A) Reconstitución de la expresión de p40<sup>phox</sup>. Cinética de liberación de A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y producción de B) anión O<sub>2</sub><sup>-</sup> en línea celular EBV-B de un control sano (C+), de un paciente con EGC clásica (EGC), de P2 sin retrotransducir (P2 NT), de P2 retrotransducidas con el vector vacío (P2 + EV) y P2 retrotransducido con la proteína p40<sup>phox</sup> WT (P2 + p40<sup>phox</sup> WT).

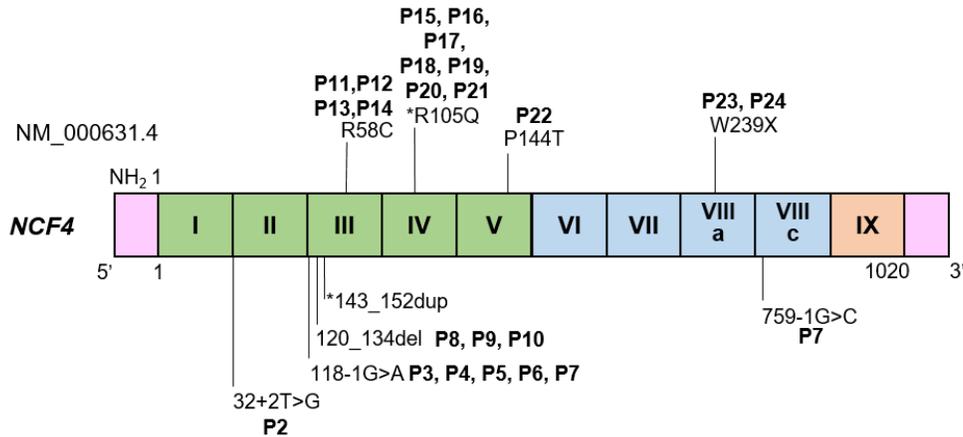
### 6.8. Compilación de la cohorte más larga de pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup>

El rescate genético en células de P2 nos permitió validar el fenotipo celular que caracteriza la deficiencia de p40<sup>phox</sup>, en neutrófilos se confirmó que existe afectación, pero no abolición en el estallido respiratorio a través del ensayo de DHR. Por lo que, en colaboración con múltiples centros de investigación y hospitales alrededor del mundo se recolectaron muestras de pacientes sin diagnóstico genético con un fenotipo de infecciones recurrentes que presentaban un ligero defecto en el estallido respiratorio

medido por el ensayo de DHR. Posteriormente se realizó secuenciación del exoma completo o a través de paneles de secuenciación de genes asociados a inmunodeficiencias primarias y se logró compilar 11 familias con un total de 23 pacientes con mutaciones bi-alélicas en el gen *NCF4*. Todas las mutaciones fueron confirmadas con secuenciación de Sanger mostrando una segregación autosómica recesiva para las 10 familias y 1 familia con disomía uniparental (Figura 15). Se encontraron mutaciones puntuales en las posiciones p.R105Q, p.P144T, p.R58C, así como mutaciones en el sitio de empalme: c.32+2T>C c.118-1G>A, c.759-1G>A; mutaciones sin sentido: p.W293X y finalmente una delección dentro del marco de lectura c.120\_134del (Figura 16). Las manifestaciones clínicas de estos pacientes son diversas, pero principalmente los pacientes con mutaciones en *NCF4* presentan infecciones no invasivas, procesos autoinflamatorios y procesos autoinmunes. Interesantemente, las manifestaciones clínicas son diferentes a las presentadas en pacientes con EGC en donde los defectos en el estallido respiratorio son severos, de las principales diferencias está la ausencia de infecciones invasivas por hongos y bacterias, y finalmente la ausencia de decesos en los 23 pacientes con deficiencia de p40<sup>phox</sup> (Tabla 4).



**Figura 17. Segregación familiar de pacientes con mutaciones bi-alélicas en *NCF4*.** Se compilaron 24 pacientes con mutaciones en *NCF4*. La segregación sigue un modo de herencia AR, excepto para P10 que presenta disomía uniparental. Las flechas indican el caso índice en cada familia, (m/m) representa mutación bi-alélica, (WT/m) representa mutación en heterocigosis y (WT/WT) representa ausencia de mutaciones en ambos alelos de *NCF4*.

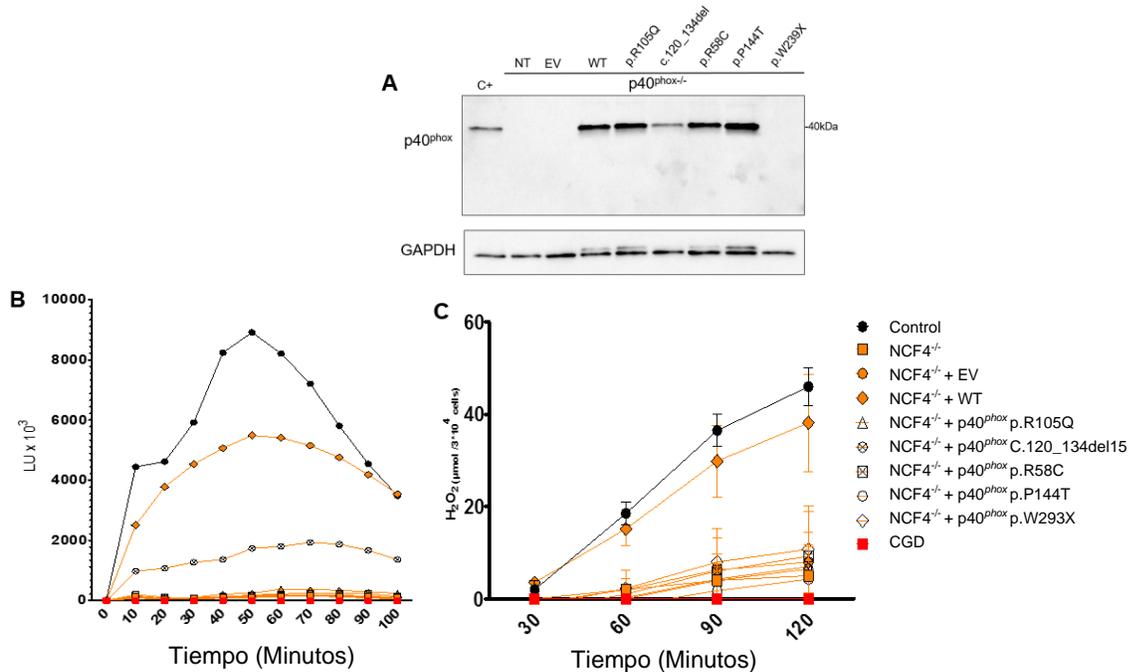


**Figura 18. Representación esquemática de NCF4.** Mutaciones de los 24 pacientes encontrados. En verde se representa al dominio PHOX, en azul se representa el dominio SH3 y en naranja el dominio PB1 de la proteína p40<sup>phox</sup>. El número de exones está representado por números romanos y las regiones UTR en color rosa.

### 6.9. Los alelos mutados en NCF4 de los pacientes son pérdida de función excepto los alelos c.120\_134del y p.R58C que son hipomórficos

Con el objetivo de estudiar si las mutaciones en NCF4 encontradas en los pacientes tienen un impacto amorfo (pérdida total) o hipomórfo (pérdida parcial) en la función en términos del estallido respiratorio se utilizó el sistema de retro-transducción previamente descrito en donde las células EBV-B del P2 (de ahora en adelante EBV-B NCF4<sup>-/-</sup>) se utilizaron como células receptoras de cada alelo mutado. Por lo tanto, se generaron retrovirus con cada una de las mutaciones encontradas en los pacientes (p.R105Q, p.P144T, p.R58C, p.W293X). Una vez transducidas las células se comprobó por Western-blot el impacto de la mutación en la expresión de p40<sup>phox</sup>. Se observó que las mutaciones puntuales no afectan la expresión de la proteína comparado a las células EBV-B NCF4<sup>-/-</sup> + p40<sup>phox</sup> WT. Sin embargo, la delección c.120\_134del presenta una severa disminución en la expresión de p40<sup>phox</sup> y el alelo p. W293X muestra ausencia total en la expresión de la proteína p40<sup>phox</sup> (Figura 17-A). Posteriormente, se evaluó la función de cada uno de los alelos en las células retro-transducidas, para ello se midió la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ante la estimulación con PMA. Se observó que únicamente las células retro-transducidas con la delección c.120\_134del muestran una ligera actividad residual

en la producción de  $O_2^-$  mientras que los demás alelos mutados, las células EBV-B *NCF4*<sup>-/-</sup> + EV y células EBV-B *NCF4*<sup>-/-</sup> sin transducir no pueden producir  $O_2^-$  (Figura 17-B). Asimismo, la liberación  $H_2O_2$  se ve severamente afectada en todos los alelos mutados evaluados (p. R105Q, p.P144T, p. R58C, p.W293X, c.120\_134del) (Figura 17-C).



**Figura 19. Sistema de retro-transducción en células EBV-B *NCF4*<sup>-/-</sup>.** A) Western-blot de p40<sup>phox</sup> en células retrotransducidas con p40<sup>phox</sup> WT o con los diferentes alelos mutados. B) Determinación de  $O_2^-$  en células retrotransducidas ante la estimulación con PMA 400ng/mL. C) Evaluación de  $H_2O_2$  células retrotransducidas ante la estimulación con PMA 400ng/mL

### 6.10. Los alelos mutados de *NCF4* causan pérdida de la expresión de p40<sup>phox</sup> excepto para los alelos p.R105Q y p.R58C.

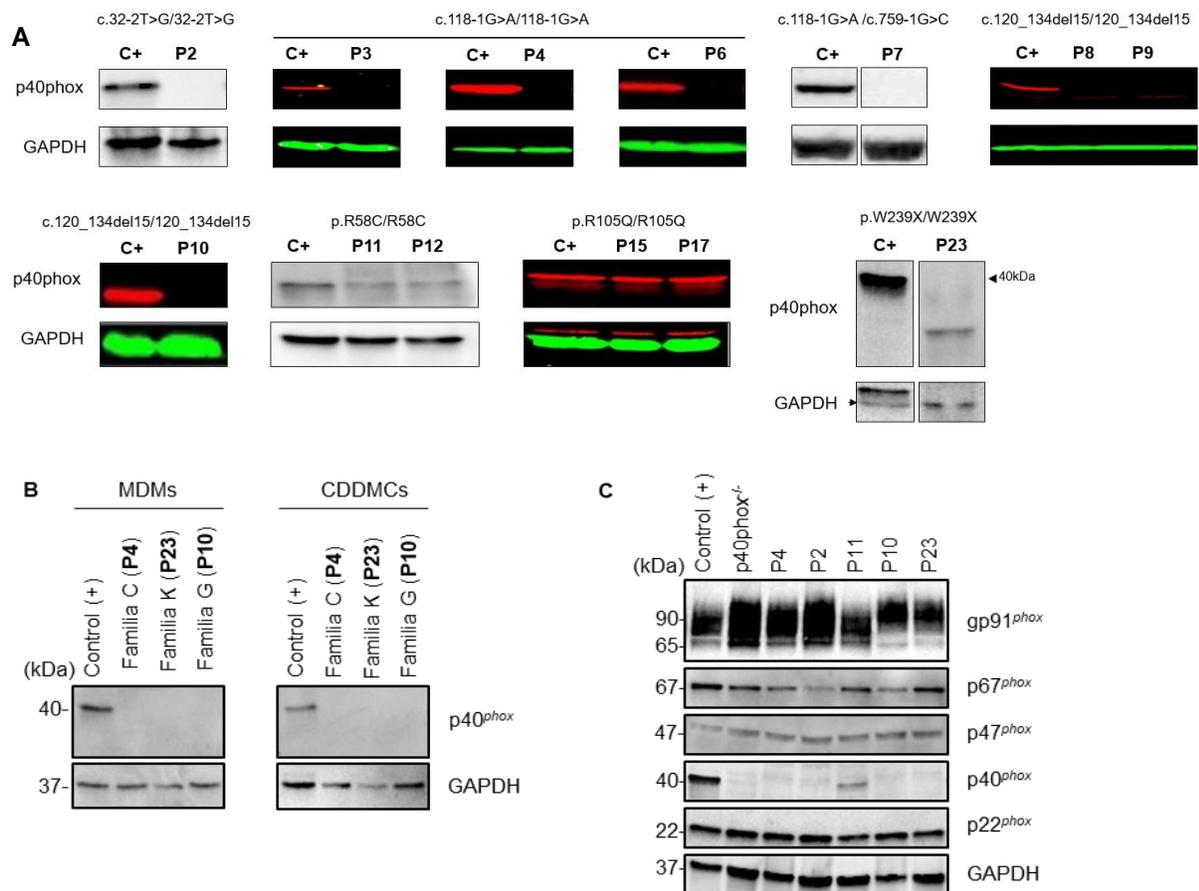
Para estudiar el efecto de las mutaciones homocigotas de las células de los pacientes se realizó la detección de p40<sup>phox</sup> endógeno en neutrófilos, células dendríticas derivadas de monocitos y macrófagos derivados de monocitos. Se observó en los pacientes con mutaciones en el sitio de empalme (c.32+2T>C, c.118-1G>A, c.759-1G>A) así como en los pacientes con la delección c.120\_134del presentan pérdida en expresión de p40<sup>phox</sup>. Por otro lado, en los pacientes con mutaciones puntuales p. R58C se observa una disminución en la expresión de p40<sup>phox</sup>, sin embargo, la otra mutación puntal p. R105Q

se observa expresión normal de p40<sup>phox</sup>. Por último, para el paciente con mutación p.W293X se observa expresión de una proteína truncada alrededor de los 25kDa (Figura 18-A); Asimismo, a partir de monocitos se derivaron células dendríticas y macrófagos en los pacientes P4 (c.118-1G>A), P10 (c.120\_134del15) y P23 (p.W239X). Se observó que la expresión de p40<sup>phox</sup> se encuentra abolida en los pacientes evaluados con mutaciones en *NCF4* (Figure 18-B). Finalmente, células EBV-B de los pacientes P2, P4, P10, P11 y P23 se evaluó la expresión no solo de p40<sup>phox</sup> sino de todas las subunidades del complejo NADPH oxidasa. Se obtuvo que sólo el paciente P11 expresa proteína p40<sup>phox</sup> de forma residual mientras que los demás pacientes carecen de la expresión de la proteína (Figura 18-C). Asimismo, todos los pacientes expresan niveles similares al control sano de las demás subunidades del complejo, se observó una expresión normal de gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup>. Sin embargo, se sugiere una ligera disminución en p67<sup>phox</sup> (Figura 18-C). Este

fenómeno se pudiera relacionar con la capacidad de interacción que tienen estas dos subunidades.

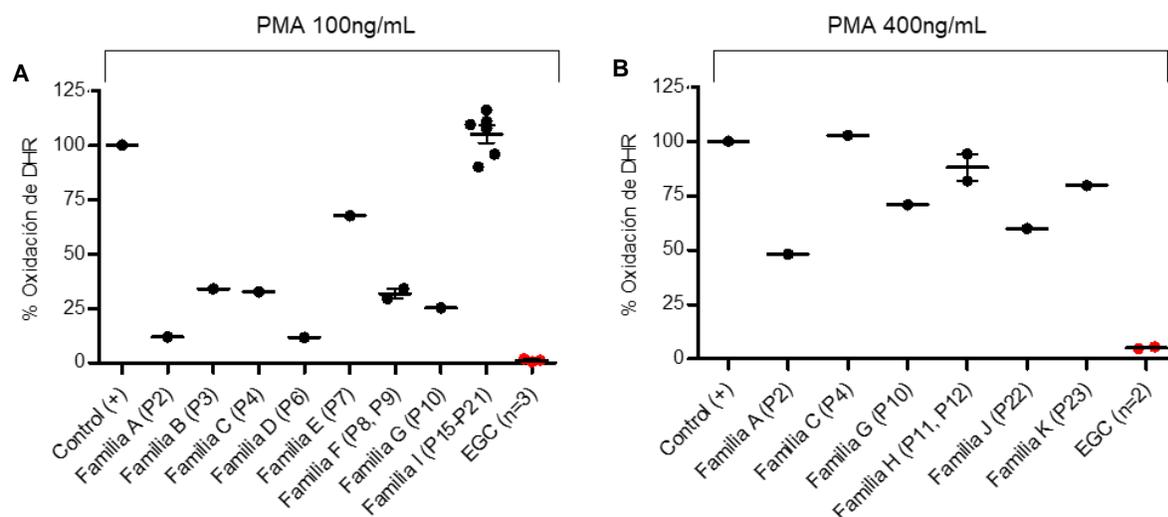
**6.11. Actividad del complejo NADPH oxidasa en neutrófilos de los pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup> se encuentra de normal a ligeramente afectada ante la estimulación con PMA**

El primer paciente descrito con deficiencia en p40<sup>phox</sup> mostraba un defecto parcial en el estallido respiratorio en neutrófilos al ser evaluado por DHR. Asimismo, los primeros ensayos con P2 muestran que la actividad oxidativa de los neutrófilos se encuentra



**Figura 20. Expresión de p40<sup>phox</sup> endógeno en células primarias de pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup>.** Extractos proteicos totales fueron obtenidos de A) Neutrófilos; B) MDMs y CDDM's C) EBV-B, Westernblot para la proteína p40<sup>phox</sup> fue realizado y además en EBV-B para las subunidades gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>.

presente pero no a los niveles de neutrófilos de controles sanos (Figura 8). Por esa razón, se evaluó el estallido respiratorio en neutrófilos de pacientes con mutaciones bi-alélicas en *NCF4* ante PMA a concentraciones de 100 ng/mL o 400 ng/mL. Se encontró que los neutrófilos de pacientes al ser estimulados con PMA muestran actividad residual o normal dependiendo de la concentración de PMA. En todos los pacientes evaluados, se encontró que la actividad es mayor a los neutrófilos de pacientes con EGC (Figura 19).



**Figura 21. Estallido respiratorio en neutrófilos de pacientes con deficiencia en  $p40^{phox}$ .** DHR en neutrófilos de controles sanos, pacientes con deficiencia en  $p40^{pho}$  y de pacientes con EGC clásica fueron estimulados con PMA a 100ng/mL (Izquierda) y 400ng/mL (Derecha).

### 6.12. Actividad del complejo NADPH oxidasa en células mononucleares de pacientes con deficiencia en $p40^{phox}$

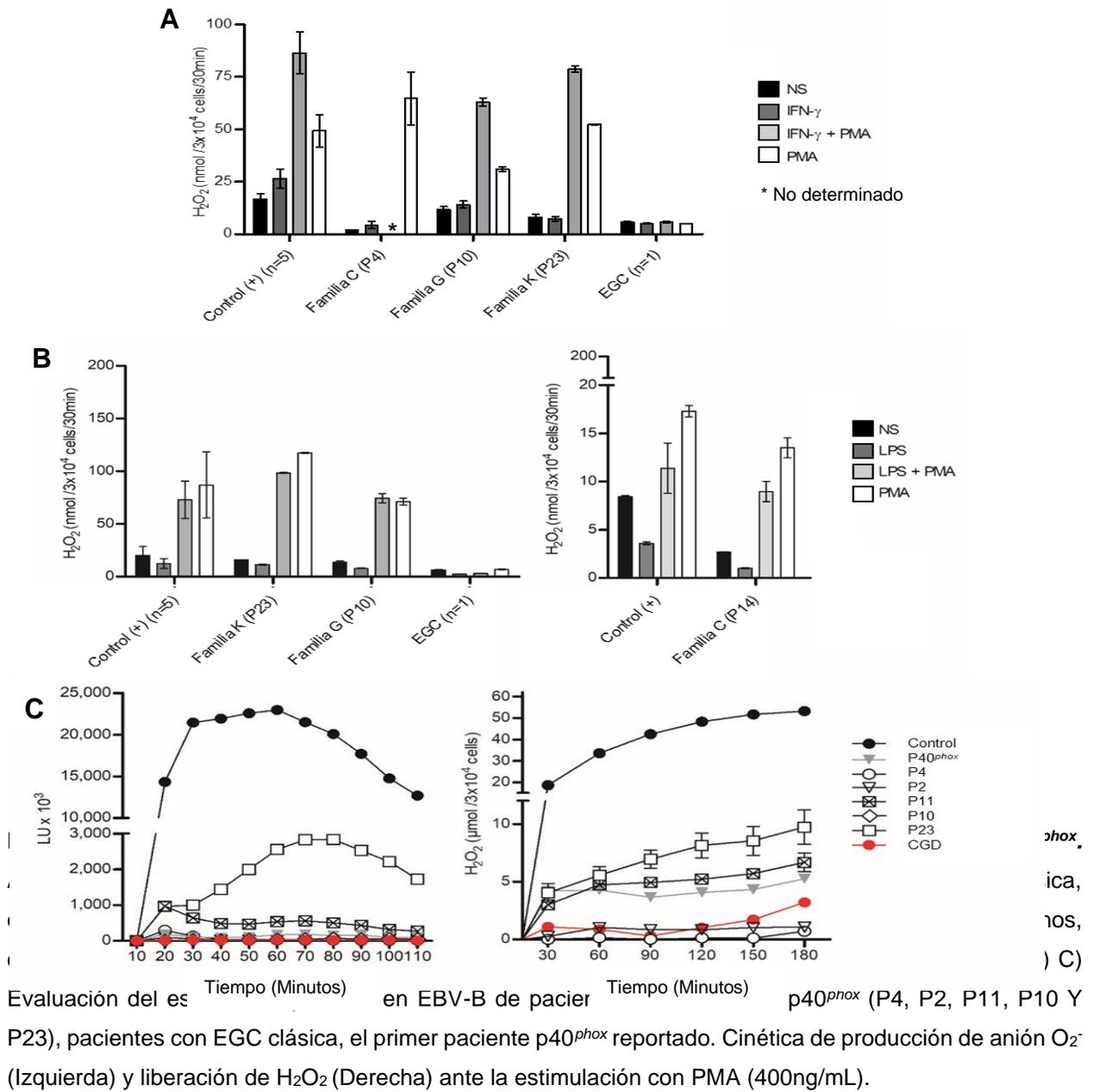
Se estudio si otro tipo de células con capacidad de producir ROS tiene el mismo comportamiento que los neutrófilos ante la activación del complejo NADPH oxidasa con PMA. Se obtuvieron los monocitos de los pacientes deficientes de  $p40^{phox}$ , pacientes con EGC clásica y controles sanos. Se obtuvieron derivados de los monocitos (MDMs) y también células dendríticas derivadas de monocitos (CDDMs). Se evaluó la liberación de  $H_2O_2$  en MDMs y CDDMs de pacientes y se comparó con células de controles sanos y de pacientes con EGC. En MDMs se encontró que la liberación de  $H_2O_2$  en pacientes deficientes de  $p40^{phox}$  es similar a células de controles sanos ante la estimulación con PMA y PMA + IFN  $\gamma$  (Figura 20-A). Por el contrario, células de pacientes con EGC no

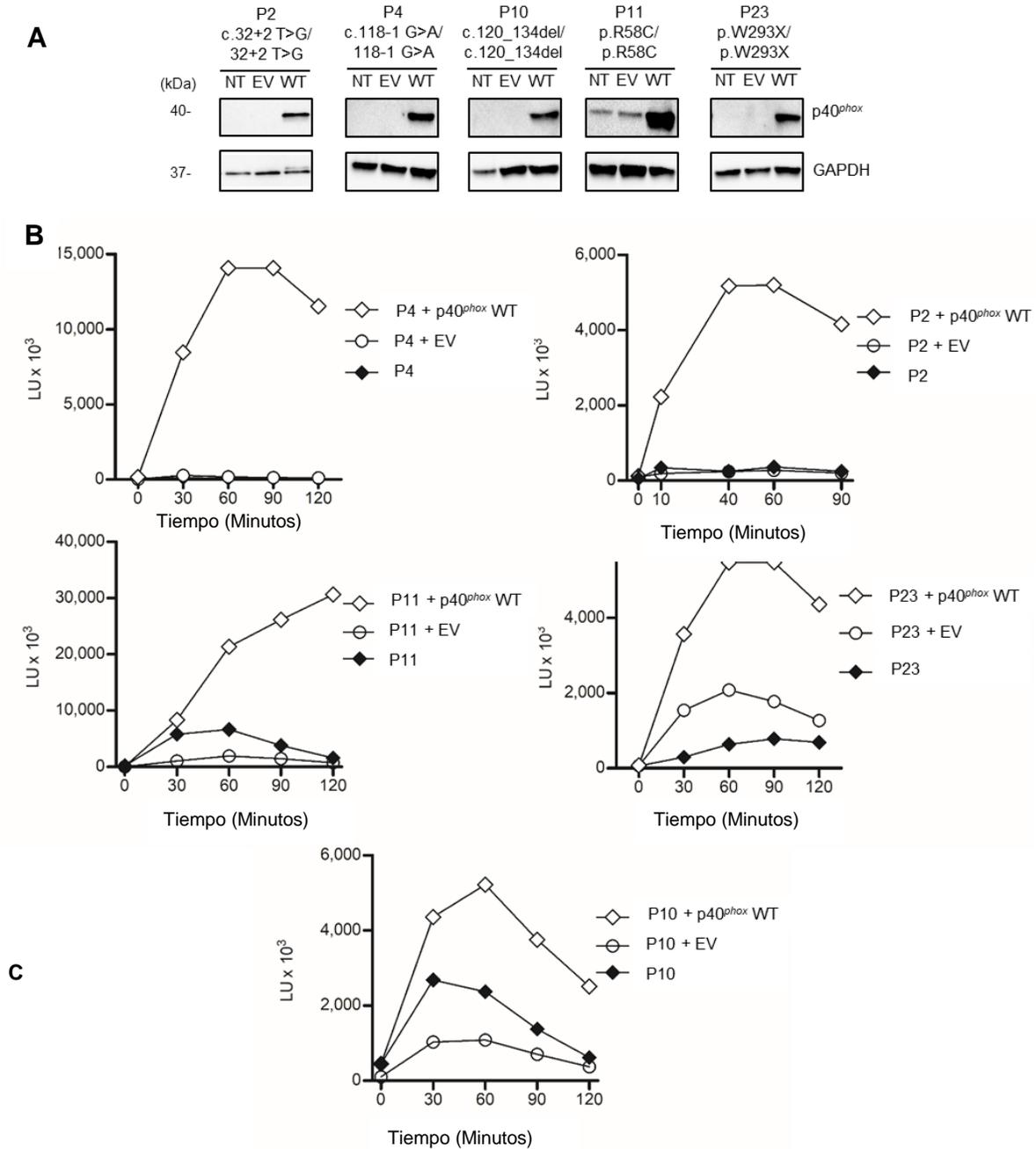
presentaron estallido respiratorio al no detectarse niveles de  $H_2O_2$ . De igual forma, en CDDMs, se encontró que el estallido respiratorio de pacientes con  $p40^{phox}$  se mantiene de igual forma a valores similares a células de controles sanos al ser estimuladas con PMA y PMA + LPS, mientras que las células del paciente con EGC no presentan estallido respiratorio (Figura 20-B). Finalmente, se utilizaron células EBV-B de los pacientes P2, P4, P10, P11 y P23 y se evaluó el estallido respiratorio midiendo liberación de  $H_2O_2$  y producción de  $O_2^-$ . Las células fueron estimuladas con PMA y se realizó una cinética del estallido respiratorio. Se observó que las células EBV-B de los pacientes con deficiencia de  $p40^{phox}$  presentan una reducción severa en la producción de ambas especies reactivas del oxígeno ( $H_2O_2$  y  $O_2^-$ ) excepto las células de P8 y P11, en donde se observa una ligera producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  (Figura 20-C).

### **6.13. La pérdida de la función de $p40^{phox}$ causa el defecto en el estallido respiratorio en la línea celular EBV-B $p40^{phox-/-}$**

Células de los pacientes P2, P4, P10, P11 y P23 muestran un marcado defecto en la producción de ROS (Figura 20C). Para corroborar que el defecto en el estallido respiratorio es debido a la deficiencia de  $p40^{phox}$ , se realizaron ensayos de retrotransducción en donde se transdujeron células EBV-B de P2, P4, P10, P11 y P23 con un retrovirus codificante para la secuencia WT de  $p40^{phox}$ . Se utilizó como control partículas de retrovirus con el plásmido vacío (EV). Se evaluó en las células retrotransducidas la expresión de  $p40^{phox}$  por Western-blot. Se observa que todas las células EBV-B retrotransducidas con  $p40^{phox}$  WT expresan una proteína a la altura de  $p40^{phox}$ , sin embargo, células no transducidas (NT) o con EV no presentan expresión de  $p40^{phox}$ , excepto en P11 (Figura 21-A). Finalmente, se evaluó el estallido respiratorio en las células retrotransducidas, se observó que cuando las células recuperan la expresión de la proteína  $p40^{phox}$  se rescata el estallido respiratorio, en términos de  $O_2^-$ , al ser estimulados con PMA, mientras que las células NT o transducidas con EV continúan mostrando defecto en la producción de ROS (Figura 21 B). Esto comprueba que el defecto en el

estallido respiratorio en las células EBV-B de pacientes con deficiencia en  $p40^{phox}$  es debido a la ausencia de  $p40^{phox}$ .

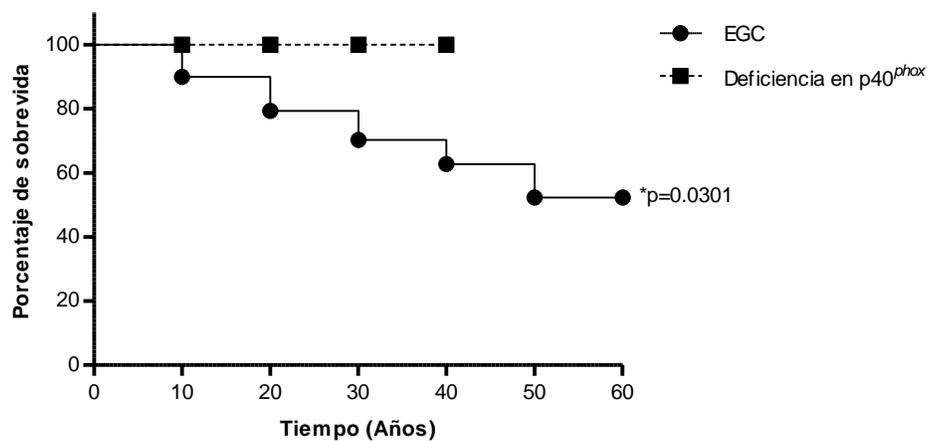




**Figura 23. Rescate genético en EBV-Bs de pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup>.** A) Western-blot de p40<sup>phox</sup> en extractos totales de EBVB-Bs de los pacientes retrotransducidos con el alelo WT de p40<sup>phox</sup> o con el EV. B) Evaluación de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en EBV-Bs retrotransducidos con el alelo WT o EV ante el estímulo de PMA.

**6.14. El pronóstico de los pacientes deficientes de p40<sup>phox</sup>**

Los pacientes con deficiencia en  $p40^{phox}$  presentados en este trabajo presentan un amplio espectro de fenotipos clínicos; sin embargo, estas manifestaciones difieren de las observadas en las cohortes más grandes de pacientes con EGC reportadas. Deficiencia de  $p40^{phox}$  predispone a infecciones del tipo superficial e importantemente a defectos en la regulación de la inmunidad presentando mayor incidencia (50%) de proceso inflamatorio y procesos autoinmunes (Tabla 4). Asimismo, los pacientes con deficiencia en  $p40^{phox}$  presentan una mortalidad de 0 comparado a EGC en donde la mortalidad puede alcanzar tasas del 30% en las primeras dos décadas de vida (Figura 22).



**Figura 24. Curva Kaplan-Meier de sobrevida de pacientes con deficiencia  $p40^{phox}$  y pacientes con EGC clásica.** Se compilaron los datos de pacientes con EGC clásica reportadas en literatura (Tabla 4) y se graficó la sobrevida de EGC comparada con la sobrevida de la cohorte  $p40^{phox}$ .

**Tabla 4. Fenotipo clínico de pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup> y cohortes publicadas de pacientes con EGC.**

	<b>Cohorte Americana</b> (Winkelstein et al., 2000)		<b>Cohorte Europea</b> (van den Berg et al., 2009)		<b>Cohorte latina</b> (de Oliveira-Junior et al., 2015)		<b>Cohorte p40<sup>phox</sup></b> (van de Geer et al., 2018b)
<b>Tipo de EGC</b>	XL = 259	AR = 81	XL = 279	AR = 136	XL = 53	AR = 16	p40 <sup>phox</sup> deficiencia = 24
<b>Edad de debut (años)</b>	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	1.8 (0.01- 13)	2.7 (0.02-7)	<b>4.7</b> (1-14)
<b>Edad del diagnóstico (años)</b>	3	7.8	4.9 (0 - 43)	8.8 (0 - 54)	3.6 (0.08-16.5)	8.2 (2-14)	<b>12.45</b> (1-37)
<b>Mortalidad</b>	21%	9%	23%	15%	No reportado	No reportado	0%
<b>Manifestaciones clínicas</b>	% de pacientes con ≥ 1 episodios						
<b>Pulmón</b>	79%		66%		77.5%		16.6%
<b>Piel</b>	42%		53%		42.5%		44.4%
<b>Ganglios linfáticos</b>	53%		50%		60%		22.2%
<b>Gastro – intestinal</b>	17%		48%		42.5%		44.4%
<b>Hígado</b>	27%		32%				5.5%
<b>Tracto urinario</b>	No reportado		22%		22.5%		Ausente
<b>Sepsis</b>	18%		20%		25%		Ausente
<b>Otitis</b>	No reportado		14%		30%		Ausente
<b>Hueso</b>	25%		13%		17.5%		Ausente
<b>Ojo</b>	No reportado		11%		No reportado		Ausente
<b>Articulaciones</b>	No reportado		7%		No reportado		Ausente
<b>Cerebro</b>	4%		7%		No reportado		5.5%
<b>Autoinmunidad</b>	10%		6%		No reportado		<b>33.3%</b>

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. NGS en el estudio de Inmunodeficiencias.

Las técnicas de secuenciación de nueva generación NGS han revolucionado el área de investigación y diagnóstico de las enfermedades genéticas. En el área de las inmunodeficiencias a partir de su utilización de las técnicas de NGS, se han descrito más de 300 genes asociados a PID, siendo el (Whole Exome Sequencing) WES el más utilizado. El WES permite analizar las variantes de cada paciente que se encuentran en la región codificante y en las regiones cercanas a los sitios de empalme de todos los genes del paciente. La secuencia analizada en el WES representa aproximadamente el 1% de todo el genoma (Seleman, Hoyos-Bachiloglu, Geha, & Chou, 2017). Sin embargo, se ha descrito que la mayoría de las variaciones deletéreas se encuentran localizadas en estas regiones del DNA. Las variaciones encontradas en el análisis de un WES pueden llegar a ser de alrededor de 20,000 variaciones por muestra, por lo que un análisis bioinformático adecuado es necesario para filtrar todas las variantes hasta encontrar la o las variantes patogénicas previamente descritas o bien, aportar evidencia *In silico* y genética de que la o las variantes candidatas son responsables de la enfermedad. Actualmente, en el área de las inmunodeficiencias las técnicas de NGS han sido de gran apoyo para la comunidad médica y científica ya que representan una rápida y efectiva estrategia para realizar un diagnóstico definitivo. En este trabajo se logró describir a la cohorte más grande reportada hasta el momento, de pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup> y, por primera vez, la deficiencia de NRAMP-1 utilizando el WES en pacientes sin un diagnóstico definido. Las mutaciones encontradas se asocian con un defecto en el estallido respiratorio y con la enfermedad granulomatosa crónica (EGC). Interesantemente, el diagnóstico de EGC había sido descartado, para la mayoría de los pacientes, por los métodos comunes de rutina en el área clínica. Esto demuestra la importancia de implementar técnicas de NGS para el diagnóstico de enfermedades en particular las inmunodeficiencias.

### 7.2. Selección de variantes candidatas.

En este trabajo se reportó una mutación homocigota en *SLC11A1* que se asocia a susceptibilidad por infecciones, siendo así la primera mutación descrita causante de la deficiencia de NRAMP1. La mutación se encontró al análisis de WES, se filtraron todas las variantes del paciente de acuerdo a las guías establecidas (Meyts, Bosch, Bolze, Boisson, Itan, Belkadi, Pedergrana, Moens, Picard, Cobat, et al., 2016). El paciente P1 es hijo de padres consanguíneos por lo cual se seleccionaron las variantes homocigotas obteniendo 34 variantes raras en P1. Sin embargo, las inmunodeficiencias primarias son enfermedades monogénicas, por esta razón era necesario encontrar una variante que se asociara al fenotipo clínico del paciente. Se realizó un análisis de redes utilizando la herramienta Human Connectome Server, esta herramienta permitió evaluar la cercanía de los genes mutados del paciente a genes involucrados con la respuesta inmune, el resultado de este enfoque arrojó dos variantes candidatas en los genes *TIAM2* y *SLC11A1*. La selección de estas variantes fue basada en conservación del gen, presión evolutiva y genética de poblaciones. *TIAM2* presentaba mutaciones muy frecuentes en la población en general que incluso se predicen con mayor impacto *In silico* que la mutación que el paciente. Por el contrario, la mutación encontrada en el paciente en *SLC11A1*, no se ha reportado en homocigosis en base de datos públicas; adicionalmente, no son frecuentes las mutaciones en *SLC11A1* por lo que la presión evolutiva en este gen es más fuerte. Finalmente, se consideró a *SLC11A1* por la hipótesis genética, por la evidencia *In silico* y genética de poblaciones y por la evidencia científica de *SLC11A1* y la proteína NRAMP1 y su importancia con el sistema inmune y la susceptibilidad a infecciones (Jenefer M Blackwell et al., 2003).

P2 fue referido a nosotros para realizar un ensayo genético de NGS. Los médicos referían al paciente con infecciones pulmonares recurrentes sin aislamiento de ningún microorganismo. Se le realizaron pruebas genéticas para descartar fibrosis quística, y defectos en proteínas surfactantes, los resultados fueron negativos. Adicionalmente, se realizó ensayo de DHR para evaluar estallido respiratorio y se reportó ligeramente bajo pero presente, por lo que se descartó EGC. Se procedió a realizar WES del paciente y se encontró en homocigosis que el paciente portaba una variante en *NCF4*, gen que codifica para p40<sup>phox</sup>. La deficiencia de p40<sup>phox</sup> ya se había descrito anteriormente y se confirmó

con este paciente que los ensayos de DHR, utilizando PMA como estímulo, en estos pacientes va de residual a normal en comparación a los controles sanos (Matute *et al.* 2009). Por esta razón, a nivel mundial se reclutaron pacientes con sospecha de inmunodeficiencias, de EGC o con característica hiper-inflamatorias o autoinmunes y se les realizaron pruebas de NGS, WES o panel. Finalmente se reclutaron 23 pacientes con mutaciones en *NCF4* los cuales fueron estudiados en este trabajo.

### 7.3. Deficiencia de NRAMP1.

En este trabajo se reportó la mutación c.1450G>A en el gen *SLC11A1* en P1, esta mutación con pérdida de sentido afecta una región codificante altamente conservada entre ortólogos, cambiando una valina por una metionina en el residuo 484 (p.V484.M). Esta mutación confiere la deficiencia autosómica recesiva de NRAMP-1 reportada por primera vez en humanos; interesantemente, la deficiencia de NRAMP-1 confiere un fenotipo celular similar a EGC, afectando el estallido respiratorio en las células fagocíticas, pero con la particularidad de depender del tipo celular. NRAMP-1 es una proteína que contiene 12 dominios transmembranales y define a un grupo de proteínas ricas en dominios transmembranales con homología en el ratón y el humano (Cellier *et al.*, 1995) (Blackwell 1996). La mutación p.V484M afecta el dominio transmembranal 11, cercana a la región externa de la proteína. En modelo murino, la mutación con pérdida de función (p.G169D) se localiza también en un dominio transmembranal en la región externa (Govoni *et al.*, 1996), esto sugiere que los dominios transmembranales y en particular la región externa, tienen una función importante y altamente conservada. Estudios en las características de la proteína sugieren que los 12 dominios transmembranales se acomodan en forma helicoidal generando un canal de transporte de iones (Cellier *et al.*, 1995), debido a este acomodamiento se sabe que NRAMP1 sirve como transportador de iones divalentes, particularmente del hierro (Barton *et al.*, 1999). La correcta función de NRAMP1 y transporte de iones hierro se ha visto relacionado en macrófagos de ratón con una adecuada producción de óxido nítrico y con la rápida respuesta proinflamatoria (Valdez *et al.*, 2009). En modelos *In vitro* e *In vivo* en ratones,

se demostró que la deficiencia de NRAMP1 confiere una susceptibilidad a infecciones por bacterias intracelulares (Blackwell 1996; Medina and North 1996).

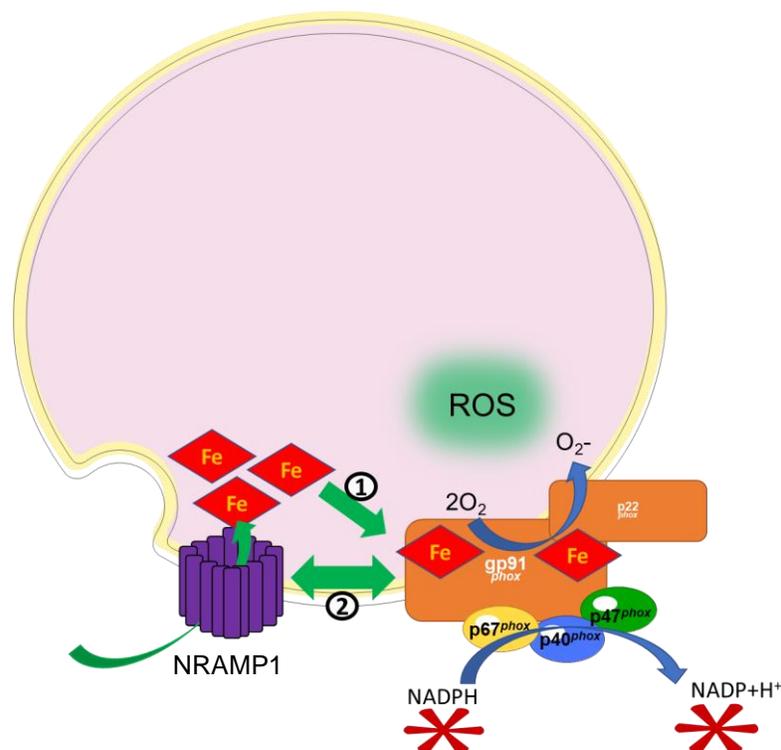
La mutación p.V484M en P1 fue caracterizada molecularmente respecto al impacto de la mutación a nivel de RNA y proteína. Se encontró que la mutación no afecta la expresión a nivel de RNA ya que se observaron niveles de transcritos similares en paciente y donadores sanos. Sin embargo, al analizar el impacto de la mutación a nivel de proteína en un sistema de sobreexpresión se observó que la proteína mutada (p.V484M) se expresa en menor proporción que la proteína WT y que mutaciones artificiales en el mismo residuo (p.V484I y p.V484Q). Esto sugiere que exclusivamente el cambio de Valina por Metionina en la posición 484 si tiene un efecto en la cantidad de proteína expresada, quizá debido a inestabilidad de la estructura helicoidal favoreciendo una degradación de la proteína. Estudios de localización, translocación y degradación proteica son necesarios para un mejor entendimiento del efecto de la mutación. Para analizar el posible efecto en la disminución de la expresión de NRAMP1 se evaluó el estallido respiratorio en células del paciente (Neutrófilos y monocitos) por el método de la oxidación de la DHR. Interesantemente, se obtuvo que los neutrófilos del paciente muestran una disminución en la intensidad de fluorescencia <oxidación> de la DHR, mientras que los monocitos tienen una oxidación de la DHR similar a los donadores sanos. Esto sugiere que el defecto causado por la mutación de NRAMP1 afecta exclusivamente a los neutrófilos del paciente. En 2011 se reportó un fenómeno similar en pacientes con EGC ligada al X, en donde las mutaciones en *CYBB* conferían la enfermedad de Susceptibilidad Mendeliana a Infecciones por Micobacteria (MSMD) al afectar exclusivamente a los macrófago y no a los neutrófilos (Bustamante et al., 2011). Sin embargo, para el caso de NRAMP1, la mutación está afectando exclusivamente a los neutrófilos, sugiriendo una importancia mayor en este tipo celular. Estos resultados sugieren que NRAMP1 pudiera estar interactuando con elementos del complejo NADPH oxidasa.

La posible interacción entre NRAMP1 y elementos del complejo NADPH oxidasa nunca ha sido reportada, sin embargo, NRAMP1 cuenta con dominios SH3 cerca del amino terminal que median interacciones proteína-proteína. Adicionalmente, tanto la proteína de NRAMP1 y el complejo activado de la NADPH oxidasa se localizan en la membrana

plasmática, lo cual hace más factible su interacción (Figura 23), similar a lo observado por la proteína EROS, proteína transmembranal que en ausencia causa un defecto en el estallido respiratorio (Thomas et al., 2017). Sin embargo, resultados preliminares indican que en sobreexpresión NRAMP1 no interactúa con los elementos del complejo NADPH (Neehus, 2018). Otra hipótesis que explicaría porque la mutación en NRAMP1 tiene un efecto en el estallido respiratorio recae precisamente en la principal función de NRAMP1, el transporte de hierro. Se sabe que la proteína gp91<sup>phox</sup>, parte del núcleo enzimático del complejo NADPH oxidasa, es también componente del flavocitocromo B, el cual contiene 2 grupos hemo embebidos en su estructura, los cuales le permiten el transporte de electrones y así formar anión superóxido en el proceso de estallido respiratorio (Figura 23). Sin embargo, se ha reportado que durante la síntesis del flavocitocromo B se requiere de la incorporación de los grupos hemo en el precursor de gp91<sup>phox</sup> para ser estable y unirse a p22<sup>phox</sup> (DeLeo et al., 2000). De ser esta hipótesis correcta se esperaba que las células del paciente tuvieran disminuida la expresión del flavocitocromo B, sin embargo, en resultados preliminares ocurre lo contrario ya que los neutrófilos del paciente expresan mayor cantidad de flavocitocromo B comparado a los donadores sanos (datos no mostrados). Adicionalmente, se evaluó la expresión de los componentes del complejo NADPH oxidasa en los neutrófilos del paciente y se encontró que las proteínas gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> se encuentran expresadas en niveles normales comparado con células de individuos controles sanos. Por lo que continúa siendo incierta la posible interacción de NRAMP1 con el complejo NADPH oxidasa y futuros experimentos deben de conducirse para dilucidar el efecto de la mutación p.V484M en neutrófilos y su diferencia en otros tipos celulares.

Los defectos en el estallido respiratorio en células fagocíticas son la principal característica en las células de pacientes con EGC clásica (Holland, 2014). La severidad de las manifestaciones clínicas se relaciona con la actividad residual del complejo NADPH oxidasa de manera directa, por ejemplo: cuando existen niveles residuales elevados de producción de anión superóxido o peróxido de hidrogeno el pronóstico de estos pacientes es favorable y presentan una mortalidad menor comparada a aquellos que tienen nula actividad del complejo NADPH oxidasa (Kuhns et al., 2010). En P1 se observa que la actividad del complejo NADPH oxidasa está afectada pero es altamente

residual, causando la ausencia de las manifestaciones clásicas que se presentan en la EGC, como infecciones severas por hongos o bacterias; tampoco presenta manifestaciones autoinmunes presentadas comúnmente en pacientes con variantes de EGC y con polimorfismos en NRAMP1 (John S et al., 1997; van den Berg et al., 2009). El fenotipo clínico de P1 es reminiscente a defectos en MYD88 o IRAK-4 ya que presenta linfadenitis recurrentes por bacterias piógenas (*Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus haemolyticus*, *Finegolia magna*). Sin embargo, experimentos previos no mostraron ningún defecto en la vía  $TNF\alpha - IL6$ , por lo que futuros experimentos deben conducirse para evidenciar la importancia de NRAMP1 en la inmunidad ante bacterias piógenas, una hipótesis podría apuntar a la importancia de NRAMP1 durante el proceso de presentación de antígeno (Lang, Prina, Sibthorpe, & Blackwell, 1997) o la maduración de la afinidad de las inmunoglobulinas



**Figura 25. Esquema de la posible función de NRAMP1 en el estallido respiratorio.** NRAMP1 es una proteína transmembranal encargada del transporte de hierro, la proteína gp91<sup>phox</sup> forma parte del complejo NADPH oxidasa y contiene en su núcleo enzimático iones hierro para el intercambio de electrones (1). Por otro lado, NRAMP1 podría estar interactuando directamente con alguna subunidad del complejo NADPH oxidasa (2).

#### 7.4. Deficiencia de p40<sup>phox</sup>

Finalmente, en este trabajo se reportó la cohorte más grande a nivel mundial de pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup>. A partir del paciente índice (P2) se identificó un total de 24 pacientes con mutaciones bi-alélicas en el gen *NCF4*, que codifica para la proteína p40<sup>phox</sup>. En estos 24 pacientes se identificaron siete alelos que no habían sido reportados previamente, en cinco de ellos las mutaciones se localizaron en el dominio <sup>phox</sup> (PX) de la proteína y los dos alelos restantes las mutaciones se localizan en el dominio SH3. Los dominios PX y SH3 son de gran relevancia para la activación del complejo NADPH oxidasa; el dominio PX es fosforilado por cinasas como PKC $\delta$  (Raad et al., 2009). La fosforilación es necesaria para el correcto reclutamiento de p40<sup>phox</sup> al complejo. Por otro lado, el dominio SH3 media la interacción p40<sup>phox</sup> con las demás subunidades citosólicas (p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>) (Ito, Nakamura, Sumimoto, Takeshige, & Sakaki, 1996). Las mutaciones encontradas en los pacientes se localizaron precisamente en los dominios PX y SH3 de p40<sup>phox</sup>, lo cual sugería podrían tener un impacto importante en la función de p40<sup>phox</sup>. Se procedió a evaluar el impacto de las mutaciones a nivel de proteína evaluando la expresión de p40<sup>phox</sup> en células del paciente y en sistemas de sobreexpresión. Se obtuvo que solo las mutaciones con pérdida del sentido (p.R58C y p.R105Q) seguían expresando la proteína en cantidades similares a los controles sanos, el alelo c.120\_134del15 causa una disminución considerable de la expresión de la proteína y los demás alelos causaron una pérdida completa de la expresión de p40<sup>phox</sup>. Para dilucidar si los alelos eran pérdida de función se evaluó la activación del complejo NADPH oxidasa en sistemas de sobreexpresión con células EBV-B y en colaboración con el grupo de investigación dirigido por Taco Kujipers en la universidad de Ámsterdam, se evaluaron los alelos también en células NB4 (van de Geer *et al.* 2018). Se encontró que cinco de los alelos encontrados son pérdida de función mientras que dos de ellos (c.120\_134del15 y p.R58C) tuvieron actividad hipomórfica. Interesantemente, no se encontró diferencia entre el fenotipo clínico de los pacientes con los alelos hipomórficos y los alelos de pérdida de función.

Posteriormente, se evaluó el impacto de las mutaciones en las células del paciente en términos de la actividad del complejo NADPH oxidasa por el método de DHR. Se observó

que los pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup> tienen un fenotipo celular distinto a los pacientes con EGC. Se realizó la prueba de DHR usando como estimulación PMA, este ensayo en particular es considerado el estándar de oro para diagnosticar EGC en el área clínica; interesantemente, los neutrófilos de los pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup> mostraron alta actividad del complejo NADPH oxidasa, incluso en algunos pacientes la actividad fue similar a las de los controles sanos, mientras que las células de los pacientes con EGC no hubo estallido respiratorio, estos resultados sugirieron que la deficiencia de p40<sup>phox</sup> era una variante de EGC. Sin embargo, en el artículo publicado junto con el grupo de investigación de la Universidad de Ámsterdam, se realizaron subsecuentes experimentos utilizando bacterias como estímulo (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*) en los neutrófilos de los pacientes con deficiencia de p40<sup>phox</sup>, se encontró que las células de los pacientes al igual que las células de pacientes con EGC clásica, no presentan estallido respiratorio ante estos estímulos. Sin embargo, cuando los neutrófilos de los pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup> eran estimulados con hongos (*Candida albicans* o *Aspergillus fumigatus*) si presentaban actividad residual en el estallido respiratorio por arriba de los niveles que presentan las células de pacientes EGC. Por lo que la deficiencia de p40<sup>phox</sup> presenta una actividad residual solo ante estímulos químicos como el PMA, hongos y por el contrario son incapaces de presentar estallido respiratorio ante estímulos bacterianos. Por esta razón, derivado de esta publicación se propone que para poder diagnosticar la deficiencia de p40<sup>phox</sup> se debe incluir en los ensayos de DHR la estimulación bacteriana por (*E. coli* o *Staphylococcus aureus*) (van de Geer et al., 2018b).

La divergencia en la estimulación necesita ser investigada, se sabe que para que p40<sup>phox</sup> sea traslocada y se ensamble con el complejo NADPH oxidasa requiere de la unión en el dominio PX con el fosfatidil inositol trifosfato (PI3P) (Nunes et al 2013; Suh et al. 2006). Sin embargo, incluso los pacientes con mutaciones en los sitios de empalme (c.32+2T>G y c.118-1G>A) que no expresan p40<sup>phox</sup> en sus células también presentan alta actividad en el estallido respiratorio al ser estimulados con PMA o *Candida albicans*, esto sugiere que p40<sup>phox</sup> es redundante ante estos estímulos, y que quizá exista un mecanismo de activación independiente de p40<sup>phox</sup> para estos estímulos; en el caso de PMA, pudiera ser que la exacerbada estimulación de PKC causada por el forbol éster cause la fosforilación directa de las otras subunidades (p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>) y puedan activar el complejo NADPH

oxidasa, en ensayos *in vitro* en un sistema de sobreexpresión en células COS7 se observó que p40<sup>phox</sup> no es indispensable para la producción de especies reactivas del oxígeno en este sistema, pero su presencia favorece la producción de anión superóxido ante la estimulación con fMLP (He et al., 2004). La función de p40<sup>phox</sup> ante estímulos fúngicos ya había sido investigada con anterioridad en modelos de ratón y en el primer paciente reportado con deficiencia en p40<sup>phox</sup>, demostrando que en ratón la activación del estallido respiratorio es independiente y no es mediado por la unión de PI3P con p40<sup>phox</sup>, por el contrario en humanos si es necesario la conservación del sitio de unión a PI3P para llevar a cabo la correcta activación del complejo NADPH oxidasa, sin embargo no es nula como en los pacientes con EGC. (Bagaitkar, Matute, Austin, Arias, & Dinauer, 2012; Ellson et al., 2006).

En el artículo publicado en conjunto con la Universidad de Ámsterdam, se describe que las células de los pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup> también fueron utilizadas para evidenciar el efecto de una correcta activación del complejo NADPH oxidasa. Se evaluó la actividad microbicida de los neutrófilos ante la infección con *Staphylococcus aureus*, hifas de *Aspergillus fumigatus*. Se obtuvo que las células de los pacientes deficientes de p40<sup>phox</sup> y EGC clásica no son capaces de eliminar *Staphylococcus aureus*; esto es congruente con la imposibilidad de poder producir ROS ante estos estímulos. Interesantemente, las células de los pacientes deficientes de p40<sup>phox</sup> son capaces de eliminar las hifas *Aspergillus fumigatus* en niveles similares a las células de controles sanos, esto es de gran relevancia para el espectro de fenotipo clínico que presentan los pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup> en donde ninguno de ellos presenta infecciones severas por hongos (van de Geer et al., 2018b).

También se analizaron otro tipo de células en los pacientes como macrófagos y células dendríticas derivadas de monocitos (MDMs y CDDMs) y linfocitos B transformados (EBV-B). Se observó que las células MDMs de los pacientes, a pesar de no expresar la proteína p40<sup>phox</sup>, no presentaron defecto en el estallido respiratorio ante las estimulaciones por IFN $\gamma$  y PMA; esto difiere de lo visto en EGC ligada al X que confiere MSMD, en donde, la mutación en *CYBB* afecta exclusivamente a los macrófagos y no a las otras células fagocíticas (monocitos, neutrófilos, dendríticas) (Bustamante et al., 2011). De igual forma, las células CDDMs de los pacientes no mostraron algún defecto en el estallido respiratorio

al ser estimulados con LPS y PMA. Esto es consistente con los estudios en el modelo de ratón KO de  $p40^{phox}$  donde se muestra que los macrófagos provenientes del ratón KO presentan un estallido respiratorio normal ante el estímulo de PMA, pero afectado severamente ante otros estímulos solubles y particulados como: zimosan opsonizado (SOZ, por sus siglas en inglés), zimosan y perlas opsonizadas con IgG (Bagaitkar et al., 2017). Estudios posteriores con diferentes estimulaciones permitirán dilucidar si el fenotipo de los macrófagos en humanos y ratones es similar, por el momento solo es posible concluir que el efecto en MDMs y CDDMs en los pacientes deficientes con  $p40^{phox}$  es redundante ante las estimulaciones con IFN $\gamma$  y LPS.

En contraste, los linfocitos B transformados (EBV-B) de los pacientes evaluados presentaron un defecto severo en el estallido respiratorio en términos de producción de anión superóxido y peróxido de hidrogeno, los niveles encontrados fueron muy similares al de los EBV-B de pacientes con EGC clásica. Solamente las células del P11 con la mutación c.120\_134delT15 presentaron ligera actividad residual, lo cual es consistente, con los niveles residuales que mostró este alelo en el modelo de sobreexpresión en células EBV-B. Los resultados en EBV-B sugieren que la función de  $p40^{phox}$  en linfocitos B no es redundante, sugiriendo la importancia de  $p40^{phox}$  en procesos importantes de los linfocitos como el procesamiento antigénico y la presentación de antígeno. También se realizó el rescate genético en EBV-B de los pacientes con deficiencia en  $p40^{phox}$ , se logró reconstituir la expresión de la proteína  $p40^{phox}$  y se evaluó el estallido respiratorio obteniéndose que en todas las células reconstituidas con el alelo silvestre se rescató el estallido respiratorio, esto comprueba que el defecto en las EBV-B de los pacientes era por la deficiencia de  $p40^{phox}$ . Estudios realizados con EBV-B del primer paciente deficiente de  $p40^{phox}$  demostró que esta proteína es necesaria para la correcta función del complejo NADPH oxidasa en el procesamiento antigénico. Al respecto, Crotzer et al, demostraron que la presentación de antígeno por los linfocitos B se ve afectada en la vía externa, mientras que los linfocitos B deficientes de  $p40^{phox}$  tenían normal la presentación por la vía interna, sugiriendo que la correcta función del complejo NADPH podría modular el repertorio de péptidos presentados por las moléculas de clase II en las células B (Crotzer et al., 2012). Futuros experimentos utilizando células B primarias son necesarios para poder dilucidar la importancia de  $p40^{phox}$  en el procesamiento y presentación de antígeno

y estudiar si este mecanismo está relacionado con los procesos de hiper-inflamación y autoinmunidad que caracteriza a estos pacientes.

Por último, el fenotipo de los pacientes con  $p40^{phox}$  difiere marcadamente del fenotipo visto en los pacientes con EGC clásica. Los pacientes con  $p40^{phox}$  presentan en su mayoría infecciones superficiales por *Staphylococcus* y procesos hiperinflamatorios. Algunos pacientes muestran también procesos autoinmunes como LES y LED. Ninguno de los pacientes presentó infecciones severas e invasivas por bacterias u hongos que comúnmente afectan a los pacientes con EGC clásica. Estas marcadas diferencias se evidencian en el mejor pronóstico que tienen estos pacientes, se observa además que no hay ningún deceso hasta el momento, mientras que la mortalidad en los pacientes con EGC puede ser hasta del 40% en las primeras dos décadas de vida (de Oliveira-Junior et al., 2015; van den Berg et al., 2009; Winkelstein et al., 2000). Otra diferencia entre la deficiencia de  $p40^{phox}$  y EGC clásica es que EGC se diagnostica en los primeros 5 años de vida, comparado a  $p40^{phox}$  en donde la media de diagnóstico es a los 15 años; esto se explica por la severidad de las infecciones en el caso de EGC, pero también a que antes de este estudio no existía un método de diagnóstico de deficiencia de  $p40^{phox}$  para el área clínica, por lo que las unidades médicas que sospechaban de EGC hacían un ensayo de DHR estimulado con PMA y los pacientes  $p40^{phox}$  responden bien a esta prueba siendo así mal diagnosticados. Con la ayuda del diagnóstico genético y las pruebas de NGS se pudo identificar a esta cohorte de 24 pacientes, así que las técnicas moleculares son una útil herramienta para el diagnóstico de enfermedad; en caso de no contar con estos estudios, una prueba de DHR pero con un estímulo de *E. coli* podría ser suficiente para el diagnóstico (van de Geer, et al. 2018).

Otras características clínicas son explicadas con los hallazgos encontrados experimentalmente en el trabajo publicado en colaboración con la Universidad de Ámsterdam. Los pacientes  $p40^{phox}$  no presentan infecciones invasivas por *Aspergillus* spp. Las cuales son una de las principales causas de muerte en pacientes con EGC clásica, esto puede explicarse debido a la importante actividad residual encontrada en los neutrófilos de los pacientes y aún más importante por la conservada actividad microbicida contra las hifas de *Aspergillus fumigatus* (van de Geer et al., 2018b). Esta actividad del complejo NADPH oxidasa y la adecuada eliminación protegería a los pacientes

deficientes de p40<sup>phox</sup> durante los primeros cinco años de vida, que es la edad en la que debutan los pacientes con EGC clásica. Adicionalmente, es intrigante por qué los pacientes con p40<sup>phox</sup> no presentan infecciones invasivas por bacterias ya que, como se observó, los neutrófilos se comportan similar a los pacientes con EGC, los cuales, si sufren de infecciones bacterianas. Futuros experimentos utilizando modelos de infección con bacterias y hongos y la formación del complejo NADPH oxidasa en endosomas tardíos servirán para dilucidar la activación diferencial en las células de los pacientes con deficiencia en p40<sup>phox</sup>.

Una de las características más frecuentes en la cohorte de pacientes con deficiencia de p40<sup>phox</sup> es la presentación de síntomas autoinmunes o hiperinflamatorios sugiriendo un posible papel de la función de p40<sup>phox</sup> con la regulación de la respuesta inmune. De igual forma, pacientes con EGC clásica presentan manifestaciones de desregulación de la respuesta inmune, sin embargo, en EGC clásica son más características las infecciones invasivas severas frecuentemente causadas por el género *Aspergillus* spp. Los resultados encontrados a partir de esta tesis y posteriormente publicados por el grupo de la Dra. Bustamante (van de Geer, *et al.* 2018) sugieren que existe un umbral de producción de especies reactivas del oxígeno que es capaz de proteger ante infecciones severas por hongos, pero no es lo suficiente para controlar la regulación de la respuesta inmune. Este fenómeno es similar al que se observa en portadoras de mutaciones en *CYBB*, en donde en términos de DHR tienen actividad residual y solamente el 6% desarrolla infecciones del tipo EGC clásica, sin embargo, el 74% de ellas presenta manifestaciones autoinmunes o inflamatorias (Marciano *et al.*, 2018).

Dilucidar la interacción entre la correcta función del complejo NADPH oxidasa y la regulación de la respuesta inmune requerirá de varias líneas de investigación y años de experimentos. Sin embargo, los descubrimientos derivados de este proyecto pueden establecer las bases para descifrar un mecanismo. Se ha reportado que mutaciones con ganancia de función en *STING* o mutaciones en *TREX1* son causantes del desarrollo de Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (Kim *et al* 2016). Estos estudios comprobaron a nivel molecular que las mutaciones son deletéreas y fueron acompañados por un buen estudio clínico para comprobar causalidad. Sin embargo, a la fecha sigue sin ser descrito el mecanismo molecular de como se está desarrollando el LES. Adicionalmente, otros

estudios han reportado mutaciones en genes como *PSMB8*, *ISG15*, *USP18*, entre otras; las cuales se han asociado a interferonopatías, este tipo de enfermedad es caracterizada por la alta producción de interferones del tipo I, causando un espectro amplio de enfermedades, incluidas la susceptibilidad a infecciones, síndrome autoinflamatorio, enfermedad cerebrovascular, entre otros (Rodero & Crow, 2016). Interesantemente, algunos de los pacientes con deficiencia en  $p40^{phox}$  presentaron interferonopatía, por lo que la regulación en la producción los interferones del tipo I y de especies reactivas del oxígeno son la clave para entender el mecanismo molecular del desarrollo de manifestaciones autoinmunes o hiper-inflamatorias.

Finalmente, el análisis genético realizado en este trabajo nos confirma el potencial que las técnicas de NGS. Sin embargo, se requiere de una estrategia bien establecida basada primordialmente en el fenotipo clínico y celular del paciente; y de una buena hipótesis genética que permita encontrar nuevos genes o mutaciones que confieren susceptibilidad a infecciones. Los más recientes reportes de cohortes utilizando NGS para el diagnóstico e identificación, reportan una tasa de efectividad del 40% cuando el fenotipo no es muy evidente y de 70% cuando el fenotipo es severo (Rae et al., 2018; Seleman et al., 2017). Esto consolida a la NGS como una técnica altamente efectiva para el diagnóstico de inmunodeficiencias, en donde un diagnóstico oportuno y certero es de vital importancia para los pacientes.

## 8. CONCLUSIONES

- Utilizando la NGS se encontraron dos mutaciones: la mutación en p.V484M (descrita por primera vez) y una mutación homocigótica en el sitio aceptor del primer exón del gen NCF4
- La mutación p.V484M es la causa de la deficiencia autosómica recesiva en NRAMP1 y tiene un impacto en la expresión de la proteína, lo cual afecta el estallido respiratorio de los neutrófilos, pero no de los monocitos del paciente.
- Se describieron 24 nuevos casos con deficiencia de p40<sup>phox</sup> y se caracterizaron 7 nuevas etiologías genéticas de p40<sup>phox</sup>

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Badwey, J. A., & Karnovsky, M. L. (1980). Active Oxygen Species and the Functions of Phagocytic Leukocytes. *Annual Review of Biochemistry*, 49(1), 695–726. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.003403>
- Bagaitkar, J., Barbu, E. A., Perez-Zapata, L. J., Austin, A., Huang, G., Pallat, S., & Dinauer, M. C. (2017). PI(3)P-p40<sup>phox</sup> binding regulates NADPH oxidase activation in mouse macrophages and magnitude of inflammatory responses in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(2), 449–457. <https://doi.org/10.1189/jlb.3AB0316-139R>
- Bagaitkar, J., Matute, J. D., Austin, A., Arias, A. A., & Dinauer, M. C. (2012). Activation of neutrophil respiratory burst by fungal particles requires phosphatidylinositol 3-phosphate binding to p40<sup>(phox)</sup> in humans but not in mice. *Blood*, 120(16), 3385–3387. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-445619>
- Bamshad, M. J., Ng, S. B., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Emond, M. J., Nickerson, D. a., & Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews Genetics*, 12(11), 745–755. <https://doi.org/10.1038/nrg3031>
- Barton, C. H., Biggs, T. E., Baker, S. T., Bowen, H., & Atkinson, P. G. (1999). Nramp1: a link between intracellular iron transport and innate resistance to intracellular pathogens. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(5), 757–762. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10577506>
- Belkadi, A., Bolze, A., Itan, Y., Cobat, A., Vincent, Q. B., Antipenko, A., ... Abel, L. (2015). Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(17), 5473–5478. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418631112>
- Blackwell, J M. (1996). Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology*, 112 Suppl, S67-74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8684837>
- Blackwell, Jenefer M. (1996). Structure and function of the natural-resistance-associated

- macrophage protein (Nramp1), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. *Molecular Medicine Today*, 2(5), 205–211. [https://doi.org/10.1016/1357-4310\(96\)88773-9](https://doi.org/10.1016/1357-4310(96)88773-9)
- Blackwell, Jenefer M, Searle, S., Mohamed, H., & White, J. K. (2003). Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story. *Immunology Letters*, 85(2), 197–203. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(02\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(02)00231-6)
- Bogaert, D. J. A., Dullaers, M., Lambrecht, B. N., Vermaelen, K. Y., De Baere, E., & Haerynck, F. (2016). Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *Journal of Medical Genetics*, 53(9), 575–590. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103690>
- Bruton, O. (1952). Agammaglobulinemia. *Pediatrics*, 9, 722–28.
- Bustamante, J., Arias, A. A., Vogt, G., Picard, C., Galicia, L. B., Prando, C., ... Casanova, J.-L. (2011). Germline *CYBB* mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. *Nature Immunology*, 12(3), 213–221. <https://doi.org/10.1038/ni.1992>
- Casanova, J.-L., & Abel, L. (2013). The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 14, 215–243. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153448>
- Casanova, J.-L., Conley, M. E., Seligman, S. J., Abel, L., & Notarangelo, L. D. (2014). Guidelines for genetic studies in single patients: lessons from primary immunodeficiencies. *Journal of Experimental Medicine*, 211(11).
- Cellier, M., Privé, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., & Gros, P. (1995). Nramp defines a family of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22), 10089–10093. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.22.10089>
- Chang, X., Zheng, P., & Liu, Y. (2006). FoxP3: a genetic link between immunodeficiency and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 5(6), 399–402.

<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2005.10.008>

Ciancanelli, M. J., Huang, S. X. L., Luthra, P., Garner, H., Itan, Y., Volpi, S., ... Casanova, J.-L. (2015). Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science*, 348(6233).

Conigliaro, P., Triggianese, P., Ballanti, E., Perricone, C., Perricone, R., & Chimenti, M. S. (2019). Complement, infection, and autoimmunity. *Current Opinion in Rheumatology*, 1. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000633>

Crotzer, V. L., Matute, J. D., Arias, A. A., Zhao, H., Quilliam, L. A., Dinauer, M. C., & Blum, J. S. (2012). Cutting Edge: NADPH Oxidase Modulates MHC Class II Antigen Presentation by B Cells. *The Journal of Immunology*, 189(8), 3800–3804. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103080>

de Oliveira-Junior, E. B., Zurro, N. B., Prando, C., Cabral-Marques, O., Pereira, P. V. S., Schimke, L.-F., ... Condino-Neto, A. (2015). Clinical and Genotypic Spectrum of Chronic Granulomatous Disease in 71 Latin American Patients: First Report from the LASID Registry. *Pediatric Blood & Cancer*, 62(12), 2101–2107. <https://doi.org/10.1002/pbc.25674>

DeLeo, F. R., Burritt, J. B., Yu, L., Jesaitis, A. J., Dinauer, M. C., & Nauseef, W. M. (2000). Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13986–13993. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.18.13986>

Di Leo, E., Panico, F., Tarugi, P., Battisti, C., Federico, A., & Calandra, S. (2004). A point mutation in the lariat branch point of intron 6 ofNPC1 as the cause of abnormal pre-mRNA splicing in Niemann-Pick type C disease. *Human Mutation*, 24(5), 440–440. <https://doi.org/10.1002/humu.9287>

Dinauer, M. C., Orkin, S. H., Brown, R., Jesaitis, A. J., & Parkos, C. A. (1987). The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature*, 327, 717. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/327717a0>

- DiSanto, J. P., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., Fischer, A., & de Saint Basile, G. (1993). CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature*, *361*(6412), 541–543. <https://doi.org/10.1038/361541a0>
- Ellson, C. D., Davidson, K., Ferguson, G. J., O'Connor, R., Stephens, L. R., & Hawkins, P. T. (2006). Neutrophils from p40<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(8).
- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., ... de Saint Basile, G. (2003). Munc13-4 Is Essential for Cytolytic Granules Fusion and Is Mutated in a Form of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*, *115*(4), 461–473. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00855-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00855-9)
- Fischer, A. (2004). Human primary immunodeficiency diseases: a perspective. *Nature Immunology*, *5*(1), 23–30. <https://doi.org/10.1038/ni1023>
- Gnann, J. W., & Whitley, R. J. (2017). Herpes Simplex Encephalitis: an Update. *Current Infectious Disease Reports*, *19*(3), 13. <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0568-7>
- Goswami, T., Bhattacharjee, A., Babal, P., Searle, S., Moore, E., Li, M., & Blackwell, J. M. (2001). Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H<sup>+</sup>/bivalent cation antiporter. *Biochem. J*, *354*, 511–519.
- Govoni, G., Vidal, S., Gauthier, S., Skamene, E., Malo, D., & Gros, P. (1996). The Bcg/Ity/Lsh locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the Nramp1 Gly169 allele. *Infection and Immunity*, *64*(8), 2923–2929. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757814>
- He, R., Nanamori, M., Sang, H., Yin, H., Dinauer, M. C., & Ye, R. D. (2004). Reconstitution of chemotactic peptide-induced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) oxidase activation in transgenic COS-<sup>phox</sup> cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *173*(12), 7462–7470. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585872>
- Holland, S. M. (2014). Chronic Granulomatous Disease. *Hematology/Oncology Clinics of*

- North America*, 27(1), 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2012.11.002>. Chronic
- Hsu, A. P., Sampaio, E. P., Khan, J., Calvo, K. R., Lemieux, J. E., Patel, S. Y., ... Holland, S. M. (2011). Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood*, 118(10), 2653–2655. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-356352>
- Illumina. (n.d.). Next-Generation Sequencing (NGS). Retrieved from <http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>
- Itan, Y., Zhang, S.-Y., Vogt, G., Abhyankar, A., Herman, M., Nitschke, P., ... Casanova, J.-L. (2013). The human gene connectome as a map of short cuts for morbid allele discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(14), 5558–5563. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218167110>
- Ito, T., Nakamura, R., Sumimoto, H., Takeshige, K., & Sakaki, Y. (1996). An SH3 domain-mediated interaction between the phagocyte NADPH oxidase factors p40 *phox* and p47 *phox*. *FEBS Letters*, 385(3), 229–232. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00387-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00387-0)
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). Immunobiology. Garland Science.
- John S, Marlow A, Hajeer A, Ollier W, Silman A, & Worthington J. (1997). Linkage and association studies of the natural resistance associated macrophage protein 1 (NRAMP1) locus in rheumatoid arthritis. - PubMed - NCBI. *Journal of Rheumatology*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/9058648>
- Kim, H., Sanchez, G. A. M., & Goldbach-Mansky, R. (2016). Insights from Mendelian Interferonopathies: Comparison of CANDLE, SAVI with AGS, Monogenic Lupus. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 94(10), 1111–1127. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1465-5>
- Kruger, G., Welte, K., Ciobanu, N., Cunningham-Rundles, C., Ralph, P., Venuta, S., ... Moore, M. A. (1984). Interleukin-2 correction of defective in vitro T-cell mitogenesis in patients with common varied immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology*,

4(4), 295–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6611349>

Kruif, P. de. (1926). *Microbe Hunters*. New York: Blue Ribbon.

Kryukov, G. V., Pennacchio, L. A., & Sunyaev, S. R. (2007). Most Rare Missense Alleles Are Deleterious in Humans: Implications for Complex Disease and Association Studies. *The American Journal of Human Genetics*, 80(4), 727–739. <https://doi.org/10.1086/513473>

Kuhn, D. E., Baker, B. D., Lafuse, W. P., & Zwilling, B. S. (1999). Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1Gly169 or Nramp1Asp169. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(1), 113–119. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10410998>

Kuhns, D. B., Alvord, W. G., Heller, T., Feld, J. J., Pike, K. M., Marciano, B. E., ... Gallin, J. I. (2010). Supplementary: Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *The New England Journal of Medicine*, 363(27), 2600–2610. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007097>

Kuijpers, T. W., Bende, R. J., Baars, P. A., Grummels, A., Derks, I. A. M., Dolman, K. M., ... van Lier, R. A. W. (2010). CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(1), 214–222. <https://doi.org/10.1172/JCI40231>

Lang, T., Prina, E., Sibthorpe, D., & Blackwell, J. M. (1997). *Nramp1 Transfection Transfers Ity/Lsh/Bcg-Related Pleiotropic Effects on Macrophage Activation: Influence on Antigen Processing and Presentation*. *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 65). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC174606/pdf/650380.pdf>

Lehman, H., & Gordon, C. (2019). The Skin as a Window into Primary Immune Deficiency Diseases: Atopic Dermatitis and Chronic Mucocutaneous Candidiasis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 7(3), 788–798. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2018.11.026>

Lemahieu, V., Gastier, J. M., & Francke, U. (1999). Novel mutations in the Wiskott-Aldrich

- syndrome protein gene and their effects on transcriptional, translational, and clinical phenotypes. *Human Mutation*, 14(1), 54–66. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1999\)14:1<54::AID-HUMU7>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:1<54::AID-HUMU7>3.0.CO;2-E)
- Malik, S., Abel, L., Tooker, H., Poon, A., Simkin, L., Girard, M., ... Schurr, E. (2005). Alleles of the NRAMP1 gene are risk factors for pediatric tuberculosis disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(34), 12183–12188. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503368102>
- Marciano, B. E., Zerbe, C. S., Liana Falcone, E., Ding, L., See DeRavin, S., Daub, J., ... Holland, S. M. (2018). Translational and clinical immunology X-linked carriers of chronic granulomatous disease: Illness, lyonization, and stability. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.035>
- Martínez-Barricarte, R., de Jong, S. J., Markle, J., de Paus, R., Boisson-Dupuis, S., Bustamante, J., ... Casanova, J.-L. (2016). Transduction of *Herpesvirus saimiri* - Transformed T Cells with Exogenous Genes of Interest. In *Current Protocols in Immunology* (Vol. 115, pp. 7.21C.1-7.21C.12). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cpim.15>
- Matute, J. D., Arias, A. A., Wright, N. A. M., Wrobel, I., Waterhouse, C. C. M., Li, X. J., ... Dinauer, M. C. (2009a). A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 *phox* and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*, 114(15), 3309–3315. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-231498>
- Matute, J. D., Arias, A. A., Wright, N. A. M., Wrobel, I., Waterhouse, C. C. M., Li, X. J., ... Dinauer, M. C. (2009b). A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40<sup>phox</sup> and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*, 114(15).
- Medina, E., & North, R. J. (1996). Evidence inconsistent with a role for the Bcg gene (Nramp1) in resistance of mice to infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1045–1051. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642246>

- Meng, X., Sawamura, D., Tamai, K., Hanada, K., Ishida, H., & Hashimoto, I. (1998). Keratinocyte gene therapy for systemic diseases. Circulating interleukin 10 released from gene-transferred keratinocytes inhibits contact hypersensitivity at distant areas of the skin. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(6), 1462–1467. <https://doi.org/10.1172/JCI11031>
- Metchnikoff, E. (1933). *Trois Fondateurs de la Médecine Moderne: Pasteur, Lister, Koch*. Paris: Alcan.
- Meyts, I., Bosch, B., Bolze, A., Boisson, B., Itan, Y., Belkadi, A., ... Casanova, J.-L. (2016). Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.003>
- Meyts, I., Bosch, B., Bolze, A., Boisson, B., Itan, Y., Belkadi, A., ... Casanova, J. L. (2016). Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(4), 957–969. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.003>
- Minegishi, Y., Saito, M., Tsuchiya, S., Tsuge, I., Takada, H., Hara, T., ... Karasuyama, H. (2007). Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*, 448(7157), 1058–1062. <https://doi.org/10.1038/nature06096>
- Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., ... de Villartay, J. P. (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*, 105(2), 177–186. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11336668>
- Neehus, A.-L. (2018). *Stem cell technologies to study effects of mutations in SLC11A1 on NADPH oxidase activity*. MHH, Hannover – Germany.
- Nunes, P., Demaux, N., & Dinauer, M. C. (2013). Regulation of the NADPH Oxidase and Associated Ion Fluxes During Phagocytosis. *Traffic*, 14, 1118–1131. <https://doi.org/10.1111/tra.12115>
- Oaks, M. K., Hallett, K. M., Penwell, R. T., Stauber, E. C., Warren, S. J., & Tector, A. J.

- (2000). A Native Soluble Form of CTLA-4. *Cellular Immunology*, 201(2), 144–153. <https://doi.org/10.1006/CIMM.2000.1649>
- Pasteur L. (1926). *Oeuvres Complètes de Louis Pasteur, Réunies par Pasteur Vallery-Radot*. (E. P. Vallery-Radot, Ed.) (Vol. 4: Et). Paris: Masson et Cie.
- Pearson, K. (1912). *Tuberculosis, Heredity and Environment* (VIII). London: Dulau.
- Picard, C., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J.-L., Chatila, T., Conley, M. E., ... Gaspar, H. B. (2015). Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *Journal of Clinical Immunology*, 35(8), 696–726. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0201-1>
- Picard, C., von Bernuth, H., Ghandil, P., Chrabieh, M., Levy, O., Arkwright, P. D., ... Casanova, J.-L. (2010). Clinical Features and Outcome of Patients With IRAK-4 and MyD88 Deficiency. *Medicine*, 89(6), 403–425. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3181fd8ec3>
- Przybyszewska, J., Zlotogorski, A., & Ramot, Y. (2017). Re-evaluation of epidermodysplasia verruciformis: Reconciling more than 90 years of debate. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76(6), 1161–1175. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.12.035>
- Qamar, N., & Fuleihan, R. L. (2014). The Hyper IgM Syndromes. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 46(2), 120–130. <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8378-7>
- Quintana-Murci, L., & Clark, A. G. (2013). Population genetic tools for dissecting innate immunity in humans. *Nature Reviews Immunology*, 13(4), 280–293. <https://doi.org/10.1038/nri3421>
- Raad, H., Paclet, M.-H., Boussetta, T., Kroviarski, Y., Morel, F., Quinn, M. T., ... El-Benna, J. (2009). Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91<sup>phox</sup>/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67<sup>phox</sup>, and p47<sup>phox</sup>. *The FASEB Journal*, 23(4), 1011–1022. <https://doi.org/10.1096/fj.08-114553>

- Rae, W., Ward, D., Mattocks, C., Pengelly, R. J., Eren, E., Patel, S. V., ... Williams, A. P. (2018). Clinical efficacy of a next-generation sequencing gene panel for primary immunodeficiency diagnostics. *Clinical Genetics*, 93(3), 647–655. <https://doi.org/10.1111/cge.13163>
- Rawlings, D. (1999). Bruton's tyrosine kinase controls a sustained calcium signal essential for B lineage development and function. *Clin. Immunol*, (91), 243–53.
- Reyes-Martínez, J. E., Nieto-Patlán, E., Nieto-Patlán, A., Gonzaga-Bernachi, J., Santos-Mendoza, T., Serafín-López, J., ... Chacón-Salinas, R. (2014). Differential activation of dendritic cells by Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype. *Immunological Investigations*, 43(5), 436–446. <https://doi.org/10.3109/08820139.2014.880120>
- Rodero, M. P., & Crow, Y. J. (2016). Type I interferon-mediated monogenic autoinflammation: The type I interferonopathies, a conceptual overview. *The Journal of Experimental Medicine*, 213(12), 2527–2538. <https://doi.org/10.1084/jem.20161596>
- Roifman, C. M., Somech, R., Kavadas, F., Pires, L., Nahum, A., Dalal, I., & Grunebaum, E. (2012). Defining combined immunodeficiency. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(1), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.04.029>
- Rosain, J., Kong, X., Martinez-Barricarte, R., Oleaga-Quintas, C., Ramirez-Alejo, N., Markle, J., ... Bustamante, J. (2019). Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014–2018 update. *Immunology & Cell Biology*, 97(4), 360–367. <https://doi.org/10.1111/imcb.12210>
- Saouaf, S., Mahajan, S., Rowley, R., Kut, S., Fargnoli, J., & Al., E. (1994). Temporal differences in the activation of three classes of non-transmembrane protein tyrosine kinases following B-cell antigen receptor surface engagement. *Proc. Natl. Acad Sci*, (91), 9524–28.
- Schmalstieg, F. C., & Goldman, A. S. (2002). Immune consequences of mutations in the human common gamma-chain gene. *Molecular Genetics and Metabolism*, 76(3), 163–171. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12126929>

- Seleman, M., Hoyos-Bachiloglu, R., Geha, R. S., & Chou, J. (2017). Uses of Next-Generation Sequencing Technologies for the Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. *Frontiers in Immunology*, 8, 847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00847>
- Sharfe, N., Dadi, H. K., Shahar, M., & Roifman, C. M. (1997). Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3168–3171. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3168>
- Smith, T., & Cunningham-Rundles, C. (2019). Primary B-cell immunodeficiencies. *Human Immunology*, 80(6), 351–362. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.10.015>
- Sönmez, H. E., & Özen, S. (2017). A clinical update on inflammasomopathies. *International Immunology*, 29(9), 393–400. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx020>
- Stadt, U. Zur, Beutel, K., Kolberg, S., Schneppenheim, R., Kabisch, H., Janka, G., & Hennies, H. C. (2006). Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A. *Human Mutation*, 27(1), 62–68. <https://doi.org/10.1002/humu.20274>
- Suh, C.-I., Stull, N. D., Li, X. J., Tian, W., Price, M. O., Grinstein, S., ... Dinauer, M. C. (2006). The phosphoinositide-binding protein p40<sup>phox</sup> activates the NADPH oxidase during FcγIIA receptor-induced phagocytosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(8), 1915–1925. <https://doi.org/10.1084/jem.20052085>
- Tesi, B., Chiang, S. C. C., El-Ghoneimy, D., Hussein, A. A., Langenskiöld, C., Wali, R., ... Meeths, M. (2015). Spectrum of Atypical Clinical Presentations in Patients with Biallelic PRF1 Missense Mutations. *Pediatric Blood & Cancer*, 62(12), 2094–2100. <https://doi.org/10.1002/pbc.25646>
- Thiel, J., Kimmig, L., Salzer, U., Grudzien, M., Lebrecht, D., Hagena, T., ... Schlesier, M. (2012). Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(3), 801-810.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.09.027>

- Thomas, D. C., Clare, S., Sowerby, J. M., Pardo, M., Juss, J. K., Goulding, D. A., ... Smith, K. G. C. (2017). Eros is a novel transmembrane protein that controls the phagocyte respiratory burst and is essential for innate immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(4), 1111–1128. <https://doi.org/10.1084/jem.20161382>
- Valdez, Y., Grassl, G. A., Guttman, J. A., Coburn, B., Gros, P., Vallance, B. A., & Finlay, B. B. (2009). Nramp1 drives an accelerated inflammatory response during *Salmonella*-induced colitis in mice. *Cellular Microbiology*, 11(2), 351–362. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01258.x>
- Valiaho, J., Smith, C., & Vihinen, M. (2006). BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Hum. Mutat.*, (27), 1209–17.
- Vallery-Radot, R. (1926). *The Life of Pasteur* (Garden Cit). NY: Garden City Publ.
- van de Geer, A., Nieto-Patlán, A., Kuhns, D. B., Tool, A. T., Arias, A. A., Bouaziz, M., ... Bustamante, J. (2018a). Inherited p40<sup>phox</sup> deficiency differs from classic chronic granulomatous disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(9), 3957–3975. <https://doi.org/10.1172/JCI97116>
- van de Geer, A., Nieto-Patlán, A., Kuhns, D. B., Tool, A. T. J., Arias, A. A., Bouaziz, M., ... Bustamante, J. (2018b). Inherited p40<sup>phox</sup> deficiency differs from classic chronic granulomatous disease. *Journal of Clinical Investigation*, 128(9), 3957–3975. <https://doi.org/10.1172/JCI97116>
- van den Berg, J. M., van Koppen, E., Åhlin, A., Belohradsky, B. H., Bernatowska, E., Corbeel, L., ... Kuijpers, T. W. (2009). Chronic granulomatous disease: The European experience. *PLoS ONE*, 4(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005234>
- van Zelm, M. C., Reisli, I., van der Burg, M., Castaño, D., van Noesel, C. J. M., van Tol, M. J. D., ... Franco, J. L. (2006). An Antibody-Deficiency Syndrome Due to Mutations in the *CD19* Gene. *New England Journal of Medicine*, 354(18), 1901–1912. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051568>
- van Zelm, M. C., Smet, J., Adams, B., Mascart, F., Schandené, L., Janssen, F., ... van der Burg, M. (2010). CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation

- and leads to antibody deficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 1265–1274. <https://doi.org/10.1172/JCI39748>
- Vetrie, D., Vořechovský, I., Sideras, P., Holland, J., Davies, A., Flinter, F., ... Bentley, D. R. (1993). The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*, 361(6409), 226–233. <https://doi.org/10.1038/361226a0>
- Villa, A., Santagata, S., Bozzi, F., Imberti, L., & Notarangelo, L. D. (1999). Omenn syndrome: a disorder of Rag1 and Rag2 genes. *Journal of Clinical Immunology*, 19(2), 87–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10226883>
- Wang, Y., Kanegane, H., Sanal, O., Tezcan, I., Ersoy, F., Futatani, T., & Miyawaki, T. (2002). Novel Igalpha (CD79a) gene mutation in a Turkish patient with B cell-deficient agammaglobulinemia. *American Journal of Medical Genetics*, 108(4), 333–336. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11920841>
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- White, J. K., Stewart, A., Popoff, J.-F., Wilson, S., & Blackwell, J. M. (2004). Incomplete glycosylation and defective intracellular targeting of mutant solute carrier family 11 member 1 (Slc11a1). *Biochemical Journal*, 382(3).
- Winkelstein, J. A., Marino, M. C., Johnston, R. B., Boyle, J., Curnutte, J., Gallin, J. I., ... Dickler, H. (2000). Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine*, 79(3), 155–169. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844935>

10. APÉNDICE 1. Compilación de los pacientes deficientes de p40<sup>phox</sup>.

Familia	Paciente	Mutación	Origen	Sexo (M/H)	Edad de debut (años)	Edad de diagnóstico (años)	Fenotipo clínico
Familia B	P3	c.118-1G>A / c.118-1G>A	Pakistán	H	4	9	Úlceras bucales, Enfermedad inflamatoria intestinal con granulomas en colón, abscesos en piel por <i>Staphylococcus.aureus</i>
Familia C	P4	c.118-1G>A / c.118-1G>A	Pakistán	M	1	2	Fiebre crónica, infecciones pulmonares recurrentes (sin aislados microbiológicos), granuloma en ganglios pulmonares
Familia C	P5	c.118-1G>A / c.118-1G>A	Pakistán	H	-	1	Asintomático
Familia D	P6	c.118-1G>A / c.118-1G>A	Rusia	M	11	17	Enfermedad inflamatoria intestinal con granulomas en mucosa oral, esófago y colón. Blefaritis y conjuntivitis recurrentes.
Familia E	P7	c.118-1G>A / c.759-1G>C	Estados Unidos de América	H	7	10	Lupus discoide cutáneo complicado por infección en piel por <i>Staphylococcus.aureus</i> , fisuras anales, úlceras bucales, criptitis en colón, sigmoideo y recto.

Familia F	P8	c.120_134del15 / c.120_134del15	Portugal	H	5	7	Abscesos bucales y en piel, periodontitis.
Familia F	P9	c.120_134del15 / c.120_134del15	Portugal	M	1	1	Úlceras bucales recurrentes
Familia G	P10	c.120_134del15 / c.120_134del15	Portugal	M	2	15	Enfermedad inflamatoria intestinal con granulomas en colón, Vulvar lichen planus.
Familia H	P11	p.R58C / p. R58C	Colombia	H	2	6	Fiebre crónica, diarrea crónica, micosis oral (no confirmada por aislamiento). Histoplasmosis diseminada recurrente
Familia H	P12	p.R58C / p. R58C	Colombia	H	-	10	Asintomático
Familia H	P13	p.R58C / p. R58C	Colombia	M	-	8	Asintomático
Familia H	P14	p.R58C / p. R58C	Colombia	H	-	3	Asintomático
Familia I	P15	p. R105Q / p. R105Q	Pakistán	M	9	14	Lesiones en piel tipo lupus
Familia I	P16	p. R105Q / p. R105Q	Pakistán	H	Desconocido	46	Lesiones en piel tipo lupus en la infancia
Familia I	P17	p. R105Q / p. R105Q	Pakistán	H	5	23	Infecciones recurrentes por <i>Staphylococcus aureus</i> , eczema.
Familia I	P18	p. R105Q / p. R105Q	Pakistán	H	Desconocido	19	Inflamación en las encías y piel
Familia I	P19	p. R105Q / p. R105Q	Pakistán	H	7	16	Recurrentes infecciones en piel, lesiones tipo lupus y dermatitis
Familia I	P20	p. R105Q / p. R105Q	Pakistán	M	3	15	Impétigo, lupus discoide

Familia I	P21	p. R105Q / p. R105Q	Pakistán	M	4	9	Abscesos en piel por <i>Staphylococcus aureus</i> , impétigo y lesiones tipo lupus
Familia J	P22	p. P144T / p. P144T	Argentina	M	1	7	Neumonía, linfadenitis lateral por BCG, lesiones cutáneas
Familia K	P23	p. W239X / p. W239X	Kuwait	M	14	37	Gastritis, fistulas anales severas con recurrentes abscesos y estenosis. Adenocarcinoma del canal anal.
Familia K	P24	p. W239X / p. W239X	Kuwait	M	8	32	Úlceras esofágicas, fistulas anales severas. Diagnosticado con enfermedad de Crohn. Abscesos en piel recurrentes, escleritis y periodontitis severa.
Familia L	P25	p.R58C / p. R58C	Chile	M	17	23	Enfermedad inflamatoria intestinal con granuloma en colón e inflamación perianal. Eritema nodoso y pioderma gangrenoso.

## 11. ARTÍCULOS

### 11.1 Artículos de primer autor

- *Inherited p40<sup>phox</sup> deficiency differs from classic chronic granulomatous disease.*  
**Alejandro Nieto-Patlán**; Annemarie van de Geer; Douglas B. Kuhns; Anton T.J. Tool; Andrés A. Arias; Matthieu Bouaziz; Martin de Boer; José Luis Franco; Roel P. Gazendam; John L. van Hamme; Michel van Houdt; Karin van Leeuwen; Paul J.H. Verkuijlen; Timo K. van den Berg; Juan F. Alzate; Carlos A. Arango-Franco; Vritika Batura; Andrea R. Bernasconi; Barbara Boardman; Claire Booth; Siobhan O. Burns; Felipe Cabarcas; Nadine Cerf Bensussan; Fabienne Charbit-Henrion; Anniëk Corveleyn; Caroline Deswarte; María Esnaola Azcoiti; Dirk Foell; John I. Gallin; Carlos Garcés; Margarida Guedes; Claas H. Hinze; Steven M. Holland; Stephen M. Hughes; Patricio Ibañez; Harry L. Malech; Isabelle Meyts; Marcela Moncada-Velez; Kunihiro Moriya; Esmeralda Neves; Matias Oleastro; Laura Perez; Vimel Rattina; Carmen Oleaga-Quintas; Neil Warner; Aleixo M. Muise; Jeanet Serafín López; Eunice Trindade; Julia Vasconcelos; Séverine Vermeire; Helmut Wittkowski; Austen Worth; Laurent Abel; Mary C. Dinauer; Peter D. Arkwright; Dirk Roos; Jean-Laurent Casanova; Taco W. Kuijpers; Jacinta Bustamante. *Journal of Clinical Investigation*, 2018. PMC6118590

### 11.2 Artículos de coautor

- *Human DOCK2 Deficiency: Report of a Novel Mutation and Evidence for Neutrophil Dysfunction.*  
 Moens L, Gouwy M, Bosch B, Pastukhov O, **Alejandro Nieto-Patlán**, Siler U, Bucciol G, Mekahli D, Vermeulen F, Desmet L, Maebe S, Flipts H, Corveleyn A, Moshous D, Philippet P, Tangye SG, Boisson B, Casanova JL, Florin B, Struyf S, Reichenbach J, Bustamante J, Notarangelo LD, Meyts I. *Journal of Clinical Immunology*; 2019. PMID: 30838481.

- *Human IFN- $\gamma$  immunity to mycobacteria is governed by both IL-12 and IL-23.*  
 Martínez-Barricarte R, Markle JG, Ma CS, Deenick EK, Ramírez-Alejo N, Mele F, Latorre D, Mahdavian SA, Aytekin C, Mansouri D, Bryant VL, Jabot-Hanin F, Deswarte C, **Alejandro Nieto-Patlán**, Surace L, Kerner G, Itan Y, Jovic S, Avery DT, Wong N, Rao G, Patin E, Okada S, Bigio B, Boisson B, Rapaport F, Seeleuthner Y, Schmidt M, Ikinciogullari A, Dogu F, Tanir G, Tabarsi P, Bloursaz MR, Joseph JK, Heer A, Kong XF, Migaud M, Lazarov T, Geissmann F, Fleckenstein B, Arlehamn CL, Sette A, Puel A, Emile JF, van de Vosse E, Quintana-Murci L, Di Santo JP, Abel L, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Tangye SG, Sallusto F, Casanova JL.
  
- *A variety of Alu-mediated copy number variations can underlie IL-12Rb1 deficiency.*  
 Jérémie Rosain; Carmen Oleaga-Quintas; Caroline Deswarte; Hannah Verdin; Stéphane Marot; Garyfallia Syridou; Mahboubeh Mansouri; Seyed Alireza Mahdavian; Edna Venegas Montoya; Maria Tsolia; Mehrnaz Mesdaghi; Liudmyla Chernyshova; Yuriy Stepanovskiy; Nima Parvaneh; Seyed Davood Mansouri; Sigifredo Pedraza; Anastasia Bondarenko; Sara Elva Espinosa-Padilla; Marco Antonio Yamazaki-Nakashimada; **Alejandro Nieto-Patlán**; Gaspard Kerner; Nathalie Lambert; Corinne Jacques; Emilie Corvilain; Mélanie Migaud; Virginie Grandin; Fabienne Jabot-Hanin; Stéphanie Boisson-Dupuis; Capucine Picard; Patrick Nitschke; Anne Puel; Frederic Tores; Laurent Abel; Lizbeth Blancas Galicia; Elfride De Baere; Christine Bole-Feysot; Jean-Laurent Casanova; Jacinta Bustamante. *Journal of Clinical Immunology*; 2018 PMID: PMC6329663.
  
- *Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease Caused by a Novel Founder IL12B Mutation in Saudi Arabia.*  
 Abdulrahman N. Alodayani; Abdulnasir M. Al-Otaibi; Caroline Deswarte; Husn Habib Frayha; Matthieu Bouaziz; Maryam AlHelale; Tom Le Voyer; **Alejandro Nieto-Patlán**; Vimel Rattina; Mofareh AlZahrani; Rabih Halwani; Fahad Al Sohime; Hamoud Al-Mousa; Saleh Al-Muhsen; Sami H. Alhajjar; Nabil S. Dhayhi; Laurent Abel; Jean-

Laurent Casanova; Ibrahim Bin-Hussain; May S. AlBarrak; Suliman A. Al-Jumaah; Jacinta Bustamante. *Journal of Clinical Immunology*; 2018. PMCID: PMC5934323

- *Disseminated BCG Infectious Disease and Hyperferritinemia in a Patient with a Novel NEMO Mutation.*

Karaca NE; Aksu G; Ulusoy E; Cavusoglu C; Oleaga-Quintas C; **Alejandro Nieto-Patlán**; Richard ME; Deswarte C; Casanova JL; Bustamante J; Kutukculer. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*; 2016. PMID: 27470647